

T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİNİN FARKLI TİP VE EVRELERİNDE
GEBELİKLE İLİŞKİLİ PLAZMA PROTEİN-A (PAPP-A)'NIN
POTANSİYEL BİR BİYOBELİRTEÇ OLARAK
KULLANILABİLİRLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

İREM NUR SAVAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdurrahman Coşkun

İSTANBUL-2019

Anabilim Dalı: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji
Program: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Tezli Yüksek Lisans
Tez Başlığı: Akciğer Kanserinin Farklı Tip ve Evrelerinde Gebelikle İlişkili Plazma Proteini-A (PAPP-A)'nın Potansiyel Bir Biyobelirteç Olarak Kullanılabilirliğinin Değerlendirilmesi
Öğrencinin Adı-Soyadı: İrem Nur Savaş
Savunma Sınavı Tarihi: 24 / 05 / 2019

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Aysel Özpınar Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Abdurrahman Coşkun Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi
Üye	Doç. Dr. Saime Batırel Marmara Üniversitesi
Üye	Prof. Dr. Aysel Özpınar Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi
Üye	Prof. Dr. Abdurrahman Coşkun Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

02.05.2019

İREM NUR SAVAŞ



ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Akciğer kanseri, ülkemiz de dâhil olmak üzere dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ailesinin tüm üyelerinin tümör oluşumu ve gelişimi ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada IGF ailesine bağlı IGF-1, IGFBP-4 ve PAPP-A moleküllerinin akciğer kanseri ile olan ilişkilerinin incelenmesine olanak sağlayarak, bu hastalığın tanı ve takip sürecine katkıda bulunmayı amaçladık.

Çalışmanın planlanması ve hayata geçirilmesiyle birlikte, tüm yüksek lisans eğitimim ve tez sürecim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Abdurrahman Coşkun'a,

Çalışma kapsamında kullanılan numunelerin toplanması ve bu çalışmanın gerçekleşmesi için sağladıkları katkılardan dolayı Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesinin Değerli Doktorları; Doç. Dr. İsmet Bulut ve Uzm. Dr. Akın Öztürk'e,

Tezimin yazım aşaması ve düzenlenmesine olan katkıları ile birlikte, tüm tez sürecim ve hayatım boyunca bana destek olan sevgili kardeşim Esra Nur Yaşa'ya,

Manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen tüm aileme ve eşim Çağrı Savaş'a en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
RESİMLER LİSTESİ.....	ix
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Büyüme Hormonu.....	6
2.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Ailesi.....	6
2.2.1. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF)	8
2.2.1.1. IGF-1	8
2.2.2.1. IGF-1R	11
2.2.3. İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler (IGFBP).....	13
2.2.3.1. IGFBP-1	14
2.2.3.2. IGFBP-2	14
2.2.3.3. IGFBP-3	15
2.2.3.4. IGFBP-4	15
2.2.3.5. IGFBP-5	16
2.2.3.6. IGFBP-6	17
2.2.4. İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinlerin proteazları..	18
2.3. Gebelikle İlişkili Plazma Proteini-A (PAPP-A).....	19
2.3.1. Yapısı.....	20
2.3.2. Düzenlenmesi.....	21
2.3.2.1. Enzimatik aktivitesi	22
2.3.2.2. Enzimatik aktivitesinin inhibisyonu.....	24
2.3.4. Biyokimyasal etkileri	25

2.4. IGF-1, IGFBP-4 ve PAPP-A'nın Kansere ilişkisi	26
2.5. Kanser	28
2.5.1. Akciğer kanseri	29
2.5.2. Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması.....	32
2.5.2.1. Küçük hücreli akciğer kanseri.....	32
2.5.2.2. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	33
2.5.3. Akciğer kanserinde evreleme	35
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	38
3.1. Örneklerin Toplanması	38
3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	38
3.3. Gereçler	40
3.3.1. Kitler.....	40
3.3.2. Cihazlar.....	40
3.4. Yöntemler.....	40
3.4.1. IGF-1 düzeylerinin kemilüminesans yöntemi ile ölçümü	40
3.4.2. ELISA yöntemi	41
3.4.2.1. IGFBP-4 düzeylerinin ölçümü	41
3.4.2.2. PAPP-A düzeylerinin ölçümü	44
3.5. İstatistiksel Analiz	47
4. BULGULAR	49
4.1. IGF-1	52
4.2. IGFBP-4	53
4.3. PAPP-A	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
6. LİMİTASYONLAR	65
KAYNAKLAR.....	66

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

- ALS:** Acid labile subunit
EGF: Epidermal büyüme faktörü
EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FGF: Fibroblast büyüme faktörü
FSH: Folikül uyarıcı hormon
GH: Büyüme hormonu
HRP: Horseradish peroksidaz
IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFBP: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein
IGF-R: İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü
MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz
NSCLC: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
PAPP-A: Gebelikle ilişkili plazma proteini-A
PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
proMBP: proform of eosinophil major basic protein
SCLC: Küçük hücreli akciğer kanseri
STC: Stanniocalcin
TMB: Tetremetilbenzidin

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörlerinin yapısı ve biyolojik etkilerinden örnekler.....	11
Şekil 2. PAPP-A'nın monomer yapısı.....	20
Şekil 3. PAPP-A'nın sentez ve salınımının düzenlenmesi.....	21
Şekil 4. PAPP-A'nın IGFBP-4'e karşı proteolitik aktivitesi.....	23
Şekil 5A. PAPP-A'nın aterosklerotik plak oluşumuna etkisi.....	26
Şekil 5B. PAPP-A'nın tümör gelişimine etkisi.....	26
Şekil 6. Kanseri gelişmesine neden olan karakteristik özellikler.....	29
Şekil 7. Kontrol grubunun IGF-1 ve IGFBP-4 düzeyleri arasındaki ilişki.....	51
Şekil 8. IGFBP-4 ölçümü için kalibrasyon eğrisi.....	53
Şekil 9. PAPP-A ölçümü için kalibrasyon eğrisi.....	54
Şekil 10. Tedavi alımına göre gruplandırılan akciğer kanseri hastalarının ve kontrol grubunun IGFBP-4 düzeyleri.....	55
Şekil 11. Tedavi alımına göre gruplandırılan akciğer kanseri hastalarının ve kontrol grubunun PAPP-A düzeyleri.....	56

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1A. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) Ailesi.....	7
Tablo 1B. Proteolitik aktivite gösterdikleri IGFBP gruplarına göre IGFBP Proteazları.....	7
Tablo 2. Akciğer kanserinin histolojik tiplerinin dağılım ortalamaları.....	33
Tablo 3. Demografik Bilgiler.....	39
Tablo 4A. Kontrol grubu ve tedaviye göre oluşturulan grupların PAPP-A, IGFBP-4 ve IGF-1 düzeyleri.....	49
Tablo 4B. Kontrol grubu ve akciğer kanserinin histolojik alt tipine göre oluşturulan grupların PAPP-A, IGFB-4 ve IGF-1 düzeyleri.....	50

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. IGFBP-4 düzeylerinin Total IGFBP-4 ELISA kiti kullanılarak ölçülmesi sırasında tüm kuyucuklara TMB solüsyonu pipetlendikten sonra gözlenen mavi renk oluşumu.....	40
Resim 2. IGFBP-4 düzeylerinin Total IGFBP-4 ELISA kiti kullanılarak ölçülmesi sırasında tüm kuyucuklara Stop solüsyonu pipetlendikten sonra gözlenen sarı renk oluşumu.....	41
Resim 3. PAPP-A düzeylerinin Ultrasensitiv PAPP-A ELISA kiti kullanılarak ölçülmesi sırasında tüm kuyucuklara TMB solüsyonu pipetlendikten sonra gözlenen mavi renk oluşumu.....	43
Resim 4. PAPP-A düzeylerinin Ultrasensitiv PAPP-A ELISA kiti kullanılarak ölçülmesi sırasında tüm kuyucuklara Stop solüsyonu pipetlendikten sonra gözlenen sarı renk oluşumu.....	44

ÖZET

Gebelikle ilişkili plazma proteini-A (PAPP-A); İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) bağlı IGF bağlayıcı protein-4 (IGFBP-4)'e karşı proteolitik aktivite göstererek IGF konsantrasyonlarının düzenlenmesinde rol alan bir enzimdir. IGFBP-4 ortamdaki serbest IGF'leri bağlayarak taşınmasında ve korunmasında rol alırken aktivitelerini sınırlandırır. IGFBP-4'ün PAPP-A ile proteolizi sonrası serbest kalan IGF'ler büyümeyi ve birçok metabolik aktiviteyi düzenlemek üzere reseptörlerine bağlanır. Son yıllarda yapılan çalışmalar IGF ailesinin tümör hücrelerinin oluşumunda ve gelişiminde rol aldığını ve IGFBP-4 ve PAPP-A konsantrasyonlarının çeşitli tümör kaynaklı hücrelerde yüksek düzeylerde olduğunu göstermiştir. Güncel Küresel Kanser İstatistikleri (Global Cancer Statistics, GLOBOCAN,2018) raporuna göre, akciğer kanseri en sık tanı alan kanserdir ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık 1/5'ini üstlenir. Bu bilgiler doğrultusunda, PAPP-A'nın akciğer kanserinde potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesini amaçladık. Akciğer kanserinin farklı tip ve evrelerine sahip 60 hasta ve 23 sağlıklı bireyin serumlarında IGF-1 düzeyleri kemilüminesans, IGFBP-4 ve PAPP-A düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü. Hastalar tedavi alımına ve akciğer kanserinin histolojik tipine göre gruplandırıldı. Analiz sonuçlarına göre hasta ve kontrol gruplarının IGF-1 düzeyleri arasında bir fark gözlenmedi. Yalnızca tedaviye başlamamış hastalardan oluşan grubun PAPP-A düzeyleri, kontrol grubundan yüksek olarak ölçüldü ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. IGFBP-4 düzeyleri ise tüm hasta gruplarında kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olarak ölçüldü. Bu çalışma akciğer kanserinde PAPP-A düzeylerinin yükseldiğini desteklemekle birlikte, PAPP-A'ya kıyasla IGFBP-4'ün bir biyobelirteç olarak kullanılmak üzere daha yüksek potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: IGF-1, IGFBP-4, Akciğer kanseri, PAPP-A, Tümör biyobelirteçleri

SUMMARY

Evaluation of PAPP-A as a Potential Biomarker in Different Types and Stages of Lung Cancer

Pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A); regulates the Insulin like growth factor (IGF) concentrations through degradation of IGF dependent IGFBP-4. IGFBP-4 binds to free IGFs and limits their activity. The IGFs released after proteolysis of IGFBP-4 by PAPP-A; bind to their receptors to regulate growth and various metabolic activities. IGF family has a role in the formation and development of tumor cells and that IGFBP-4 and PAPP-A concentrations are high in various tumor-derived cells. According to the recent Global Cancer Statistics (GLOBOCAN, 2018); lung cancer is the most commonly diagnosed cancer and it causes nearly 1 out of 5 cancer deaths. Based on this information, the research aimed to evaluate PAPP-A as a potential biomarker for lung cancer. Serum IGFBP-4 and PAPP-A levels were measured by using ELISA and serum IGF-1 levels were measured by the chemiluminescence method of 60 patients with different types and stages of lung cancer and 23 healthy individuals. Patients were divided into groups based on the treatment and histology of lung cancer. According to our results, no significant difference was found between the IGF-1 levels of the patient and control groups. PAPP-A levels of untreated patients were higher than the control group, but the difference was not statistically significant. IGFBP-4 levels were significantly higher for all patient groups than the control group. This study corroborates the increased levels of PAPP-A in lung cancer, also indicates that IGFBP-4 has higher potential to be used as a biomarker than PAPP-A.

Key Words: IGF-1, IGFBP-4, Lung Cancer, PAPP-A, Tumor biomarkers

1. GİRİŞ VE AMAÇ

PAPP-A, ilk olarak 1974 yılında gebe kadınların plazmasında bol miktarda bulunan ancak biyolojik fonksiyonu bilinmeyen 4 proteinden biri olarak tanımlanmış ve Gebelikle İlişkili Plazma Proteini-A (PAPP-A) olarak adlandırılmıştır (1). Gebe kadınların plazmasındaki değişken düzeyleriyle ilgili yapılan çalışmalarla birlikte PAPP-A, 1990'lı yıllarda Down sendromu taramasında kullanılmaya başlanmıştır ve günümüzde de bu uygulama devam etmektedir (2). 1999 yılında PAPP-A'nın IGF bağlı IGFBP-4'e karşı proteolitik fonksiyonu keşfedilmiş (3) ve ilerleyen yıllarda, insan osteoblast ve fibroblastları gibi çeşitli hücre ve dokularda da sentezlendiği gözlenmiştir (4).

IGF ailesi; insülin benzeri büyüme faktörleri, (IGF-1, IGF-2), IGF reseptörleri (IGF-1R, IGF-2R), IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP 1-6) ve bu bağlayıcı proteinlerin proteazlarını kapsayan geniş bir büyüme faktörü ailesidir (5). IGF ailesinin oluşturduğu sistem genel olarak büyümeyi ve metabolizmayı kontrol etmekle birlikte birçok hücrede; proliferasyon, farklılaşma ve migrasyonun düzenlenmesinde rol alır. IGF'ler dolaşımda 6 farklı bağlayıcı proteinden birine bağlı hâlde bulunurlar. Bu bağlayıcı proteinler IGF'lerin taşınmasında, korunmasında ve reseptörleri ile olan ilişkisinin kontrol edilmesinde rol alırlar (6). IGFBP'ler spesifik proteazlar tarafından parçalanana kadar IGF'ler reseptörlerine bağlanamaz ve büyümeyi uyaran aktivasyonlarını gerçekleştiremez. Dolaşımdaki serbest IGF düzeyleri, IGF bağlayıcı proteinlere ve bu proteinlerin proteazlarına bağlıdır (5).

PAPP-A, çinko bağlı bir metalloproteinazdır. IGFBP-4'ün başlıca proteazı olmakla birlikte IGFBP-2 ve IGFBP-5'e karşı proteolitik aktivite göstermektedir (7). IGFBP-4 ilk kez insan osteosarkoma hücrelerinde inhibitör işlevleri olan bir IGFBP olarak tanımlanmıştır (8). IGF-1 biyoayarlanımını ve anabolik etkilerini düzenler. PAPP-A, IGFBP'leri tek bir noktadan böler; bu bölünme, IGFBP'lerin IGF'ler için

bağlanma afinitesinin kaybına ve dolayısıyla IGF'lerden ayrılmalarına neden olur (6). Böylece serbest IGF düzeylerinde artış gözlenir. PAPP-A proteolitik aktivitesini hücre yüzeyine bağlı olarak gerçekleştirir. Bu aktivite merkezi IGF'lerin IGFBP'lerden hücre yüzeyine yakın bir noktada ayrılmasını ve diğer bağlayıcı proteinler tarafından tutulmadan reseptörlerine bağlanmasını sağlar (9). Reseptörlerine bağlanan IGF'ler proliferasyon ve migrasyon gibi biyolojik aktiviteler için hücre içi sinyal yollarını başlatır. IGF ailesinin oluşturduğu sistem, güçlü bir etkileşim hâlinindedir ve bu etkileşimin herhangi bir aşamasındaki düzenleme, birbirleriyle bağlantılı olarak ilerleyerek patolojik durumlara yol açabilir (10). Son yıllarda yapılan çalışmalar; IGF ailesinin çeşitli tümör tiplerinin oluşumunda, gelişiminde ve metastazında rol oynadığını göstermektedir. IGF-1 (10), IGFBP-4 (11) ve PAPP-A (9) çeşitli tümör kaynaklı hücreler tarafından yüksek düzeyde eksprese edilir. IGF'ler sağlıklı hücrelerde gösterdikleri etkilerini tümör hücrelerinde de göstererek hücre proliferasyonu, klonal büyüme ve migrasyon gibi tümör aşamalarının önemli düzenleyicileri olarak aktivite gösterir (12). IGFBP-4; IGF aktivitelerini engelleyerek (13), PAPP-A ise destekleyerek tümör büyümesinin düzenlenmesinde rol alırlar (14). Yapılan çalışmalar; PAPP-A'nın meme (15), böbrek (16), yumurtalık (17) ve akciğer (18) gibi çeşitli kanserlerle olan ile ilişkisini ortaya koymaktadır.

Dünya genelinde kanser değerlendirmesi yapan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency for Research on Cancer, IARC)'nın 2018 yılında yayınladığı güncel Küresel Kanser İstatistikleri (Global Cancer Statistics, GLOBOCAN) raporuna göre; her iki cinsiyet bir arada incelendiğinde akciğer kanseri en sık tanı alan kanser olmakla birlikte (tüm vakaların %11,6'sı), kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (kansere bağlı ölümlerin %18,4'ü) (19). Küçük hücreli olmayan (NSCLC) akciğer kanserli hastaların PAPP-A serum düzeylerinin sağlıklı kontrol gruplarına göre kayda değer biçimde yüksek olduğu saptanmıştır (20). Bu bilgiler doğrultusunda PAPP-A, test edilmeyi bekleyen potansiyel bir kanser biyobelirteci olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışmada akciğer kanserinin farklı histolojik tip ve evrelerinde PAPP-A'nın tanısal ve öngörücü potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanımının değerlendirilmesi amacıyla PAPP-A, IGFBP-4 ve IGF-1 düzeylerinin ölçölmesi planlandı. Bu çalışmada ayrıca 3 parametrenin tüm hasta ve kontrol gruplarında birlikte ölçölmesiyle aralarındaki ilişkinin farklı durumlarda incelenmesi amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Büyüme Hormonu

İnsan büyüme hormonu (GH), hem çocuklarda hem de yetişkinlerde vücut büyümesini ve metabolizmayı kontrol eden bir hormondur. Doğum sonrası doğrusal büyümeyi ve kas gelişimi kontrol ederek vücudun bir bütün hâlinde büyümesinde etkin rol oynar (21). Büyüme hormonunun sentezlenmesi, salgılanması ve bu mekanizmaların kontrol edilmesi için birçok merkezi ve çevresel faktör rol almaktadır. Bunlardan bazıları; nöropeptitler, serbest yağ asitleri, vücuttaki protein ve karbonhidrat düzeyleriyle birlikte; büyüme hormonu salma hormonu (GHRH), somatostatin (SRIF), ghrelin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1(IGF-1)'dir (22). IGF-1'in büyük çoğunluğu büyüme hormonun uyarılmasına yanıt olarak üretilir ve GH'nın metabolik fonksiyonlarının bir kısmına aracılık eder. GH hipofiz bezinden dolaşıma salındığında birçok dokuda IGF-1 üretimi artar. Dokularda IGF-1 üretimi artmasıyla dolaşımdaki IGF-1 konsantrasyonu artar ve hipofizden daha fazla GH salgılanmasını inhibe eden bir geri bildirim döngüsü devreye girer (23). Bu faktörlerin dışında büyüme hormonunun sentez ve salınımı; cinsiyet, yaş, fiziksel egzersiz, beslenme durumu gibi çeşitli koşullardan etkilenmektedir (24).

2.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Ailesi

İnsülin benzeri büyüme faktörü ailesi; insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-1, IGF-2), IGF reseptörleri (IGF-1R, IGF-2R) ve IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP 1-6) ve bu proteinlerin proteazlarından oluşur (Tablo 1A). IGF ailesinin oluşturduğu sinyal sistemi ile birçok dokunun büyümesi, gelişmesi ve pek çok hücrenin normal işlevlerini sürdürebilmesi sağlanırken aynı zamanda; hücre proliferasyonu, farklılaşması, migrasyon ve apoptoz da düzenlenir (25).

Tablo 1A: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) Ailesi

IGF	IGF-1, IGF-2
Reseptörler	IGF-R1, IGF-R2 (IGF2/M6P)
Bağlayıcı Proteinler	IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, IGFBP-7*
Proteazlar	**

*Kısmi yapısal benzerlik nedeniyle dâhil edilmiştir. ** (Bakınız: TABLO 1B)

Tablo 1B: Proteolitik aktivite gösterdikleri IGFBP gruplarına göre IGFBP proteazları

Proteazlar	Alt grupları	Substratları
Serin Proteazlar	Prostat spesifik antijen (PSA)	IGFBP-3 ve -5
	γ -nerve growth factor	IGFBP-4 ve -6
Katepsinler	Katepsin -D	IGFBP (1-6)
Metalloproteinazlar	İnterstisyel kollajenaz (MMPs-1)	
	Jelatinaz A (MMPs -2)	
	Jelatinaz B (MMPs-9)	IGFBP-2, -3, -4 ve -5
	Stromelisin -1 (MMPs -3)	
	Disintegrin metaloproteinaz	
	PAPP-A	IGFBP-2, -4 ve -5
	PAPP-A2	IGFBP-3 ve -5
Plazmin		IGFBP-2, -3 ve -4
Trombinler	α -thrombin	IGFBP-3 ve -5

2.2.1. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF)

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-1, IGF-2), hem büyümeyi hem de metabolizmayı kontrol eden çok işlevli IGF ailesinin başlıca üyeleridir. Tek zincirli polipeptit yapısındadırlar. A, B, C ve D işlevsel bölgelerinden oluşurlar. IGF'lerin A ve B bölgeleri sırasıyla, insülinin A ve B bölgeleri ile homologtur ve reseptörlerine bu bölgelerden bağlanırlar. İnsülinde farklı olarak IGF peptitleri prototip olarak bölünmezler ve C bölgeleri ile olgun peptitlere bağlanırlar ayrıca insülinde bulunmayan bir D bölgeleri vardır. C ve D bölgeleri IGF'lerin reseptörlerine seçici bağlanmasında ve bağlanma afinitelerinin belirlenmesinde rol alır (26).

IGF'lerin büyüme üzerindeki aktiviteleri; embriyonik kök hücrelerin çoğalmasını destekleyerek başlar, bu hücrelerin dokuya özgü farklılaşmasını ve normal büyümenin veya yaralanmaların bir sonucu olarak apoptoz veya nekrozu destekleyerek devam eder (27). IGF'lerin büyümeyi uyarması; iskelet kası ve kemik dokusundan, organların ve damarların büyümesine kadar pek çok alanda etkilerini göstermektedir (28). IGF'lerin başlıca sentez bölgesi karaciğerdir ancak karaciğer dışında çeşitli doku ve organlarda da sentezlenirler (27). IGF ekspresyonunda GH ile birlikte; östrojen ve FSH'ı içeren birtakım hormon, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi farklı büyüme faktörleri, cinsiyet, yaş ve beslenme de etkilidir. Aktiviteleri büyüme hormonundan doğrudan etkilenen IGF-1 ve IGF-2, organizmanın farklı alanlarında farklı görevler üstlenmektedirler (28).

2.2.1.1. IGF-1

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 ilk kez 1957 yılında izole edilmiştir (29). İlk önce 'Sülfasyon Faktörü', daha sonra 'Somatomedin C' olarak adlandırılmıştır. Günümüzde ise insüline benzer yapısal özellikleri nedeniyle insülin benzeri büyüme faktörü 1 olarak adlandırılmaktadır (30). IGF-1 geni kromozom 12'ye yerleşmiştir, 7,7

kDa moleköl ağırlığındadır ve yapısında 70 aminoasit bulunur (26). IGF'ler insülinde daha çok proinsülin ile benzerlik göstermektedirler. IGF-1 ile insülin, aminoasit dizilimi açısından yalnızca %7,5 oranında yapısal benzerlik gösterirken IGF-1 ile proinsülin arasındaki yapısal benzerlik oranı %43'tür (31). IGF-1'in doğum öncesi ekspresyonu oldukça düşük gözlenirken yetişkinlik döneminde oldukça yüksektir. Normal şartlar altında IGF-1'in dolaşımdaki seviyesi stabildir ve beslenme gibi çevresel faktörlerden etkilenmez. İnsülin gibi karbonhidrat alımı ile kısa süreli ve ani değişiklikler göstermez (32). IGF'ler insüline benzer olarak protein ve karbonhidrat metabolizması üzerinde anabolik etki göstermektedirler. IGF-1; lipolizi inhibe eder ve adipoz dokuda glukoz seviyelerini düşürür, insülin duyarlılığını artırarak insülin direncine karşı etki gösterir (33). IGF-1'in lenfosit üretimini uyararak bağışıklık sisteminde de rol oynadığı bilinmektedir (34). İlerleyen yaşla birlikte IGF-1'in dolaşım düzeyleri bir miktar azalır; bu durum kas kütleğinde azalmayla ve kemik dokusunda deformasyonla sonuçlanır (35).

IGF-1 normal büyüme ve gelişimde olduğu kadar çeşitli patolojik durumlarda, özellikle tümör oluşumunda ve ilerlemesinde de rol alır. Dolaşımdaki yüksek IGF seviyelerinin prostat, meme, akciğer kanseri gibi çeşitli kanser tipleriyle ilişkili olduğu gözlenmektedir (36).

2.2.1.2. IGF-2

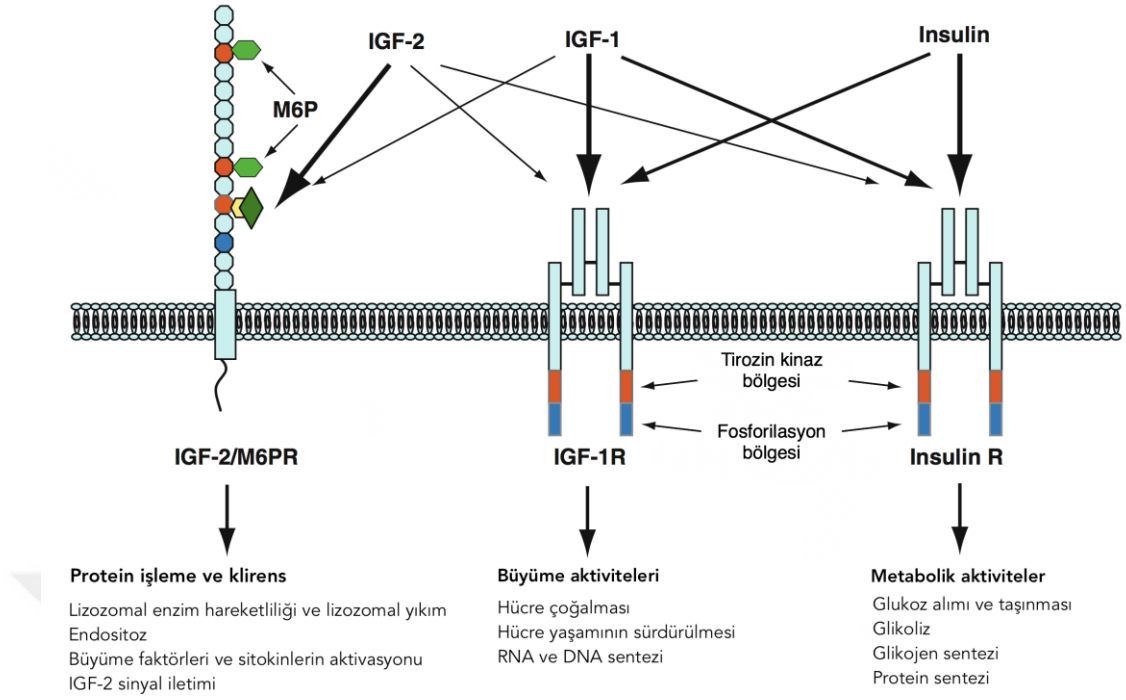
IGF-2; hücre büyümesini ve çoğalmasını düzenleyen bir büyüme faktörü olmasının yanında, büyüme üzerindeki etkilerini ağırlıklı olarak fetal dönemde gösterdiği bilinmektedir (37). 7,4 kDa moleköl ağırlığındadır ve yapısında 67 aminoasit barındırmaktadır (26). Embriyonik ve fetal dönemde ekspresyonu oldukça yüksektir; gebeliğin 2. yarısından itibaren neredeyse tüm dokularda eksprese edilir ve ekspresyonu doğum sonrası giderek azalır. IGF-2 geni, kromozom 11'e yerleşiktir, bir lokusun iki ana alelinden biri eksprese edilir, diğeri ise baskılanmıştır. Eksprese edilen

IGF-2 geni normal embriyonik büyüme için gereklidir. Baskılanmanın herhangi bir nedenle gerçekleşmemesi, aşırı büyümeyi ve çeşitli tümör gelişimlerini beraberinde getirmektedir (37).

IGF'ler büyümeyi uyaran çeşitli aktivitelerini reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirir (37).

2.2.2. İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörleri (IGFR)

IGF-1 ve IGF-2 işlevlerini üç tip farklı IGF reseptörüne bağlanarak gerçekleştirir. Bunlar; IGF-1 reseptörü (IGF-1R), IGF-2/ mannoz-6-fosfat reseptörü (IGF-2R) (IGF2/M6F) ve insülin reseptörüdür (IR) (38). IGF-1R ve IR reseptörlerinin her ikisini de eksprese eden hücrelerde; IGF-1R'nin bir alfa ve bir beta altbirimiyle insülin reseptörünün bir alfa ve bir beta altbiriminin birleşmesiyle oluşan, IGF-1, IGF-2 ve insülininin etkilerine aracılık edebilen hibrit bir reseptör tanımlanmıştır. IGF-1R/IR hibrit reseptörün işlevleriyle ilgili çalışmalar devam etmektedir (39).



Şekil 1. İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörlerinin yapısı ve biyolojik etkilerinden örnekler. (El-Shewy HM, Luttrell LM. Insulin-like growth factor-2/mannose-6 phosphate receptors. Vitam horm 2009; 80:667-697.)

2.2.2.1. IGF-1R

IGF-1'in mitojenik ve metabolik aktivitelerinde esas aracı IGF-2'ye de bağlanabilen IGF-1R'dir (38). İnsan IGF-1 reseptör geni 15. kromozomda bulunur. IGF-1 reseptörleri hücre dışına yerleşik iki özdeş α -altbiriminin ve iki özdeş transmembran β -altbiriminin disülfid bağlarıyla bir araya gelmesiyle oluşan heterotetramer şeklinde bir tirozin kinazdır ve yapısal olarak insülin reseptörlerine benzerlik göstermektedir (40). Bu iki reseptör oldukça benzer bir yapıyı paylaşmakla birlikte farklı işlevler kazanmışlardır. IR esas olarak besin alımından sonra pankreas tarafından salgılanan insülin ile aktive olurken IGF-1R karaciğer, fibroblastlar ve tümör hücreleri dâhil olmak üzere organizmanın birçok bölgesinde üretilir ve IGF'lerin bağlanmasıyla aktive olur (41). İnsülin ve IGF-1 kendi reseptörlerine çok daha yüksek bağlanma afinitesi gösterebilirler ve birbirlerinin reseptörlerine

bağlanabilirler. Plazmada IGF-1'in insüline kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda bulunması teorik olarak IGF-1-IR etkileşimini anlamlı kılar ancak IGF'lerin dolaşımında IGFBP'lere bağlı olarak bulunması, bu ilişkiyi sınırlandırır (42).

IGF-1 ve IGF-2; IGF-1 reseptörünün aracılık ettiği etkilerini gösterebilmek için ilk olarak IGF-1 reseptörüne bağlanır. IGF'ler IGF-1 reseptörüne bağlandığında reseptörün kinaz bölgesinde tirozinlerin otofosforilasyonuna yol açar (43). Fosforile olan tirozinler (insülin reseptör substratı-1)IRS-1, Shc gibi aracı substratların fosforilasyonuna, ardından hücre içi sinyal yollarının başlamasına sebep olur ve mevcut hücresel duruma bağlı olarak; çoğalma, farklılaşma, hücre göçü veya apoptoz gibi çeşitli cevaplarla sonuçlanır (44).

IGF-R1 ekspresyonu neredeyse her doku ve hücrede gerçekleşir (43). IGF-1 ve IGF-2'ye benzer olarak IGF-R1'de çeşitli tümör kaynaklı hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedir. IGF-1 ve IGF-2'nin tümör hücrelerinin bölünmesinin uyarıcı etkilerinin aracısı olan fonksiyonel bir IGF-R1 tümör gelişimi ve ilerlemesi için gereklidir (44).

2.2.2.2. IGF-2R

İnsülin benzeri büyüme faktörü-2'nin etkilerine aracılık eden bir diğer faktör IGF-2R'dir. 1987 yılında moleküler klonlama yöntemiyle yapılan çalışmalarla birlikte, daha önce tanımlanmış iki reseptörün (mannose-6-fosfat ve IGF-2R) aynı molekül olduğunun ortaya çıkmasından sonra bu reseptör IGF-2/M6P reseptörü olarak adlandırılmıştır (38). IGF-2R/M6P reseptör geni 6. kromozom üzerinde konumlanmıştır ve çok fonksiyonlu IGF-2R/M6P reseptörünü kodlar (45). Bu reseptör 250 kDa'luk bir glikoproteini kapsayan, IGF-2, M6P ve lizozomal enzimleri

bağlayabilen birden çok ligand bağlama bölgesi bulunan, hücre zarına yerleşmiş tek zincirli bir polipeptiddir (38).

IGF-2'nin büyümeyi uyaran aktiviteleri genel olarak IGF-1 reseptörü tarafından gerçekleştirilirken, IGF-2R/M6P reseptörü IGF-2'nin lokal seviyelerinin düzenlenmesinde rol alır. IGF-2R/M6P reseptörü IGF-R1'in sahip olduğu hücreler arası sinyal iletim alanlarından yoksundur (38).

2.2.3. İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler (IGFBP)

IGF'ler, dolaşımda ve hücre kültür ortamlarında tanımlanmış 6 farklı bağlayıcı proteinden birine (IGFBP 1-6) bağlı hâlde bulunurlar (7). IGFBP'ler, dolaşımda serbest hâlde bulunamayan protein yapılı IGF'lerin taşınmasında ve korunmasında rol alırken reseptörleri ile olan ilişkilerinin kontrol edilmesini sağlar. IGFBP'ler, IGF'leri proteazlarından korur ve yarı ömürlerini uzatırlar. Dolaşımda serbest IGF'nin yarı ömrü 15 dakika iken IGFBP'lere bağlı IGF'lerin yarı ömürleri 12-15 saate kadar uzamaktadır (46). Molekül ağırlığı yaklaşık 24-50 kDa arasında değişir ve yapılarında 216 ile 289 arası aminoasit bulunur (5).

Altı IGFBP'nin hepsi IGF'leri IGF-R1 reseptörlerinden daha yüksek afinite ile bağlar. IGFBP bağlı IGF'ler reseptörlerine bağlanamaz ve hücrel aktivitelerini gerçekleştiremez. Bu nedenle IGFBP'ler genel olarak IGF aktivitelerini inhibe edici faktörler olarak tanımlanır. Ancak IGF'ler reseptörlerine taşınabilmeleri için IGFBP'lere ihtiyaç duyar. IGF'ler hücre yüzeyine taşındığında ise bağlı bulundukları IGFBP'ler spesifik proteazlar ile parçalanır ve IGF'ler reseptörlerine bağlanır (6). IGFBP-1, -3 ve -4, IGF-I ve IGF-II'yi benzer afinite ile bağlarken IGFBP-2, -5 ve -6, IGF-II için daha yüksek bağlanma afinitesine sahiptir (47).

Bazı veriler IGFBP'lerin belirli aktivitelerinin IGF'lerden bağımsız olarak gerçekleşebildiğini göstermektedir. Bu aktiviteler, IGFBP'lerin migrasyon ve apoptoz gibi süreçleri düzenleyen hücre dışı matriks (ECM) bileşenleri ve integrinler gibi birçok molekülle etkileşim hâlinde olmalarından kaynaklanır (6). Benzer yapıları ve IGF bağlayıcı ortak rollerinin yanında her bir IGFBP farklı moleküllerle birlikte çalışarak hücrede ve organizmada farklı sonuçlara sebep olan birçok farklı rol üstlenmişlerdir (5).

2.2.3.1. IGFBP-1

IGFBP-1'in başlıca aktivitelerinden biri organizmanın IGF-I'in hipoglisemik etkilerinden korunmasıdır. İnsüline bağlı olarak hepatik salgısı düzenlenir. Açlık ve diyabet gibi insanlarda insülin seviyelerinin düşük olduğu durumlarda IGFBP-1 seviyeleri yüksek olarak saptanmıştır (5). IGFBP-1'in bir fibronektin reseptörü olan $\alpha_5 \beta_1$ integrine bağlandığında IGF-1'den bağımsız olarak trofoblast hücrelerinin göçünü uyarması gibi proapoptotik etkileri gözlenmiştir (48).

2.2.3.2. IGFBP-2

IGF aracılı fonksiyonlar üzerinde temel olarak inhibe edici etkilere sahiptir (25). Dolaşımdaki seviyeleri bebekler ve yaşlılarda yüksek, yetişkinlerde ise düşük seviyelerde görülür (5). IGFBP-2, bir fosforilasyon bölgesine sahip olmasına rağmen esas olarak fosforile olmayan formda bulunur (47). Sinir sistemi, periferik doku ve organlardaki IGF aktivitesinin düzenlenmesinde rol alır. Dolaşımdaki IGF'lere bağlanarak etkilerini düzenlemenin yanı sıra, hücre dışı matris bileşenleri ve hücre yüzeyi proteoglikanları ve integrin reseptörleri ile de etkileşim içindedir (49).

2.2.3.3. IGFBP-3

Dolaşımdaki IGFBP'lerin yaklaşık %75'ini IGFBP-3 oluşturmaktadır. IGFBP-3 dolaşımdaki bu yüksek oranıyla, IGF'lerin büyük çoğunluğunu bağlayarak reseptörlerine bağlanmasını engellediğinden aynı zamanda hücre büyümesinin potansiyel bir inhibitörüdür. Dolaşımda IGF 1 ve 2'nin büyük çoğunluğu IGFBP-3 / ALS (acid labile subunit) / IGF'den oluşan üçlü kompleks halinde bulunur (1:1:1 molar oran). ALS ağırlıklı olarak karaciğer hücrelerinde eksprese edilir ve ekspresyonu GH tarafından düzenlenir (50). IGFBP-3; IGF sinyallerinin etkilerinden bağımsız olarak proliferasyon, migrasyon ve apoptoza yatkınlık gibi etkiler göstermektedir. Çeşitli hücre kültürlerinde IGFBP-3'ün IGF olmadan DNA sentezini inhibe ettiği gözlenmiştir. IGFBP-3'ün antiproliferatif etkisinin p53 tümör baskılayıcı geni aracılığıyla kontrol edilmektedir. P53 etkisi ile IGFBP-3 ekspresyonunun indüklenmesi IGF-I'nin mitojenik etkisinin inhibisyonuna yol açmaktadır (51).

2.2.3.4. IGFBP-4

IGFBP-4 ilk kez insan osteosarkoma hücre dizisinde inhibitör işlevleri olan bir IGFBP olarak tanımlanmıştır (52). Gonadlar ve kemikler dahil olmak üzere çeşitli dokularda IGF sisteminin önemli bir bileşenidir. IGF-1 biyoayarlanımını ve anabolik etkilerini düzenler (53). IGFBP-4 geni 17.kromozom üzerine yerleşmiştir, 237 aminoasitten oluşan protein tüm bağlayıcı proteinler arasında en küçüğüdür (54). Dolaşımda glikozile edilmiş veya glikozile edilmemiş formda bulunabilir (55).

IGFBP-4; IGFBP-1,-2,-4 ve -5'e benzer olarak N bölgesinde 6 disülfid bağı ve karakteristik GCGCC motifine, C bölgesinde ise 3 disülfid bağına sahiptir. Diğer IGF bağlayıcı proteinlerden farklı olarak merkezi bağlanma bölgesinde fazladan 2 disülfid bağına ve N-glikosilasyon alanına (ASN204) sahiptir ayrıca C terminalinde konsensüs

heparin bağlanma alanından (HBD) yoksundur (6,56). ALS ile kompleks oluşturmaz. ALS ile kompleks oluşturmayan IGF/IGFBP-4 gibi küçük ikili kompleksler vasküler epitel tabakasını geçebilir ve böylece hedef dokulara IGF'leri ulaştırabilir (57). IGFBP-4 embriyonik dokularda, fibroblastlarda, prostat ve yumurtalık hücrelerinde yaygın olarak eksprese edilir. Konsantrasyonu IGFBP-3'ün serum konsantrasyonunun %10'undan daha azdır (58). Östrojen, FSH, FGF, D vitamini ve retinoic asit gibi faktörler IGFBP-4 ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alırlar (53).

IGFBP-4'ün aşırı ekspresyonu uterus, mesane, kas ve kemik gibi çeşitli dokularda büyümenin azalmasına (59), omurga ve kalçada yaşa bağlı osteoporotik kırıklara neden olabilir (60). IGFBP-4'ün IGF'den bağımsız anti-anjiyojenik ve antitümörjenik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (61). İnsan prostat kanseri, kolon kanseri ve glioblastoma hücreleri gibi histolojik olarak farklı tümör tipleri üzerinde, tümör oluşumunu geciktirici veya inhibe edici etkileri gösterilmiştir (13). IGFBP-4 ayrıca kardiyak rejenerasyon ile ilgili IGF'den bağımsız fonksiyonlara sahiptir. IGF'den bağımsız olarak kalp dokusu oluşumu ve kalp hasarlarının onarılmasında inhibe edici bir yol olan wnt/ β -katenin sinyal yolunun bir önleyicisi olarak çalışır (62). IGFBP-4'ün engellediği Wnt sinyallerinin aynı zamanda çeşitli kanser hücrelerinde hücre sağkalımını ve çoğalmasını desteklemektedir (63). IGFBP-4'ün IGF bağımlı veya bağımsız etkileri spesifik IGFBP-4 proteazları tarafından engellenir. IGFBP-4'ü parçalama fonksiyonu en iyi tanımlanmış proteaz PAPP-A'dır (53).

2.2.3.5. IGFBP-5

IGFBP-3'e benzer şekilde dolaşımdaki IGFBP-5, hem IGF ve ALS ile üçlü kompleks hem de yalnızca IGF'lerle birlikte ikili kompleks halinde bulunabilir. ALS ile oluşturduğu üçlü kompleksler, vasküler epitel tabakasını geçemez ve dolaşımda bir IGF rezervuarı oluşturur (64). IGF-1'e karşı küçük bir afinite farkıyla IGF-2 ye bağlanmayı tercih eder (46). Hücre dışı proteinler ve proteoglikanlarla etkileşime

girerek IGF sinyallerinin etkilerinden bağımsız olarak proliferasyon, migrasyon ve apoptoza yatkınlık gibi etkiler gösterebilir (65).

2.2.3.6. IGFBP-6

IGFBP-6'nın baskın etkisi, IGF-2 aktivitelerinin inhibisyonudur. Yaklaşık 50 kat daha düşük bağlanma afinitesine sahip olduğu IGF-I aktiviteleri üzerinde etkisi yok denebilecek kadar azdır. Dolaşımdaki seviyeleri yaşla birlikte kademeli bir artış gösterir. IGF'ye bağlı veya bağımsız mekanizmalar tarafından hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenler (66).

2.2.3.7. IGFBP-7

Son yıllarda yapılan çalışmalarda bilinen 6 farklı IGFBP ile bağlantılı birçok protein tanımlanmıştır. Bunlardan bir tanesi, IGFBP'lere gösterdiği %30-40 benzerlik oranı ve tüm IGFBP'lerde bulunan karakteristik GCGCC motifine sahip olması nedeniyle IGFBP-7 olarak adlandırılmıştır. IGFBP-7'nin IGF-1'e olan bağlanma afinitesi diğer bağlayıcı proteinlere oranla 100 kat daha düşüktür ve yapısal ve fonksiyonel farklılıkları, diğer IGFBP'lerden ayrılmasına neden olur (67). IGFBP-7'nin farklı kanser tipi hücrelerinde artmış ekspresyonu olumlu prognoz ile ilişkilendirilmiştir ve hücre proliferasyonunu düzenleyen bir tümör baskılayıcı olduğu öne sürülmektedir. Farklı işlevlerinin ve moleküler mekanizmasının açıklığa kavuşması için çalışmalar devam etmektedir (68).

2.2.4. İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinlerin proteazları

Dolaşımdaki serbest IGF düzeyleri, IGF bağlayıcı proteinler ve bu proteinleri parçalayabilme fonksiyonuna sahip proteazlar ile doğrudan ilişkilidir (5). IGF'ler mitojenik ve metabolik etkilerini gösterebilmek için dolaşımda genel olarak bir arada bulundukları bağlayıcı proteinlerinden ayrılmış durumda olmalıdır. Bu ayrılma, aralarındaki yüksek bağlanma afinitesinin azalması yoluyla gerçekleşir. Her ne kadar IGFBP'lerin hücre dışı matriks moleküllerine bağlanması ve IGFBP'lerin fosforilasyonu bu moleküllerin IGF'ler için bağlanma afinitesini azaltsa da IGF-IGFBP ayrılması için 6 farklı bağlayıcı proteinde de tanımlanmış genel mekanizma IGFBP'lerin proteolitik olarak parçalanmasıdır (69).

Farklı potansiyel ve spesifite ile IGFBP proteolizine sebep olan IGFBP proteazları farklı proteaz inhibitörleri kullanılarak birçok biyolojik sıvı içerisinde tanımlanmıştır (Tablo-1B) (5). Tanımlanan ilk IGFBP proteazlarından biri, yapısında reaktif bir serin zinciri bulunan bir serin proteaz olan ve seminal plazmada IGFBP-3 ve -5'i parçalayan, prostat spesifik antijen (PSA)'dir (70). IGFBP'leri parçalama aktivitesi bulunan ve yapısal olarak PSA'ya %65 benzerlik gösteren diğer bir serin proteaz olan 'γ-nerve growth factor' bu etkisini IGFBP-4 ve IGFBP-6 üzerinde gösterir. Katepsinler çeşitli dokularda bulunan lizozomal proteazlardır, pH'ın 4 ile 5.5 arasında olduğu ortamlarda daha aktiflerdir ve birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynarlar. Tanımlanan 6 bağlayıcı preotein (IGFBP (1-6))'e karşı da aktivite gösteren 'Katepsin D'nin parçalayıcı etkisi insan prostat kanseri hücrelerinde gösterilmiştir (5). Metalloproteinazlar katalitik aktiviteleri için metal iyon gerektiren peptid hidrolazlardır. Hepsi birer metalloproteinaz olan; İnterstiyeel kollajenaz (MMPs-1), Jelatinaz A (MMPs-2), Jelatinaz B (MMPs-9), Stromelisin-1(MMPs-3) ve Disintegrin metalloproteinaz etkilerini IGFBP-2,-3,-4 ve -5 üzerinde gösterir (10). IGFBP-4 proteazlardan bazıları, bir veya birkaç IGFBP'yi diğerlerinden daha yüksek parçalama potansiyeline sahip spesifik proteazlardır. Tanımlanan ilk spesifik proteazlardan biri, insan gebeliklerinde aktif olarak bulunan ve seçici olarak IGFBP-4'ü parçalayan gebelikle ilişkili plazma proteini-A (PAPP-A)'dır (71). PAPP-A çinko bağlı bir

metalloproteinazdır, IGFBP-4'e ek olarak IGFBP-2 ve -5'e karşı da proteolitik aktivite gösterir. PAPP-A'nın ayrıntılı incelemesine ilerleyen sayfalardan ulaşılabilir.

PAPP-A2: PAPP-A'nın homologudur ve %45 sekans benzerliği gösterir. PAPP-A ile birlikte metalloproteinazların metzincin süper ailesinin, pappalysin alt ailesini oluşturur. PAPP-A2 bu benzerliğe rağmen IGFBP-4'e karşı aktif değildir, IGFBP -3 ve -5'e karşı proteolitik aktivite gösterir (72). PAPP-A2'nin insan gebeliklerinde ve farelerin vücut büyüklüğünün düzenlenmesinde rol aldığı gözlenmiştir ancak fizyolojik rolü ve önemi tam olarak aydınlatılamamıştır (73). Ek olarak; plazmin ve α -thrombin'inde IGFBP'ler üzerinde proteolitik aktivite gösterdiği gözlenmiştir (5).

2.3. Gebelikle İlişkili Plazma Proteini-A (PAPP-A)

PAPP-A, 1974 yılında gebe kadınların plazmasında bulunan 4 proteinden biri olarak tanımlanmış ve “gebelikle ilişkili plazma proteini-A” olarak adlandırılmıştır (1). 1999 yılında ise IGFBP-4'e karşı seçici ve IGF bağımlı proteolitik aktivitesi keşfedilmiştir (3).

PAPP-A Down sendromlu gebeliklerin taranmasında aktif olarak kullanılmaktadır. PAPP-A maternal serum düzeyi, down sendromlu bebek gebelerinde birinci trimesterde oldukça düşüktür (2). Diğer kromozom anomalileri, preeklampsi, gelişme geriliği ve düşük doğum ağırlığı gibi durumlar da PAPP-A'nın düşük düzeyleriyle ilişkilidir (4). Günümüzde PAPP-A hâlâ IGFBP-4'ün birincil ve en önemli proteazı olarak kabul edilmekle birlikte, PAPP-A'nın gebelik dışında da insan osteoblast ve fibroblastları dâhil olmak üzere, çeşitli dokularda eksprese edildiği ve IGFBP-4'e ek olarak IGFBP-2 ve IGFBP-5'e karşı da proteolitik aktivite gösterdiği bilinmektedir (7).

2.3.1. Yapısı

İnsan PAPP-A geni 9.kromozom üzerinde bulunur (74) ve bu gen 1547 aminoasitten oluşan 200 kDa'luk monomer yapıda bir polipeptidi kodlar (75). PAPP-A, metalloproteinazların metzincin süper ailesinin bir üyesidir (75). Metzincin süper ailesinin tüm üyelerinde ortak görülen çinko bağlayıcı motif (-HEXXHXXGXXH) ve metiyonin dönüşü PAPP-A'da da görülmektedir. Bu ortak yapısal özelliklere ek olarak; çinko bağlayıcı motifi takiben görülen kalsiyum bağlayıcı 3 Lin-nocht motifi (LNR1-3), 5 kısa konsensüs tekrarı (SCR1-5) (Şekil 1) ve hidrofobik valin kalıntısı PAPP-A'yı diğer metzincin alt ailelerinden ayırmış ve bu farklı özelliklerden dolayı PAPP-A, pappalysin alt ailesinin üyesi olmuştur (75). Bu grubun diğer üyesi %45 yapısal benzerlik gösterdiği kendi homologu olan PAPP-A2'dir (72).



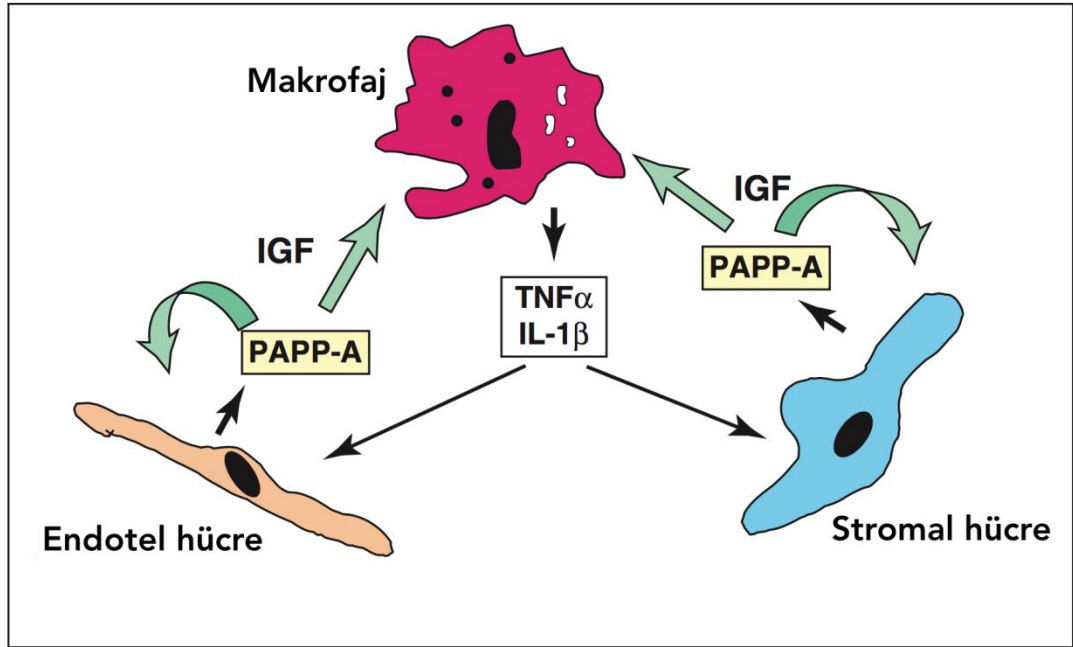
Şekil 2. PAPP-A'nın monomer yapısı (Boldt HB, Overgaard MT, Laursen LS, Weyer K, Sottrup-Jensen L, Oxvig C. Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): Classification as a metzincin. Biochem J, 2001, 358.2: 359-367)

Proteolitik olarak aktif PAPP-A, iki özdeş PAPP-A monomerinden oluşan homodimer yapıdadır. Gebelik serumunda genel olarak ($\approx$ %99) iki PAPP-A monomeri, iki proMBP (proform of eosinophil major basic protein) ile disülfat bağı kurarak (2:2) kompleks heterotetramerik yapıda bulunur. Bu kompleks oluşumu altbirimler arası spesifik bağların yeniden düzenlenmesini içerdiğinden PAPP-A tüm substratlarına karşı geri dönüşümsüz bir şekilde inaktif hâle gelir (76). Dolaşımdaki PAPP-A seviyesi insan gebeliklerinde yaklaşık 10.000 kat artmış durumdadır (77)

ancak PAPP-A aktivitesi proMBP ile kompleks hâlde bulunmayan bir miktar aktif PAPP-A'dan kaynaklanır (76).

2.3.2. Düzenlenmesi

PAPP-A; insan osteoblastları ve fibroblastlar'ı ile birlikte plasental doku akciğer hücreleri ve granüloza hücreleri dâhil olmak üzere, birçok hücre ve dokuda eksprese edilir (4).



Şekil 3. PAPP-A'nın sentez ve salınımının düzenlenmesi. Makrofajlar, PAPP-A ekspresyonunu uyaran proinflamatuvar sitokinleri salgılar. Proinflamatuvar sitokinler endotel ve stromal hücrelerden PAPP-A sentezini uyarır. PAPP-A, üretildiği hücrelerde otokrin, makrofajlar tarafından bağlanarak parakrin etkilerini gösterir.

(Conover CA. Key questions and answers about pregnancy-associated plasma protein-A. Trends Endocrinol Metab 2012; 23(5):242-249.9)

PAPP-A ekspresyon seviyeleri makrofajlar tarafından salgılanan çeşitli proinflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenir. Makrofajlar tarafından salgılanan sitokinlere yanıt olarak bölgesel endotel ve stromal hücreler tarafından salgılanan

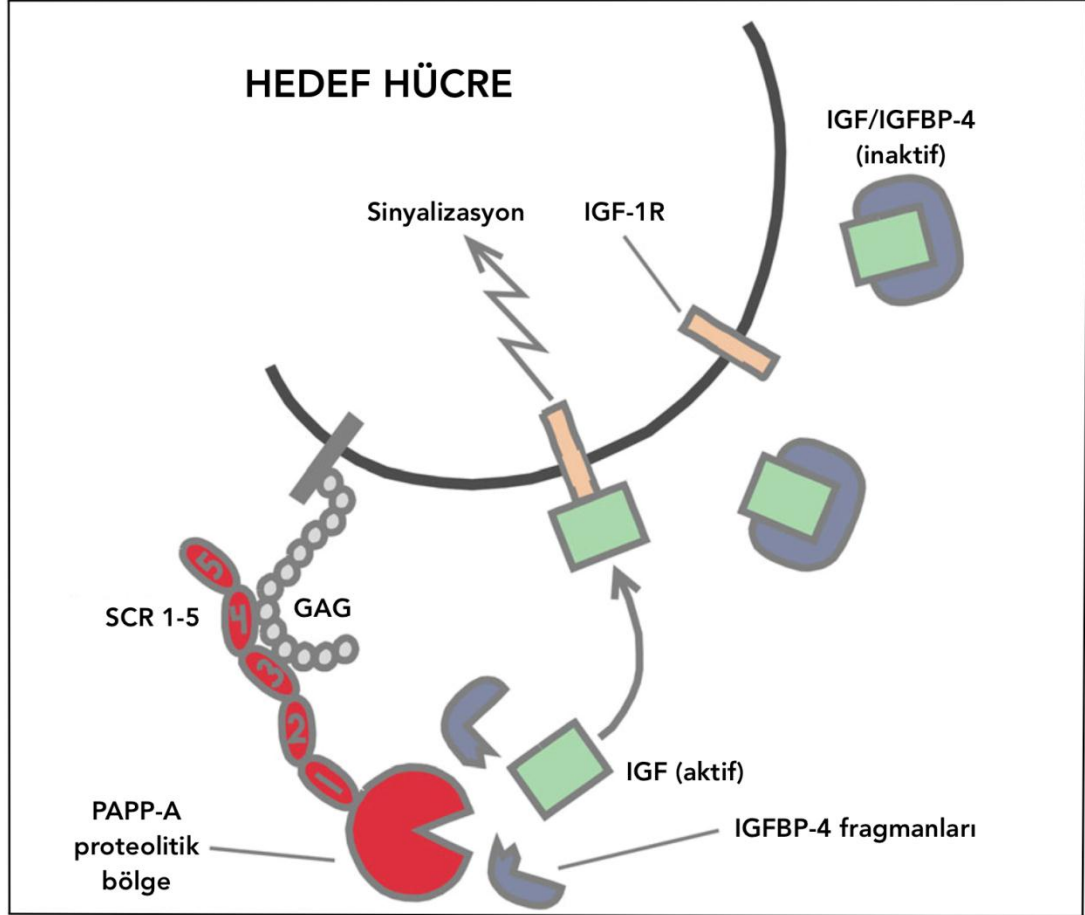
PAPP-A, üretildiği hücrelerde otokrin ve yine makrofajlar tarafından bağlanarak parakrin etkilerini gösterir (4) (Şekil 4). İnsan fibroblastlarında, insan koroner arter ve düz kas hücrelerinde PAPP-A ekspresyonunun en güçlü uyarıcıları, hasar onarımında yer alan proinflatuar sitokinler olan tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve interlektin (IL)-1 β 'dir. Bir başka proinflatuar sitokin olan IL-6, transforme edici büyüme faktörü-b (TGF- β) ve hücre içi siklik AMP'yi arttıran ajanlar (forskolin, prostaglandin E2) oksidatif stres ve doku hasarına karşı PAPP-A ekspresyonunu uyarır (4). Genellikle stres tepkileriyle ilişkili olan nükleer faktör (NF) κ B ise bu sistemde sitokinler ile uyarılan PAPP-A gen ekspresyonunun düzenlenmesine aracılık eder (78). Buna karşılık anti-inflatuar özelliklere sahip olan interferon- γ (INF- γ) (79), kardiyovasküler sistem üzerinde yararlı etkileri olduğu iddia edilen ve yine bir anti-inflatuar ajan olan resveratol ve bir antioksidan olan N-asetil sistein, PAPP-A ekspresyonu üzerinde inhibe edici etkiler gösterir (7).

2.3.2.1. Enzimatik aktivitesi

PAPP-A, 3 farklı IGF bağlayıcı proteini tek bir noktadan (IGFBP-4'ü Met135-Lys136, IGFBP-2'yi Gln165-Met166, IGFBP-5'i Ser143-Lys144 aminoasitleri arasından) bölerek proteolitik aktivitesini gerçekleştirir (6). Bu bölünme IGFBP'lerin N- ve C- terminal bölgelerinin IGF'ler için afinitesini azaltarak IGF'lerin IGFBP'lerden ayrılmasını sağlar (80).

PAPP-A, biyolojik rolü ve konumuna bağlı olarak büyümeyi uyararak bir enzim olarak çalışır (80). PAPP-A, IGFBP'ler üzerinde proteolitik aktivitesini hücre yüzeyine bağlı bir şekilde gerçekleştirir ve IGF'leri yine hücre yüzeyine bağlı hâlde bulunan IGF reseptörlerine yakın bir noktada serbest bırakır. Bu durumda hücre yüzeyi, IGF'lerin reseptörlerine doğrudan bağlanmasını sağlayan ve reseptör aktivasyonunu artıran bir merkez görevi görür. Böylece aktif ve serbest IGF'ler reseptörlerine hızlı bir bağlanma gerçekleştirebilir (9). Aynı zamanda IGF

reseptörlerine yakın olarak gerçekleşen bölünme, diğer IGFBP'lerin devreye girip IGF'leri bağlama potansiyelinden dolayı ayrı bir önem taşır (80).



Şekil 4. PAPP-A'nın IGFBP-4'e karşı proteolitik aktivitesi. PAPP-A, SRC3 ve SRC4 modülleri aracılığıyla, hücre yüzeyindeki glikozaminglikanlara (GAG) bağlanır. Hücre yüzeyine bağlanan PAPP-A proteolitik olarak aktiftir. IGFBP-4 tarafından tutularak taşınan inaktif IGF, PAPP-A'nın IGFBP-4'ü parçalamasından sonra serbest kalır ve aktif hâle gelir. Aktif IGF hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak hücre içi sinyal yollarını başlatır. (Oxvig, C. The role of PAPP-A in the IGF system: Location, location, location. Journal of cell communication and signaling 2015; 9(2):177-187)

PAPP-A, IGFBP-4'ün proteolizinden sorumlu olan enzim olarak tanımlanmıştır. PAPP-A'nın IGFBP-4 proteazına sebep olarak lokal IGF seviyelerini artırdığı gözlenmiştir (81). IGFBP-4'ün PAPP-A ile degradasyonu birçok yönüyle kendine özgüdür. IGFBP-4'ün PAPP-A ile bölünebilmesi için IGF-1 veya IGF-2'ye bağlı

olmalıdır. IGFBP-4/IGF kompleksine karşı PAPP-A yüksek kinetik afiniteye sahiptir. IGF yokluğunda ise PAPP-A ile IGFBP-4 bölünmesi için kinetik afinite yok sayılabilir düzeydedir. Bu sıkı IGF bağımlılığı PAPP-A'nın IGFBP-4'e karşı aktivitesine özgüdür (80). Bu bölünme için PAPP-A'nın 3 LNR modülünün hepsi kalsiyum bağlar. Bu kalsiyum bağlantılarından biri bozulduğunda IGFBP-4'e karşı aktivite tamamen kaybolurken IGFBP-5'e karşı aktivite değişmez (82).

2.3.2.2. Enzimatik aktivitesinin inhibisyonu

Pappalysinler matriks metalloproteinazların bir alt grubudur ancak metalloproteinazların doku inhibitörleri PAPP-A'ya karşı inhibe edici etki göstermez (83). Yakın zamanda PAPP-A aktivitesini inhibe edici özelliği keşfedilen stanniocalcin (STC)'lerden önce PAPP-A'nın bilinen tek fiziksel inhibitörü proMBP idi. STC-2 (84) PAPP-A ile kovalent bir yapı oluşturarak, STC1(85) ise bağlanma afinitesine etki ederek PAPP-A'nın IGFBP-4'e karşı aktivitesini inhibe etmektedir. STC-2/PAPP-A kompleksinin artması lokal olarak IGF sinyallerini azaltır. STC-2 knockout farelerin diğerlerinden %15 daha büyük olduğu (84) ve STC-2'nin aşırı ekspresyonunun fare büyüklüklerinde %45 azalmaya neden olduğu (86) gözlenmiştir. Ayrıca PAPP-A'ya karşı geliştirilen monoklonal ve poliklonal antikorlar IGFBP-4 bölünmesini inhibe edebilir (14).

Substrat spesifitesinin bölünme bölgesini çevreleyen aminoasitler tarafından hatta bölünme bölgesine uzak bazı aminoasitler tarafından etkilendiği düşünülmektedir. IGFBP-4'e yapısal benzerlik gösteren peptitlerin PAPP-A substratı olabilmesi için lizin-20 (Lys-20) dâhil olmak üzere, bölünme alanının N-terminal bölgesinde en az 16-17 kalıntı barındırması gerekir (87).

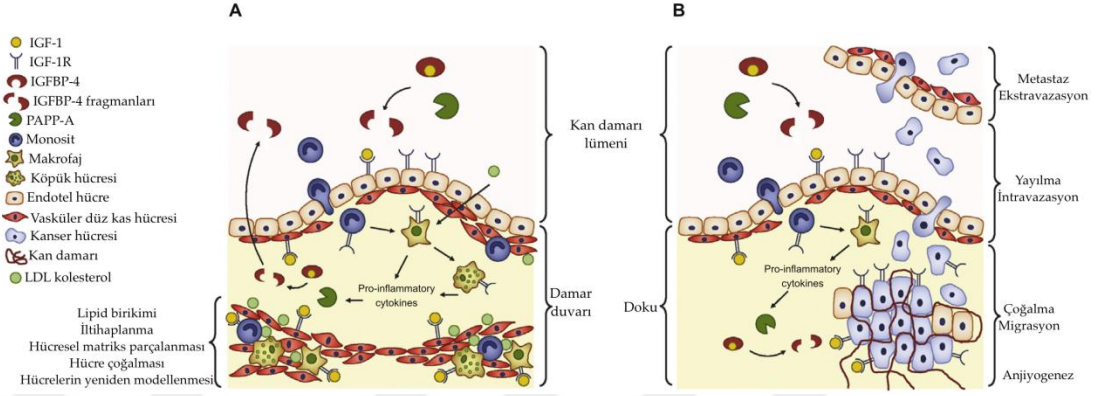
2.3.4. Biyokimyasal etkileri

PAPP-A ekspresyonunun insanlarda başta sağlıklı plasental gelişimde olmak üzere (88); yaraların iyileşmesi sürecinde (89), kırık onarımında (90), dejenere olmuş intervertebral disklerde (91), stabil olmayan aterosklerotik lezyonlarda ve tümör hücrelerinde arttığı bildirilmiştir (74). PAPP-A'nın aşırı eksprese edilmesinin iskelet kasında kütle ve kemik oluşumunda artışına neden olduğu gözlenmiştir (4, 92). PAPP-A knockout fareler büyüme eksikliği göstermektedir (93). PAPP-A'dan yoksun fareler yaşamlarını sürdürebilir ancak IGFBP-4 konsantrasyonlarında artışa ve dolayısıyla serbest IGF seviyelerinde azalmaya yol açar ve bu durum büyüme eksikliğiyle sonuçlanmaktadır (94).

PAPP-A, normal büyümeyi destekleyen etkilerini hastalıklı doku ve hücrelerin büyümesinde de gösterir (74). Son yıllarda PAPP-A, ilerleyen yaşla ve yaşa bağlı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (95). Yapılan çalışmalar PAPP-A'nın diyabet, astım, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser patolojisindeki yerini ve önemini vurgulamaktadır (74).

PAPP-A ilk kez patolojik olarak ateroskleroz ile ilişkilendirilmiştir ve PAPP-A'nın artmış ekspresyonu stabil olmayan insan plaklarında gösterilmiştir (74). İnsan aterosklerotik plaklarda aşırı PAPP-A ekspresyonunun gösterilmesinden sonra akut koroner sendromlu hastalarda da benzer PAPP-A seviyeleri gözlenmiştir (96). PAPP-A'nın aterosklerotik plaklarda endotelial hücreler tarafından bolca eksprese edilmesi, makrofajlar tarafından eksprese edilen TNF- α VE IL-1 β seviyeleri ile ilişkilidir (95). İmmün hücreler tarafından salgılanan proinflammatuar sitokinler, PAPP-A üretimini uyarak IGF aktivitesinin artmasına ve makrofaj istilasını artırarak aterosklerotik plak oluşumuna katkıda bulunur (Şekil 5A) (74). PAPP-A'nın plak oluşum ve ilerleme sürecini hızlandırması, PAPP-A'nın işlevini hücre yüzeyine yakın bölgelerde gerçekleştirmesi ile ilişkilidir. Bu ilişkiyi incelemek için oluşturulan bir modelde; aşırı

PAPP-A eksprese eden farelerde, PAPP-A'nın hücre yüzeyine bağlanma kabiliyetinin ortadan kaldırılmış ve lezyon gelişiminin etkili bir şekilde zayıflamıştır (97).



Şekil 5A. PAPP-A'nın aterosklerotik plak oluşumuna etkisi. IGFBP-4'ün PAPP-A ile proteoliziyle serbest kalan IGF-1 reseptörlerine bağlanarak sinyal yollarını uyarır. Damar duvarına doğru sürekli yeni hücrelerin ilerlemesi ve yerleşik hücrelerin yetersiz apoptozu nedeniyle hücreler damar duvarında birikir. İmmün Monositler doku içerisine alınarak makrofajlara dönüşür ve çok sayıda lipid damlacığını içerisine alarak makrofaj köpük hücrelerini oluşturur. Hücrelerin PAPP-A üretimini uyarıcı pro-inflammatuar sitokinleri salgılaması makrofaj akınına daha da artıran IGF aktivitesini artırır. Bu süreç plak destabilizasyonu ve arter tıkanıklığıyla sonuçlanır. (Hjortebjerg R. IGFBP-4 and PAPP-A in normal physiology and disease. Growth Horm IGF Res 2018; 41:7-22.)

Şekil 5B. PAPP-A'nın tümör gelişimine etkisi. PAPP-A aktivitesi sonucu serbest kalan aktif IGF-1 tümör büyümesinin çeşitli fazlarını uyarır. PAPP-A'nın kaynağı dolaşımdaki PAPP-A veya komşu hücreler olabileceği gibi, tümör hücreleri tarafından lokal olarak da üretilir. Damar oluşumu tümör büyümesine katkıda bulunur. Tümör hücreleri komşu dokulara yayılabilir veya uzak bölgelere metastaz yapabilir. (Hjortebjerg R. IGFBP-4 and PAPP-A in normal physiology and disease. Growth Horm IGF Res 2018; 41:7-22.)

2.4. IGF-1, IGFBP-4 ve PAPP-A'nın Kansere ilişkisi

Son yıllarda yapılan biyokimyasal ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler; IGF ailesinin (ligandlar, reseptörler, bağlayıcı proteinler ve proteazlar) çeşitli tümör tiplerinin başlangıcında, gelişiminde, ilerlemesinde ve metastazında rol oynadığını göstermektedir (98). IGF ailesinin etkileri güçlü bir şekilde birbirine bağlıdır ve aralarındaki etkileşimin herhangi bir aşamasındaki herhangi bir düzenleme,

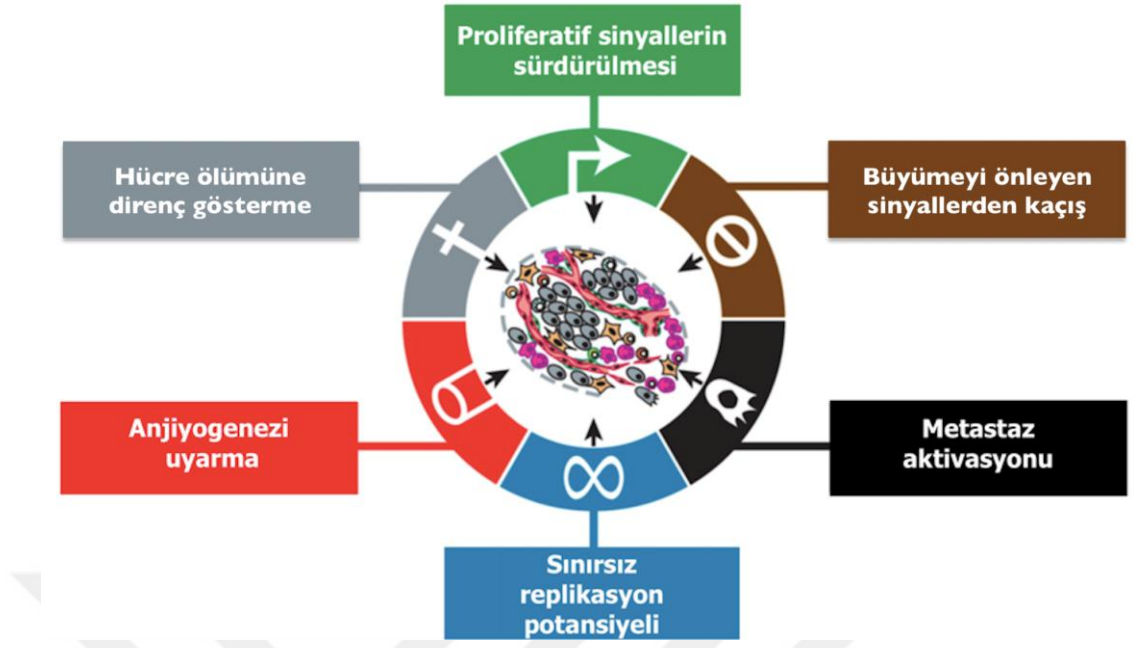
kanser oluşumuna neden olan patolojik duruma yol açabilir (12). Normal hücrelerin malign türevlere dönüşümü temel olarak onkojenik mutasyonlarla başlatılsa da IGF'lerin hücre proliferasyonu, klonal büyüme, göç ve hücre zarlarından istila dâhil olmak üzere, tüm tümör aşamalarının önemli düzenleyicileri olduğu gösterilmiştir (12). Çeşitli tümör kaynaklı hücreler tarafından yüksek düzeyde eksprese edilen IGF-1 ve IGF-2; IGF-R1 aktivitesi yoluyla hücre bölünmesinin otokrin uyarıcıları olarak işlev görür (10). IGF ailesini kanserle ilişkilendiren ilk çalışmalardan biri IGF-R1'den yoksun fare embriyo fibroblastlarının malign transformasyona karşı dirençli olduğunu göstermektedir. Fonksiyonel bir IGF-IR'nin varlığının tümör oluşumu için gereklidir (99).

IGFBP-4 (11) ve PAPP-A (9)'nin de çeşitli tümör kaynaklı hücreler tarafından yüksek düzeyde eksprese edildiği bilinmektedir. IGFBP-4, IGF aktivitelerini inhibe ederek tümör büyümesi regülasyonunda rol alır. PAPP-A ve kanseri ilişkilendiren çalışmalarda PAPP-A, potansiyel bir onkojen olarak karşımıza çıkmakta ve bazı kanserlerde geçici olarak artış gösterirken bazılarında sürekli olarak eksprese edilmektedir (100). İnsanlarda PAPP-A'nın meme (15), böbrek (16), yumurtalık (17) ve akciğer (101) gibi çeşitli kanser türleriyle ilişkili olduğu gözlenmiştir. PAPP-A immün boyaması ile PAPP-A'nın evre 1 meme kanserinin bağımsız bir belirteci olabileceğini öne süren ve PAPP-A ile kanser arasındaki bağlantıyı gösteren ilk çalışma, PAPP-A'nın proteolitik aktivitesinin keşfinden önce yayınlanmıştır (102). PAPP-A serum seviyeleri akciğer kanserli hastalarda yükselmektedir (18). İnsan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatlarının (NSCLC) PAPP-A ekspresyonu, sağlıklı insan bronşiyal epitel hücre hatlarından (HBE) önemli ölçüde yüksek olarak ölçülmüştür (20). PAPP-A ekspresyonu koşullu olarak düşürüldüğünde tümör büyümesinin azaldığı ve PAPP-A'ya karşı inhibe edici monoklonal antikor uygulandığında IGFBP-4 proteolizini azaldığı ve tümör büyümesini inhibe olduğu gözlenmiştir (14). Aşırı PAPP-A eksprese eden akciğer kanserinde, mitotik hücrelerde artma ve apoptozda azalma gözlenmektedir (20).

PAPP-A'nın kanser patolojisine olan etkisinin pek çok çalışmayla desteklenmesiyle bu alandaki çalışmalar artarak devam etmektedir.

2.5. Kanser

Kanser, doğal seyri ölümcül olan neoplastik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (103). Düzensiz hücre büyümesi ve hücrelerin kaynak noktasından vücudun diğer bölgelerine yayılması ile karakterize olmuş bir hastalık grubudur. Bu hastalık grubu 100'den fazla kanser çeşidini barındırmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tahminlerine göre 2015 yılında kanser, 172 ülkenin 91'inde 70 yaşından önce birinci veya kardiyovasküler hastalıkları takiben ikinci ölüm nedenidir (103). Kanser insidansı ve mortalite dünya çapında hızla artmaktadır. Popülasyonun artması ve yaşlanması, sosyoekonomik gelişmelere bağlı olarak kanser için temel risk faktörlerinin yaygınlaşması (obezite, kadınlarda sigara kullanımının artması, endüstriyel olarak karsinojen kullanımının artması vb.) kanser insidansı ve mortalitedeki artışın altında yatan sebeplerden bazılarıdır (104). Türkiye kanser insidansı, erkeklerde dünya insidansının üzerinde seyrederken kadınlarda bir miktar daha düşüktür (105). Genellikle hücrede normal olarak meydana gelen bazı kimyasal reaksiyonların veya sigara kullanımı, radyasyona maruz kalma gibi dış etkenlerin bir sonucu olarak edinilen DNA mutasyonlarının sebep olduğu kanser genetik bir hastalıktır (106). Bu mutasyonlar, kanserin karakteristiği olan bir dizi özelliğin kazanılmasına sebep olur. Hanahan ve Weinberg (107) 2000 yılında neredeyse tüm kanser tipleri için geçerli olan ve vücutta kanser gelişimine sebep olan karakteristik özellikleri belirli başlıklar altında toplamışlardır. 2011 yılında ise bu özelliklere bağışıklık sisteminden kaçış ve vücudun enerji metabolizmasının kanser gelişimine uygun olacak şekilde yeniden programlanmasını ve bu özelliklerin kazanılmasına da genom karasızlığı ve tümörü uyaran inflamasyonların neden olduğunu ekleyerek konseptlerini genişletmişlerdir (108).



Şekil 6. Kanser gelişmesine neden olan karakteristik özellikler. (Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011;144(5):646.)

Kanserin kaynağı vücuttaki herhangi bir doku veya organ olabilir. Kanseler ortaya çıktığı doku tipine veya birincil bölgelerine (kanserin ilk geliştiğı bölge) göre sınıflandırılırlar. Kanser histolojik olarak 6 ana kategoride gruplandırılmıştır: karsinom, sarkom, miyelom, lösemi, lenfoma ve karışık tipler. Kanseler ayrıca kanserin geliştiğı birincil bölgelerine göre adlandırılırlar. Bu sınıflandırmalar, kanseri yalnızca belirli gruplar altında toplamaktadır (109). Kanselerin detaylı olarak sınıflandırılması için dünya genelinde büyük ölçüde kullanılan ‘Onkoloji için Uluslararası Hastalıklar Sınıflandırma sistemi’ (ICD-O) geliştirilmiştir (110).

2.5.1. Akciğer kanseri

Akciğer kanseri, dünya genelinde yılda 2.1 milyon yeni tanı ile (tüm vakaların %11.6’sı) en yaygın kanser türü olmakla birlikte, yılda 1.8 milyon ölümle kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (tüm vakaların %18.4’ü). Akciğer kanseri için

en yaygın etiyoloji; batı popülasyonları ve ABD gibi gelişmiş ülkelerde vakaların %80'den fazlasına neden olan tütün kullanımıdır (103). Pasif içicilik de dâhil olmak üzere, tütün maruziyetinin yoğunluğu ve süresi, sigaraların türü ve soluma derecesi tütün maruziyetinin düzeyini belirler. Risk genel olarak sigara içme oranı ve süresi (paket/yıl) ile belirlenir (111). Sigara içmeyenlere göre ağır sigara içicilerinde risk 60 kata kadar artar. Akciğer kanseri gelişme riski sigarayı tamamen bırakmayı takiben 10-20 yıl içinde hiç içmeyenlerin düzeyine yaklaşır. Sigara kullanımını takiben; çevre kirliliği, hava kirliliği, mesleki karsinojenler, beslenme, viral enfeksiyonlar ve diğer akciğer hastalıkları, akciğer kanseri gelişiminin altında yatan diğer faktörlerdendir. Evlerde yakıt olarak kömür kullanılmasından kaynaklanan emisyonlar dâhil olmak üzere; dizel egzoz gazı, radon, asbest, polisiklik aromatik hidrokarbonların karışımı, silika ve iyonize radyasyona maruziyetin akciğer kanseri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (112).

Primer akciğer kanserlerinin büyük çoğunluğu bronş epitelinden köken almaktadır. Aşamalı olarak gelişen genetik ve moleküler değişikliklerin bir sonucu olarak benign bronş epitelinin neoplastik dokuya transformasyonu gözlenir (113). Bu değişiklikler genel olarak tahmin edilebilir bir sıralamayla gerçekleşmektedir. Akciğer kanserinin çok erken döneminde gerçekleştiği varsayılan kromozom 3p'de materyal kaybı ve tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu akciğer kanseri olan kişilerin kanserli dokuları haricindeki dokularda veya akciğer kanseri olmayıp tütün maruziyeti yüksek olan kişilerin bronş epitellerinde gözlenmiştir (114). Akciğer kanseri oluşumuna zemin hazırlayan bu erken dönem mutasyonları suskun bir şekilde yıllar boyunca var olabilir. Kanser gelişimine elverişli hâle gelmiş bu gibi dokularda ilave mutasyonların gelişmesi akciğer kanserine neden olur (112). Diğer kanser türlerinde olduğu gibi akciğer kanseri oluşumunda da onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu rol oynamaktadır. Akciğer kanser hücreleri aynı zamanda; mutasyon, amplifikasyon, insersiyon, delesyon ve translokasyon gibi pek çok kromozomal anomaliler de barındırmaktadır (115).

Akciğer kanserinde genel olarak uygulanan tanısal işlemler; semptom ve bulgularla birlikte, fiziksel muayene, radyolojik incelemeler, balgam sitolojisi, biyopsi ve bronkoskopidir. Akciğer kanseri sessiz ve sinsi bir şekilde ilerler ve hastaların çoğunluğu ancak hastalığın ileri evrelerinde teşhis edilebilmektedir. Akciğer kanseri, çoğunlukla göğüs radyografisinde anormal bir gölgelenmeyle ya da yeni ortaya çıkan veya karakter değiştiren klinik bulgular ve semptomlar ile teşhis edilir (112). Semptomlar genel olarak kanserin göğüs duvarına veya lenf yoluyla sinirler ve diğer organlara tutulumuyla ortaya çıkar ve semptomlar ortaya çıkmadan önce hastalık cerrahi yollarla çıkarılamayacak şekilde yayılmış olur. En sık görülen klinik bulgu ve semptomlardan bazıları; öksürük, kilo kaybı, hemoptizi, nefes darlığı, göğüs ağrısı ve kuvvet kaybıdır (116). Akciğer kanseri, hücre içi heterojenliğe yol açan farklı moleküler özellikteki hücrelerden oluşan bir hastalıktır. Tümör içinde artmış heterojenite, tümör gelişimi sırasında erken dönemde metastaz eğilimine sebep olur (117). Akciğer kanserli hastaların yaklaşık olarak yarısında tanı anında uzak metastazlar, 1/4'ünde ise lenf nodlarına metastaz gözlenir (118). Uzak metastazların en sık olduğu bölgeler kemikler, karaciğer, beyindir (119). Akciğer kanserinin tüm evreleri birlikte değerlendirildiğinde 5 yıllık sağ kalma oranı yaklaşık olarak %20, metastaz yapmamış olgularda ise 5 yıllık sağ kalma oranı yaklaşık %45'tir (120).

Mevcut tanı yöntemlerine ek olarak kullanılabilecek biyobelirteçler hastalığın erken dönemde tanısı, tümörün metastaz durumu ve prognozunu tayini için önem taşımaktadır (121). Bu moleküllerin üretimi sağlıklı hücrelerde de bir miktar görülmekle birlikte çeşitli kanserlerde artmaktadır. Bu artış spesifik kanserlere özgü değildir ancak serum, plazma ve tükürük gibi vücut sıvılarında ölçümlerin yapılabilmesi klinik olarak kullanımını kolaylaştırmaktadır (121). Bu belirteçlere örnek olarak; Nöron Spesifik Enolaz (NSE)'in küçük hücreli akciğer kanseri, CYFRA-21-1'in küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), CA-125'in ise adenokarsinom hastalarında serum düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir (122).

2.5.2. Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması

Akciğer kanseri histolojik olarak farklı hücre düzenleri ve tedavi stratejileri nedeniyle küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Büyüme hızı, kemoterapi ve radyoterapiye verilen yanıtlar bu sınıflandırmada dikkate alınmıştır. Akciğer kanserleri, akciğer tümörögenezini harekete geçiren ve sürdüren farklı genetik ve moleküler değişikliklere göre alt gruplara ayrılmaktadır (109).

2.5.2.1. Küçük hücreli akciğer kanseri

Küçük hücreli akciğer kanserleri dünya genelinde tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %15'ini oluşturur. Akciğer kanserlerinin küçük bir oranını temsil etse de daha hızlı büyümesi, daha erken metastaz yapması ve hastalığın tekrarlama ihtimalinin yüksek olması sebebiyle en agresif olanıdır (123). Santral lokalizasyonlu kitleler olup lenf nodlarına erken tutulum gösterirler. Nekroz yaygındır ve mitotik hız tipik olarak yüksektir. Tümör hücreleri küçük boyutu, yetersiz sitoplazması ve nükleol yokluğu ile küçük biyopsilerde ve sitoloji örneklerinde belirgin şekilde teşhis edilebilir (109). Küçük hücreli akciğer kanserlerinin tamamına yakınında Rb mutasyonları gözlenir. Rb'nin hipofosforile edilmiş aktif formu, G1 / S faz geçişi boyunca ilerlemek için gerekli olan transkripsiyon faktörlerini ve diğer hücrel proteinleri düzenler. TP53 inaktivasyonu, histon modifikasyonlarına yol açan CREBBP ve multipl endokrin neoplazisi 1 (MEN) mutasyonları gözlenir (124, 125).

Tütün kullanımıyla en güçlü birliktelik skuamöz hücreli akciğer kanseriyle birlikte küçük hücreli akciğer kanserlerinde görülür. Neredeyde tüm SCLC (küçük hücreli akciğer karsinomu)'ler tanı sırasında metastaz yapmıştır ve dolayısıyla cerrahi müdahale ile tedavi elde edilemez. Kemoterapi tek başına veya radyoterapi ile birlikte uygulanır (126).

2.5.2.2. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %80'ini oluşturmaktadır. Genel olarak üç ana grupta toplanmıştır. Bunlar; adenokarsinom, skuamöz (yassı) hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomdur (127). Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomları ilk evrelerinde kemoterapiye yetersiz yanıt verir ve cerrahi müdahale ile daha iyi tedavi edilir. İleri evrelerde kemoterapi ve radyoterapi uygulanır (128).

Tablo 2: Akciğer kanserinin histolojik tiplerinin dağılım ortalamaları

Histolojik tip	%
Küçük hücreli	15
Küçük hücreli dışı	80
Skuamöz hücreli karsinom	30
Adenokarsinom	40
Büyük hücreli karsinom	10
Diğer*	5
Toplam	100

* Malign epitelyal tümör, malign epitelyom, mukoepidermoid karsinom, sarkom, malign soliter fibröz tümör, karsinosarkom

2.5.2.2.A. Adenokarsinoma

Akciğer adenokarsinomları genellikle periferik yerleşimlidir. Genel olarak diğer tiplerden daha yavaş büyür ve daha küçük kitleler oluşturur. Erken evrede metastaz yapma eğilimindedir (112). Kadınlarda, sigara içmeyenlerde veya eskiden çok hafif tütüne maruz kalan kişilerde en sık görülen akciğer kanseridir (129).

Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR) ve kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) mutasyonları, iki bağımsız onkojenik yolun varlığını gösteren, özellikle akciğer adenokarsinomlarında sıklıkla gözlenen mutasyonlardır (130). EGFR aktivasyonu, RAS /RAF/ mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve fosfatidilinositol-3-kinaz gibi hücre sinyal yollarının aktivasyonu ile proliferasyon, apoptozun bloke edilmesi, farklılaşma ve istila sinyallerine neden olur (131). Adenokarsinomlarda gözlenen diğer mutasyonlardan bazıları; İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (ERBB2), Mezenkimal epitelyal geçiş geni (MET) (132) mutasyonları ile anaplastik lenfoma kinaz (ALK) ve ROS1 (133) genini içeren kromozomal değişikliklerdir.

2.5.2.2.B. Skuamöz hücreli akciğer kanseri

Skuamöz hücreli karsinomlar bronşlardaki metaplastik skuamöz epitelden köken alırlar ve santral lezyonlar olarak belirirler. Squamöz inci oluşumu ve hücre keratinizasyonu morfolojik olarak diğer tiplerden ayırt edilirler (134). Skuamöz metaplazi veya displazi bronşiyal epitelde oluştuğundan sonra yıllar boyunca karsinoma in situ şeklinde kalabilir; ardından küçük bir neoplazi hastalığı semptomatik evreye taşır (112). Hastaların büyük çoğunluğu hastalık teşhis edildiği esnada mevcut olarak veya henüz yeni bırakmış ağır sigara içicileridir. Kanser Genom Atlası (TCGA), skuamöz hücreli akciğer kanserini genetik olarak bütün karsinogenezinden beklenen genomik görüntü ve yüksek mutasyon oranıyla karakterize eder. Akciğer adenokarsinomuyla karşılaştırıldığında skuamöz hücreli karsinomun genomik görüntüsü, bütün maruziyetiyle ilişkili küçük hücreli akciğer kanserine daha fazla benzemektedir. Skuamöz hücreli akciğer kanseri %90'ın üzerinde yoğun bütün maruziyetine sahip hastalardan oluşmaktadır (135).

Skuamöz hücreli akciğer kanseri vakalarında en sık görülen genomik değişiklikler TP53 ve CDKN2A delesyonları ile PI3K / AKT sinyallerinde rol oynayan bir veya daha fazla gende somatik değişikliklerdir (136).

2.5.2.2.C. Büyük hücreli akciğer kanseri

Akciğer kanserlerinin skuamöz veya glandüler farklılaşma göstermeyen bir türüdür (137). Akciğer kanserlerinin arasında en nadir görülen histolojik tipidir. Periferik yerleşim gösteren büyük hacimli tümörlerdir. Belirgin nükleollü büyük hücrelerden oluşurlar. Sitoloji numunelerinde teşhis edilmesi zordur. İleri taramalar gerektirir. Erken metastaz gösterdiğinden prognozu kötüdür (138). Yaygın olarak görülen moleküler değişikliklerden bazıları; TP53 mutasyonu, C-MYC amplifikasyonu ve p16 promoter hipermetilasyonudur (139).

2.5.3. Akciğer kanserinde evreleme

Akciğer kanserinde tümörün evresi hastalara yaklaşımı belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Evreleme sistemi, kanserin anatomik özellikleri hakkında bilgiler vererek tedavinin planlanmasına ve prognozun belirlenmesine yardımcı olur. Tüm dünyada ortak olarak kullanılan bir evreleme sistemi, klinik çalışmalarda hastalığın derecelerinin karşılaştırılabilmesi ve belirli hasta grupları hakkında ilişki kurulabilmesi için gereklidir. Aynı zamanda yeni tedavi stratejileri geliştirilmesine ve tedavilere beklenen yanıtların öngörülmesine olanak sağlar (140). Günümüzde, Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Derneğinin (IASLC), Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (UICC) ve Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) ile birlikte hazırladığı güncel 8. TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır.

TNM evreleme sistemi tümörün anatomik kapsamını belirleyen üç bileşenden oluşur (T, N, M). Her bir bileşen hastalığın artan şiddetine göre farklı kategorilere ayrılarak hastalığa dahil olan özellikleri belirtir (141). T faktörü tümörün boyutunu, çevre yapılarla ilişkisini ve ilişkili nodülleri kapsayarak primer tümörün özelliklerini belirtir. Hastadan alınan örneklerde malign hücrelerin görüldüğü ancak primer tümörün saptanamadığı durumlar Tx, herhangi bir tümör bulgusu olmayan durumlar T0, karsinoma *in situ* tümör ise Tis olarak olarak tanımlanmaktadır. Tümör boyutunda tomografi sonuçlarının aksiyal kesitlerindeki uzun çap dikkate alınarak 5 santimetreye kadar olan tümörler birer santimetre arayla T1a, T1b, T1c, T2a, T2b, 5 ve 7 santimetre arasındaki tümörler T3, 7 santimetreden büyük tümörler ise T4 olarak belirlenir (142).

N faktörü, bölgesel lenf nodlarındaki tümörün genel durumuna göre tanımlanır. Nodal tutulum pozitif lenf nodlarının sayısı ve spesifik bölgesel nodal grupların tutulumu ile kategorize edilir. Bölgesel lenf bezlerinin değerlendirilemediği durumlar Nx, bölgesel lenf bezi metastazının olmadığı durumlar N0 olarak değerlendirilirken, lenf bezlerine metastazın artması giderek artan nod numaralarıyla ifade edilir (143).

M faktörü, tümörün uzak organlardaki metastatik durumunu tanımlamaktadır. Alt kategorileri uzak organ metastazı olmaması durumundan (M0) başlayarak bir veya birden çok organda çoklu ekstratorasik metastazlara (M1c) kadar sınıflandırılmıştır. En sık metastaz görülen bölgeler; beyin, kemikler, adrenal bezler, karşı akciğer, karaciğer, perikard, böbrekler olsa da herhangi bir organ metastatik hastalığın tutulum bölgesi olabilir (144).

Akciğer kanserinin T, N ve M derecelerinin ayrı ayrı belirlenmesinin ardından bu üç bileşenin kombinasyonu hastalığın TNM evresini tanımlar ve hastalığın en erken evrelerinden en ileri evrelerine kadar kategorilere ayrılır. Evre I genellikle küçük boyutu ve negatif lenf nodu ile karakterize kanseri tanımlarken, Evre 2-3 artan tümör veya nodal yayılımı, evre 4 ise tanı anında metastazı olan hastaları tanımlamaktadır.

Bunlara ek olarak evre 0, metastatik potansiyeli olmayan tümörü (karsinoma *in situ*) tanımlamak için kullanılır (141).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışma Acıbadem Üniversitesi Araştırma Laboratuvarında ve Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışma grubu Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde tedaviye başlayacak olan veya tedavi görmekte olan akciğer kanserli hastalardan oluşturuldu. Çalışmaya katılan tüm hastalara ve kontrol grubundaki kişilere çalışma öncesi aydınlatılmış onam formu bireysel olarak okundu ve kişilerin gönüllülük esasına dayanarak imzalı onayları alındı. Örneklerin çalışmada kullanılabilmesi için Acıbadem Üniversitesi ve Acıbadem Sağlık Kuruluşları Tıbbi Araştırma Etik Kurulundan (ATADEK) etik onay alındı (etik onay karar numarası: 2016-16/15). Hastalar için çalışma dışı bırakma kriterleri; hastanın gebe olması, bilinen bir kardiyovasküler hastalığı olması, akciğer kanseri harici bir kanser hastalığı olması, böbrek yetmezliği olması, astım ve diyabet hastası olması olarak belirlendi. Kontrol grubu sağlıklı bireylerden oluşturuldu. Kontrol grubu için çalışma dışı bırakma kriterleri; kişinin gebe olması ve sigara kullanması olarak belirlendi. Hastalardan ve kontrol grubundan alınan kan örnekleri 1500 x g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek, elde edilen serum örneği iki ayrı ependorf tüpüne aktarılarak çalışmanın yapılacağı güne kadar 80°C'de muhafaza edildi.

3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmaya 60 akciğer kanserli hastayla birlikte 23 sağlıklı gönüllü katıldı. Çalışmaya katılan 24 hasta, örneklerin alındığı esnada henüz tedavi görmeye başlamamıştı. Çalışmaya katılan 36 hasta ise örneklerin alındığı esnada tedavi

(kemoterapi ve/veya radyoterapi) görmekte idi. Çalışma için hasta popülasyonu akciğer kanserinin farklı histolojik gruplarına ve farklı evrelerine sahip hastalardan oluşturuldu. Hastaların histolojik grupları Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi tarafından belirlendi. Hastaların evreleri akciğer kanserinin güncel TNM evreleme sistemine göre belirlendi. Çalışmaya katılan hastaların demografik bilgileri Tablo-3'te verilmiştir.

Tablo 3: Demografik Bilgiler

	1.GRUP (kontrol grubu)	2.GRUP (tedavi almış)	3.GRUP (tedavi almamış)
N	23	36	24
Yaş: medyan (min-max)	48 (40-74)	60 (41-78)	62,5 (46-75)
Cinsiyet			
Erkek (%)	12 (%52,2)	28 (%77,8)	21 (%87,5)
Kadın (%)	11 (%47,8)	8 (%22,2)	3 (%12,5)
Histolojik gruplar			
Adenokarsinoma		8 (%22,2)	9 (%37,5)
Skvamöz Hücreli Karsinom		15 (%41,7)	6 (%25)
Küçük Hücreli Karsinom		10 (%27,8)	8 (%33,3)
Diğer		3 (%8,3)	1 (%4,2)
Evre grupları			
Evre IV		20 (%55,6)	14 (%58,3)
Evre III		11 (%30,6)	6 (%25)
Evre II		2 (%5,6)	2 (%8,3)
Evre I		3 (%8,3)	2 (%8,3)
Sigara içiciliği	-	24 (%67,7)	16 (%67,7)

3.3. Gereçler

3.3.1. Kitler

Çalışmada; Total IGFBP-4 ELİSA kiti (AnshLabs, TX, USA), ultrasensitive PAPP-A ELİSA kiti (DRG Instrumens, Germany) ve IMMULITE 2000 IGF-1 kiti (Siemens Medical Solutions Diagnostics, CA, USA) kullanıldı.

3.3.2. Cihazlar

Çalışmada; sentrifüj (Nüve NF 1200, Ankara, TR), mikrolaka yıkayıcı (Tecan HydroSpeed, Männedorf, İsviçre), mini çalkalayıcı (BioSan PSU-2T, Riga, Letonya), otomatik mikropipetler (Axygen single channel, Axygen multichannel, CA, USA), vorteks (Benchmark Benchmixer, NJ, USA), spektrofotometre (BioTek Synergy HT, VT, USA) ve otoanalizör (IMMULTE 2000 Immunoassay System, Siemens Healthcare Diagnostics Products, Berlin, Almanya) cihazları kullanıldı.

3.4. Yöntemler

3.4.1. IGF-1 düzeylerinin kemilüminesans yöntemi ile ölçümü

Hastalardan ve kontrol grubundan alınan numunelerin IGF-I düzeyleri, otoanalizör kullanılarak (Immulate 2000, Siemens), IGF-1 katı faz, enzim işaretli kemilüminesans immünometrik analizi ile tayin edildi. Bu çalışmada kullanılan Kemilüminesans immünometrik analizi (CLIA), kemilüminesans tekniğini immünokimyasal

reaksiyonlarla birleştiren bir testtir (145). Testin CV değeri 60.32 ng/mL içim %3,77 olup tespit limiti (LOD) 13.3 ng/mL’dir.

3.4.2. ELISA yöntemi

Hastalardan ve kontrol grubundan alınan örneklerin serumlarında PAPP-A ve IGFB-4 düzeylerinin ölçümü için Sandwich tipi Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi kullanıldı. ELISA yöntemi, antikor ve antijen reaksiyonlarının saptandığı bir yöntemdir. Bu yöntemde katı faz olarak kullanılan ELISA plakalarının her bir kuyucuğuna antikorlar gömülüdür. Plakalara antijen içeren vücut sıvıları eklenerek antikor-antijen bağlantısı gerçekleşir. İlk inkübasyon ve yıkama işlemlerinden sonra ortama eklenen biyotinle işaretli antikorlar antijenlere bağlanır. İkinci inkübasyon ve yıkama işlemlerinden sonra ortama Horseradish Peroksidaz (HRP) Konjugatı eklenir. İlke olarak antikor-biyotin konjugatı katı faz antikor-antijen kompleksine bağlanır ve bu da HRP konjugatına bağlanır. Üçüncü inkübasyon ve yıkama işlemlerinden sonra ortama eklenen TMB (Tetremetilbenzidin) kromojen solüsyonu HRP enzimi katalizörlüğünde mavi renge dönüşür. Bu renk değişikliği reaksiyonların düzgün bir şekilde gerçekleştiğinin ve numunelerde antijen varlığının göstergesidir. Kısa bir inkübasyondan sonra ortama, reaksiyonları durduran Stop Solüsyonu eklenerek sarı renk oluşumu gözlenir. Spektrofotometrede belirlenen dalga boylarında oluşan renklerin optik yoğunlukları ölçülür ve optik yoğunluklara bağlı olarak konsantrasyon tayini yapılır (146).

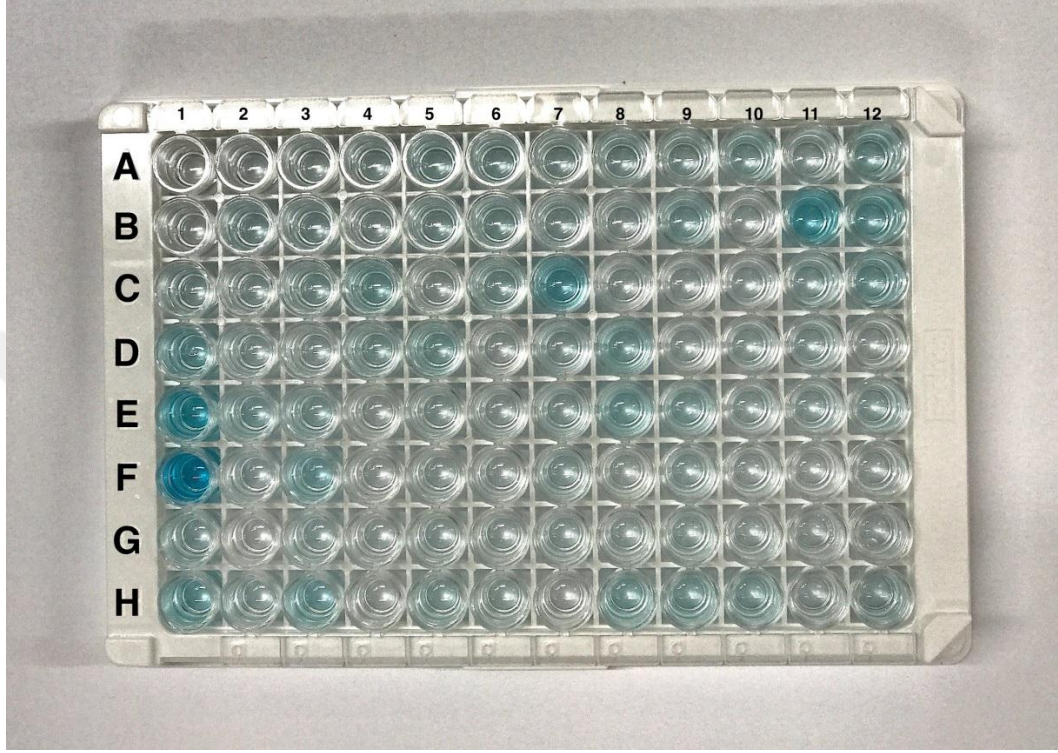
3.4.2.1. IGFBP-4 düzeylerinin ölçümü

IGFBP-4 düzeylerinin ölçülmesinde TOTAL IGFBP-4 ELISA kiti (AnshLabs, TX, USA) kullanıldı. Üretici verilerine göre bu testin CV değeri 122.33 ng/mL için %1,68 olup tespit limiti (LOD) 4.735 ng/mL’dir.

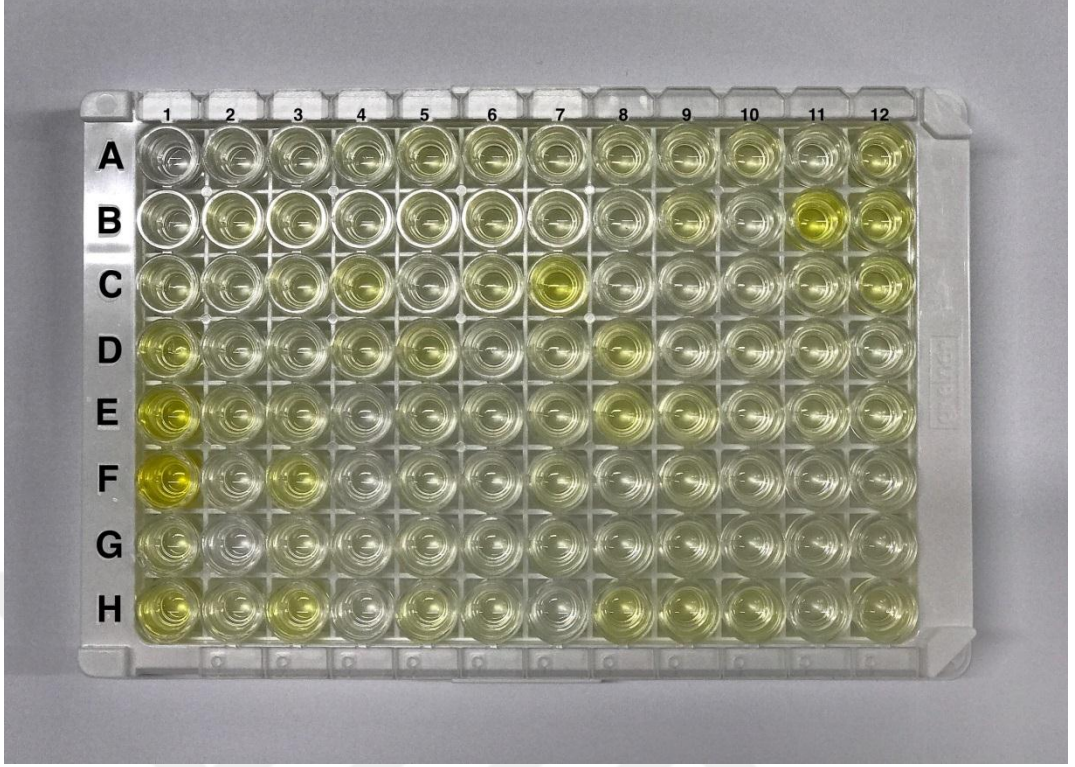
Çalışmaya başlamadan önce çalışmada kullanılacak tüm materyaller kullanıma hazır hâle getirildi. TOTAL IGFBP-4 ELISA kiti prosedürü sırasıyla uygulandı:

1. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına (21°C) getirildi.
2. Kalibratörler ve kontroller 0.5 mL deiyonize su ile seyreltildi.
3. Seyreltilen kalibratör ve kontroller 10 dakika vorteks yardımıyla hafif bir şekilde karıştırıldı.
4. Kalibratörler, kontroller ve numuneler mikropolanın uygun kuyucuklarına pipetlendi (25µL).
5. Test tampon çözeltisi tüm kuyucuklara pipetlendi (100 µL).
6. Mikropola, oda sıcaklığında (21°C) mikropola çalkalayıcıda hızlı bir şekilde çalkalanarak (600-800 rpm) 60 dakika inkübe edildi.
7. Total IGFBP-4 Biyotin konjugat konsantrasyonu, protokolde belirtilen oranlarda test tamponunda seyreltilerek Total IGFBP-4 Antikor-Biyotin konjugat solüsyonu hazırlandı.
8. Tüm kuyucuklar yıkama solüsyonu ile (350 µL) 5 kez yıkandı.
9. Hazırlanan Antikor-Biyotin konjugat solüsyonu tüm kuyucuklara pipetlendi (100 µL),
10. Mikropola, oda sıcaklığında (21°C) mikropola çalkalayıcıda hızlı bir şekilde çalkalanarak (600-800 rpm) 60 dakika inkübe edildi.
11. Tüm kuyucuklar yıkama solüsyonu ile (350 µL) 5 kez yıkandı.
12. Tüm kuyucuklara Streptavidin -HRP (Horseradish Peroksidaz) Enzim Konjugatı pipetlendi (100 µL).
13. Mikropola, oda sıcaklığında (21°C) mikropola çalkalayıcıda hızlı bir şekilde çalkalanarak (600-800 rpm) 30 dakika inkübe edildi.
14. Tüm kuyucuklar yıkama solüsyonu ile (350 µL) 5 kez yıkandı.
15. Tüm kuyucuklara TMB (Tetremetilbenzidin) kromojen solüsyonu pipetlenerek (100 µL), mavi renk oluşumu gözlemlendi.
16. Mikropola, oda sıcaklığında (21°C) mikropola çalkalayıcıda hızlı bir şekilde çalkalanarak (600-800 rpm) 10 dakika inkübe edildi.
17. Tüm kuyucuklara Stop Solution (Sülfirik asit) pipetlenerek (100 µL) sarı renk oluşumu gözlemlendi.

18. Plakalardaki solüsyonların optik yoğunlukları spektrofotometre kullanılarak 450 nm ve 630 nm çift dalga boyunda ölçüldü.



Resim 1. IGFBP-4 düzeylerinin Total IGFBP-4 ELISA kiti kullanılarak ölçülmesi sırasında tüm kuyucuklara TMB solüsyonu pipetlendikten sonra gözlenen mavi renk oluşumu. A1 ve F1 (yukarıdan aşağıya ilk 6 kuyucuk) arasındaki kuyucuklara kalibratörler, G1 ve H1 kuyucuklarına kontroller, diğer tüm kuyucuklara serum örnekleri pipetlenmiştir.



Resim 2. IGFBP-4 düzeylerinin Total IGFBP-4 ELISA kiti kullanılarak ölçülmesi sırasında tüm kuyucuklara Stop solüsyonu pipetlendikten sonra gözlenen sarı renk oluşumu.

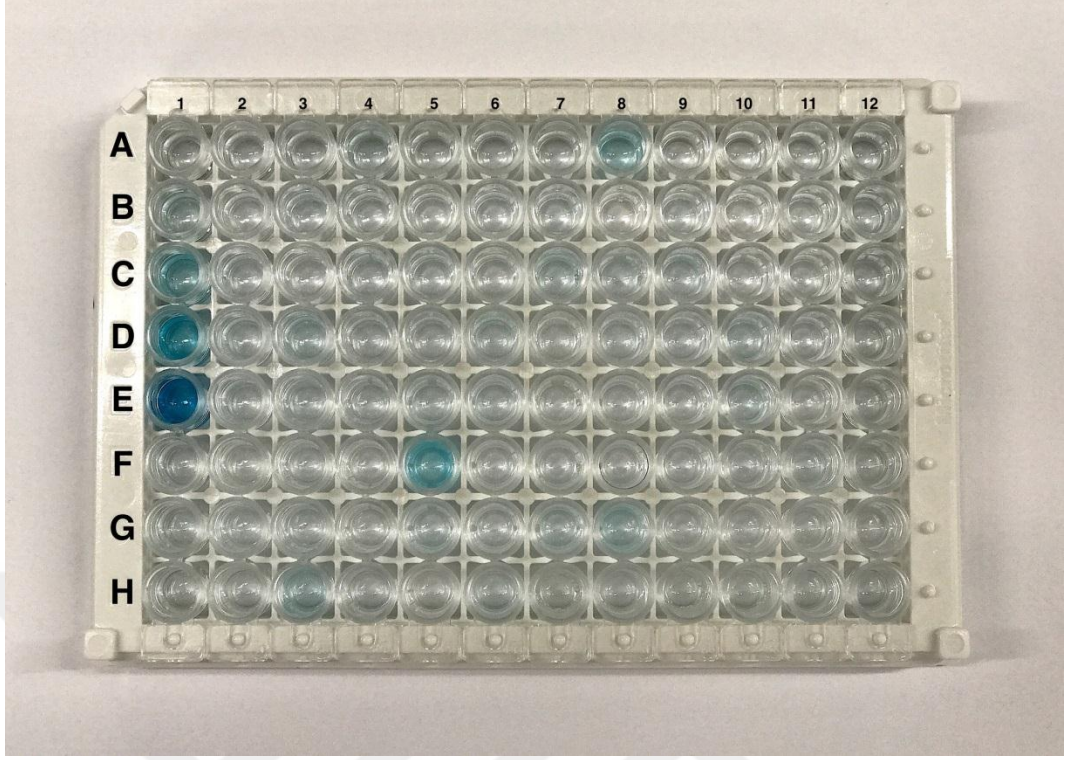
3.4.2.2. PAPP-A düzeylerinin ölçümü

PAPP-A'nın ölçülmesinde Ultrasensitive PAPP-A ELISA kiti (DRG Instrumens, Germany) kullanıldı. Üretici verilerine göre bu testin CV değeri 11.96 ng/mL için %6,86 olup tespit limiti (LOD), 0.023 ng/mL'dir.

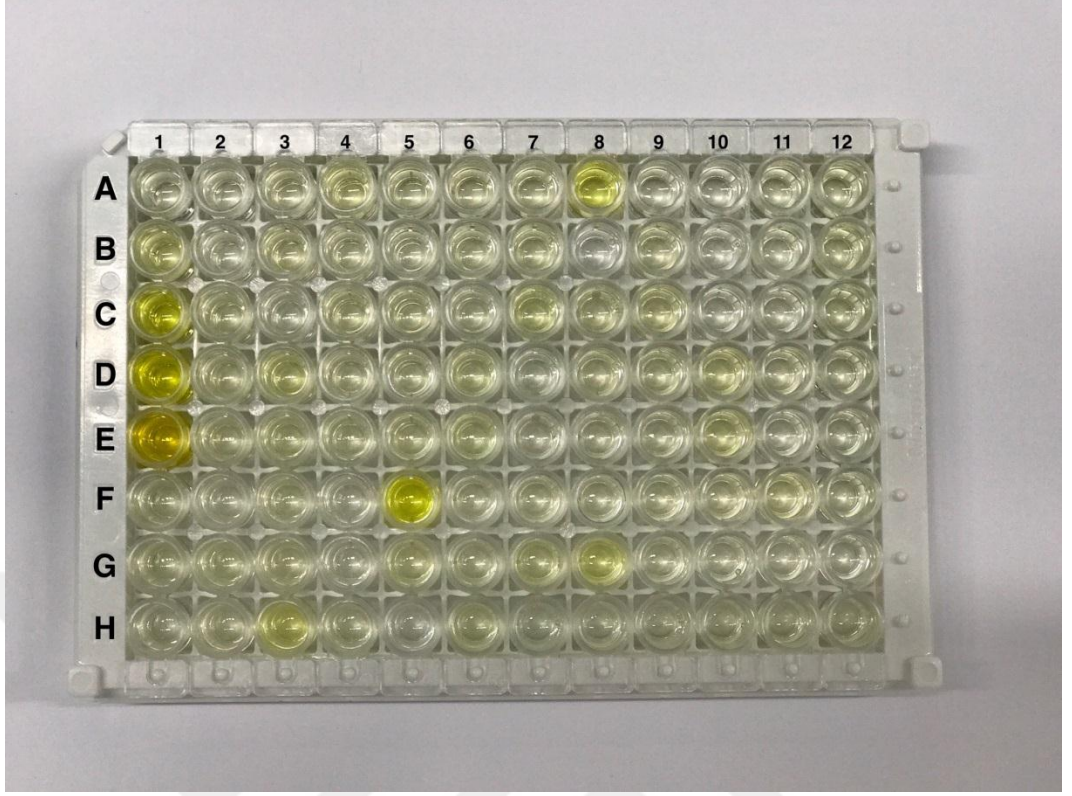
Çalışmaya başlamadan önce çalışmada kullanılacak tüm materyaller kullanıma hazır hâle getirildi. Ultrasensitive PAPP-A ELISA kiti prosedürü sırasıyla uygulandı:

1. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına (21°C) getirildi ve hafif bir şekilde karıştırıldı.
2. Tüm standartlar 1 mL distile su eklenerek dilüe edildi.
3. Dilüe edilen standartlar ve tüm numuneler mikropiçin uygun kuyucuklarına pipetlendi (100 µL).

4. Oda sıcaklığında (21°C) 60 dakika kapağı açık bir şekilde inkübe edildi.
5. Yıkama solüsyonu protoklode belirtilen oranda distile su ile seyreltilerek otomatik yıkama cihazına bağlandı.
6. Mikroplaka hızlıca çalkalandı.
7. Tüm kuyucuklar otomatik mikroplaka yıkayıcıda seyreltilen yıkama solüsyonu ile (400 µL) 5 kez yıkandı.
8. Mikroplaka kurutma kâğıdına sertçe vurularak kalıntı damlacıklarının giderilmesi sağlandı.
9. Tüm kuyucuklara Konjugat solüsyonu (biyotinlenmiş PAPP-A antikoru) pipetlendi (100 µL).
10. Mikroplaka 10 saniye boyunca karıştırıldı.
11. Oda sıcaklığında (21°C) 60 dakika kapağı açık bir şekilde inkübe edildi.
12. Mikroplaka hızlıca çalkalandı.
13. Tüm kuyucuklar otomatik mikroplaka yıkayıcıda seyreltilen yıkama solüsyonu ile (400 µL) 5 kez yıkandı.
14. Mikroplaka kurutma kâğıdına sertçe vurularak kalıntı damlacıklarının giderilmesi sağlandı.
15. Tüm kuyucuklara enzim kompleksi (Horseradish peroksidaz) pipetlendi (100 µL).
16. Oda sıcaklığında (21°C) 30 dakika inkübe edildi.
17. Mikroplaka hızlıca çalkalandı.
18. Tüm kuyucuklar otomatik mikroplaka yıkayıcıda seyreltilen yıkama solüsyonu ile (400 µL) 5 kez yıkandı.
19. Mikroplaka emici kâğıda sertçe vurularak kalıntı damlacıklarının giderilmesi sağlandı.
20. Tüm kuyucuklara substrat solüsyonu (TMB) pipetlenerek (100 µL) mavi renk oluşumu gözlemlendi.
21. Oda sıcaklığında (21°C) 15 dakika inkübe edildi.
22. Tüm kuyucuklara Stop Solution (Sülfirik asit) pipetlenerek (100 µL) sarı renk oluşumu gözlemlendi.
23. Plakalardaki solüsyonların optik yoğunlukları spektrofotometre kullanılarak 450 nm’de ölçüldü.



Resim 3. PAPP-A düzeylerinin Ultrasensitiv PAPP-A ELISA kiti kullanılarak ölçülmesi sırasında tüm kuyucuklara TMB solüsyonu pipetlendikten sonra gözlenen mavi renk oluşumu. A1 ve E1 (yukarıdan aşağı ilk 5 kuyucuk) kuyucuklarına kit standartları, diğer tüm kuyucuklara serum örnekleri pipetlenmiştir.



Resim 4. PAPP-A düzeylerinin Ultrasensitiv PAPP-A ELISA kiti kullanılarak ölçülmesi sırasında tüm kuyucuklara Stop solüsyonu pipetlendikten sonra gözlenen sarı renk oluşumu.

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz yapılabilmesi için öncelikle hastalar tedavi almış ve tedavi almamış hastalar olmak üzere ve akciğer kanserinin histolojik tipine göre adenokarsinoma, skuamöz (yassı) hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom olmak üzere gruplara ayrıldı. Oluşturulan hasta grupları kendi aralarında ve oluşturulan kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiksel analizleri yapıldı.

Veriler analiz edilirken ilgili yöntemin belirlenmiş ölçüm sınırları dışında kalan veriler çalışmadan çıkarıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluklarının test edilmesi için Shapiro-Wilk testi kullanıldı.

Normal dağılım gösteren gruplar arasındaki farkın anlamlılık düzeyini belirlemek için ANOVA testi uygulandı. Analiz edilecek grupların sayıları 2'den fazla olması sebebiyle her grubun diğer bir gruba arasındaki farkın anlamlılık analizi PostHoc Tuckey testi kullanılarak yapıldı. Normal dağılım göstermeyen gruplarda gruplar arası anlamlılık analizi non parametrik testler (Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U) kullanılarak yapıldı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Hastalardan ve kontrol grubundan alınan numunelerin IGF-1, IGFBP-4 ve PAPP-A düzeylerinin istatistiksel analiziyle grupların bir kısmının normal dağılım göstermediği belirlenmiş ve grupların IGF-1, IGFBP-4 ve PAPP-A düzeyleri Tablo-4A ve Tablo-4B’de verilmiştir.

Tablo 4A: Kontrol grubu ve tedaviye göre oluşturulan grupların PAPP-A, IGFBP-4 ve IGF-1 düzeyleri

	Kontrol M, (Q ₁ -Q ₃)	TV M, (Q ₁ -Q ₃)	TY M, (Q ₁ -Q ₃)
N	23	36	24
IGF-1 (ng/mL)	125, (101-140)	141, (117-158.5)	125, (90.3-151.5)
IGFBP-4 (ng/mL)	104.6, (81.8-128.1)	149.4*, (114.4-186.9)	161.6*, (107,8-206,2)
PAPP-A (ng/mL)	2.89, (1.84-4.39)	2.7, (1.36-4.98)	4.04, (2.31-5.84)

M, (Q₁, Q₃): Medyan, (1.çeyrek, 3.çeyrek), TV; tedavi alan hasta grubu, TY; tedavi almayan hasta grubu

*Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p <0.005).

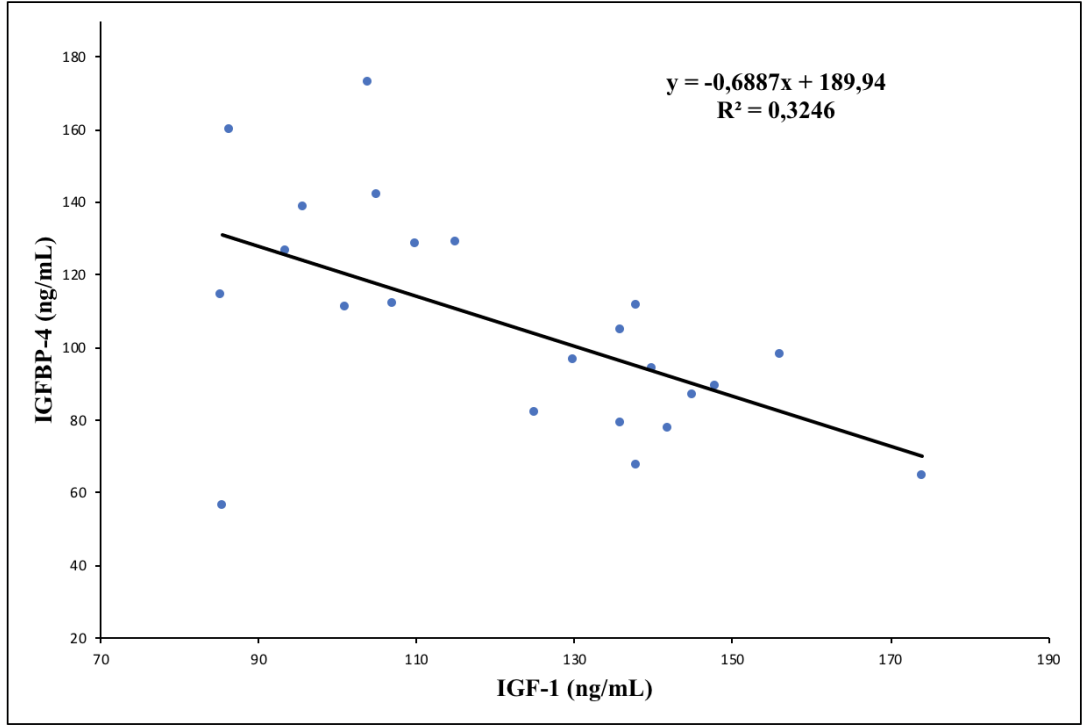
Tablo 4B: Kontrol grubu ve akciğer kanserinin histolojik alt tipine göre oluşturulan grupların PAPP-A, IGFB-4 ve IGF-1 düzeyleri

	Kontrol M, (Q ₁ -Q ₃)	AK M, (Q ₁ -Q ₃)	SHK M, (Q ₁ -IQ ₃)	KHK M, (Q ₁ -Q ₃)
N	23	17	21	18
IGF-1 (ng/mL)	125, (101-140)	130, (97.5-170.5)	143, (123-175)	119.5, (88.3-144.2)
IGFBP-4 (ng/mL)	104.6, (81.8-128.1)	131.9*, (106.2-231.6)	163.6*, (124-195)	148.5*, (118.7-187)
PAPP-A (ng/mL)	2.89, (1.84-4.39)	3.32, (2.50-5.39)	3.28, (1.56,6.76)	2.57, (1.83,4.86)

M, (Q₁, Q₃): Medyan, (1.çeyrek, 3.çeyrek), AK; Adenokarsinoma, SHK; Skuamöz (yassı) hücreli karsinom, KHK; Küçük hücreli karsinom

*Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p <0.005).

Çalışmada düzeyleri ölçülen 3 parametrenin birbirleri arasındaki ilişki incelendiğinde, kontrol grubunun IGF-1 düzeyleri ile IGFBP-4 düzeyleri arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (**r=-0.570**, p<0.005) (Grafik-1).



Şekil 7. Kontrol grubunun IGF-1 ve IGFBP-4 düzeyleri arasındaki ilişki

Kontrol grubunun PAPP-A düzeyleri ile diğer parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0.05$). Tedavi alan ve tedavi almayan hasta gruplarının IGF-1, IGFBP-4 ve PAPP-A düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0.05$).

4.1. IGF-1

Akciğer kanserli hastaların tedavi durumuna göre oluşturulan gruplardan ve kontrol grubundan alınan numunelerin IGF-1 düzeyleri karşılaştırıldı. Tedavi alan hasta grubu, tedavi almayan hasta grubu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

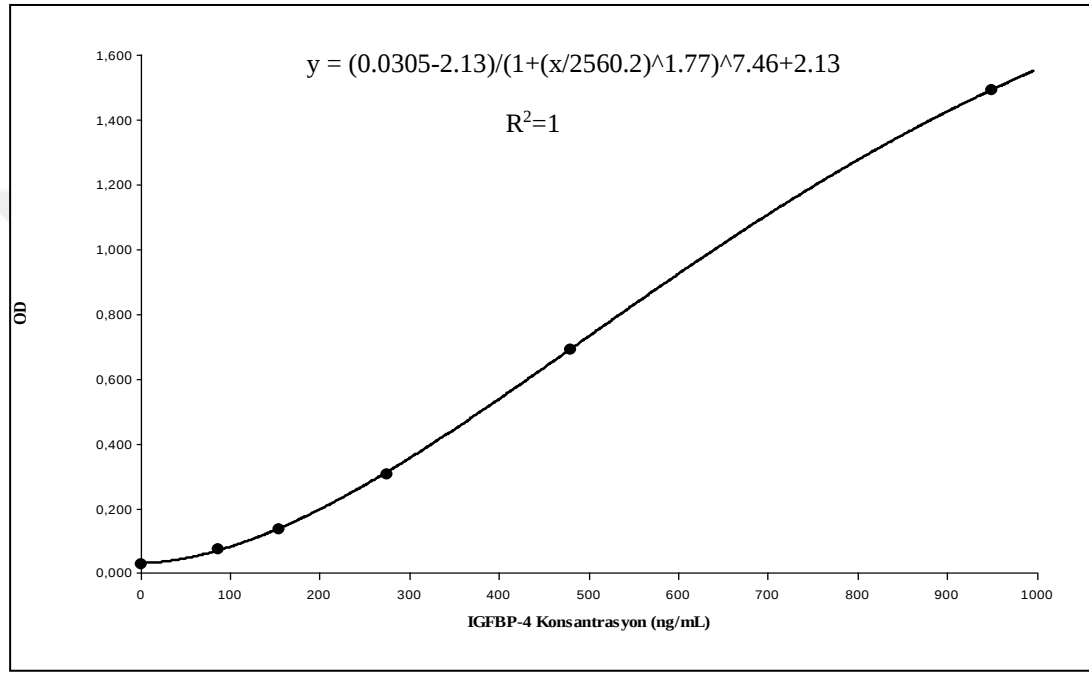
Akciğer kanserli hastaların histolojik alt tiplerine göre gruplandırıldığı istatistiksel çalışmalarda adenokarsinoma (AHK), skuamöz hücreli karsinom (SHK), küçük hücreli karsinom (KHK) gruplarının ve kontrol grubunun IGF-1 düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Hastalar ayrıca histolojik alt gruplarının evrelerine göre tekrar alt gruplara ayrılarak istatistiksel analiz yapıldı. AK, SHK ve KHK histolojik tiplerinin 4.evresine sahip hastaların IGF-1 düzeyleri 4. evreden küçük bir evreye sahip diğer hastaların IGF-1 düzeyleriyle karşılaştırıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tüm hasta ve kontrol gruplarının IGF-1 düzeyleri ile IGFBP-4 ve PAPP-A düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığı oluşturulan korelasyon grafikleriyle görsel olarak değerlendirildi. Grupların IGF-1, IGFBP-4 ve PAPP-A düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi.

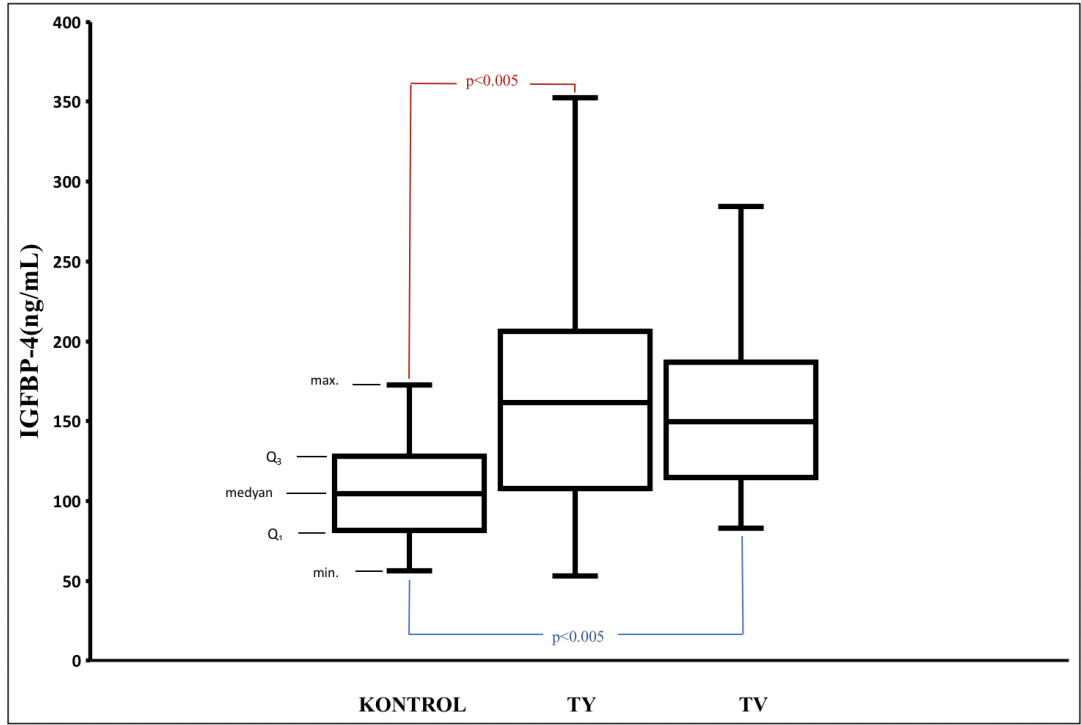
4.2. IGFBP-4

Tüm numunelerin IGFBP-4 düzeylerinin ELISA yöntemi ile ölçülmesi sırasında oluşturulan kalibrasyon eğrisi Grafik-2’de verilmiştir.



Şekil 8. IGFBP-4 ölçümü için kalibrasyon eğrisi

Akciğer kanserli hastaların tedavi durumuna göre gruplandırıldığı istatistiksel çalışmalarda; tedavi alan ve tedavi almayan hasta gruplarının her ikisinin IGFBP-4 düzeylerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.005$) (Grafik-3). Tedavi alan ve tedavi almayan hasta gruplarının IGFBP-4 düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).



Şekil 9. Tedavi alımına göre gruplandırılan akciğer kanseri hastalarının ve kontrol grubunun IGFBP-4 düzeyleri. (TY: Tedavi yok, TV: Tedavi var)

Hastalar akciğer kanserinin sahip oldukları histolojik alt tiplerine göre gruplandırılarak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında IGFBP-4 düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulundu. İstatiksel değerlendirmeler yapıldığında hastaların AK, SHK ve KHK gruplarının tamamının IGFBP-4 düzeylerinin kontrol grubunun IGFBP-4 düzeylerinden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.005$).

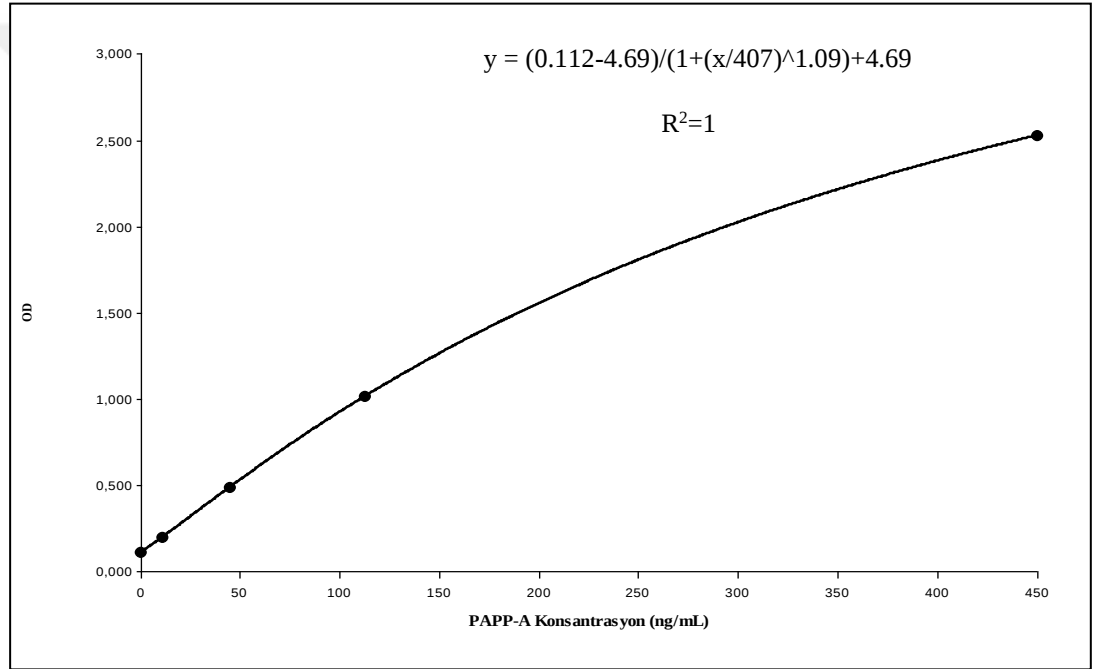
Akciğer kanserinin AK, SHK ve KHK histolojik alt grupları kendi aralarında incelendiğinde IGFBP-4 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Hastalar ayrıca histolojik gruplarının evrelerine göre alt gruplara ayrılarak istatistiksel analiz yapıldığında; AK, SHK ve KHK histolojik tiplerinin 4. evresine

sahip hastalar ve 4. evreden küçük bir evreye sahip diğer hastaların IGFB-4 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

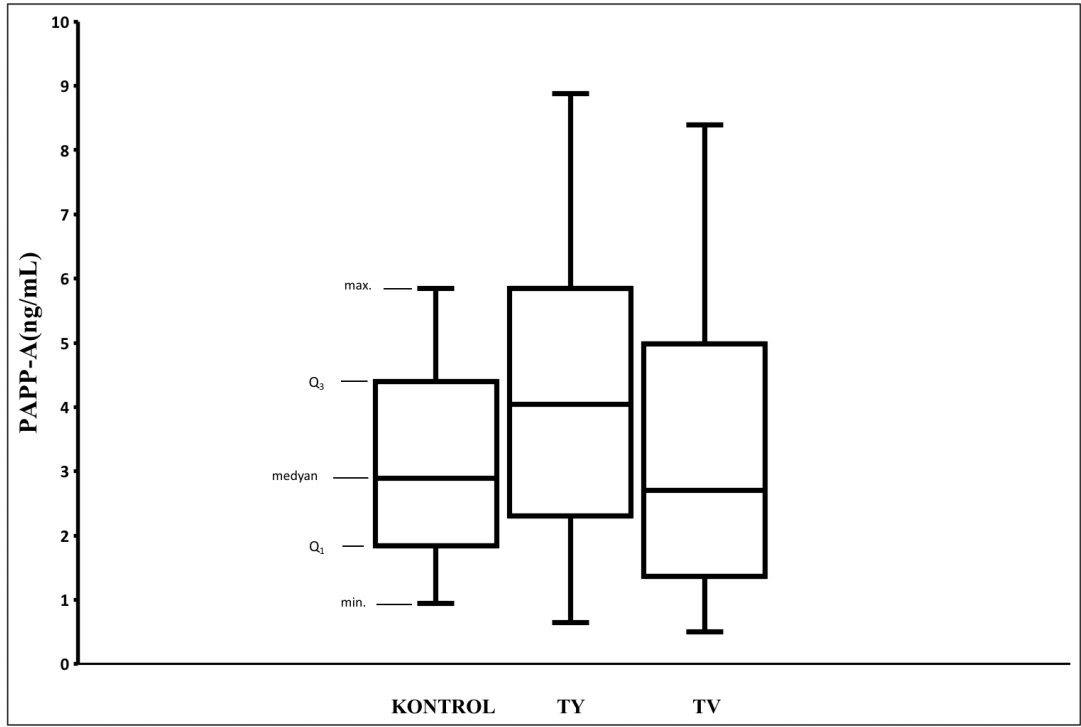
4.3. PAPP-A

Tüm numunelerin PAPP-A düzeylerinin ELISA yöntemi ile ölçülmesi sırasında oluşturulan kalibrasyon eğrisi Grafik-4'te verilmiştir.



Şekil 10. PAPP-A ölçümü için kalibrasyon eğrisi

Akciğer kanserli hastaların tedavi durumuna göre oluşturulan gruplardan ve kontrol grubundan alınan numunelerin PAPP-A düzeyleri karşılaştırıldığında; tedavi almayan akciğer kanseri hasta grubunun PAPP-A düzeylerinin, kontrol grubundan yüksek olduğu tespit edildi. Yapılan analizler ile bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$) (Grafik-5). Tedavi alan akciğer kanseri hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadı ($p>0.05$).



Şekil 11. Tedavi alımına göre gruplandırılan akciğer kanseri hastalarının ve kontrol grubunun PAPP-A düzeyleri. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok ($p>0.05$). (TY: Tedavi yok, TV: Tedavi var)

Hastalar akciğer kanserinin sahip oldukları histolojik alt tiplerine göre gruplandırılarak (AK, SHK ve KHK), kendi aralarında ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PAPP-A düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Hastalar histolojik gruplarının evrelerine göre alt gruplara ayrılarak istatistiksel analiz yapıldığında, AK, SHK ve KHK histolojik tiplerinin 4.evresine sahip hastaların ve 4. evreden küçük bir evreye sahip diğer hastaların PAPP-A düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, akciğer kanserinin farklı tip ve evrelerindeki hastalardan alınan numunelerde PAPP-A, IGFBP-4 ve IGF-1 düzeyleri ölçülerek hastalığın farklı tip ve evreleri ile olan ilişkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, aynı zamanda tüm hasta ve kontrol gruplarında PAPP-A, IGFBP-4 ve IGF-1 düzeyleri birlikte ölçülerek kendi aralarındaki ilişki incelenmiştir.

İnsan vücudunda büyümenin önemli bir düzenleyicisi olan IGF-1'in hücre proliferasyonu, klonal büyüme ve migrasyon gibi tümör aşamalarının düzenlenmesinde de rol aldığı bilinmektedir (34). IGF-1'in dolaşımında yüksek düzeylerde bulunduğu prostat, meme ve akciğer kanseri dâhil olmak üzere çeşitli kanser hastalarında gösterilmiştir (34,44). IGF-1'in küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde sağlıklı dokulardan daha yüksek düzeyde eksprese edildiği gözlenmiştir (147).

Bu çalışmada, akciğer kanserinin farklı tip ve evrelerinin IGF-1 düzeyleri (125 ng/mL) kontrol grubuyla (125 ng/mL) karşılaştırıldığında bir fark olmadığı görüldü. Her ne kadar pek çok çalışma IGF-1 düzeylerinin akciğer kanseri hastalarında yükseldiğini gösterse de sonuçlarımıza benzer olarak akciğer kanseri hastalarının IGF-1 düzeylerinin sağlıklı bireylerden farklı olmadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (148,149). IGF-1 akciğer kanseri prognozu ve tümör dereceleriyle değişken bir şekilde ilişkilendirmiştir. Bazı çalışmalar, IGF-1'in akciğer kanserinin erken evrelerinde rolü olduğunu ileri sürmektedir (150). Çalışmamızda akciğer kanserli hastaları evrelerine göre gruplandırarak IGF-1 düzeylerini karşılaştırdığımızda 4. evre akciğer kanseri hastalarının IGF-1 düzeyleri ile 4. evre dışında kalan (evre-3, 2, 1) hastaların IGF-1 düzeyleri arasında bir fark gözlenmedi. Bu çalışmada, tedavi (kemoterapi/radyoterapi) almış ve tedavi almamış akciğer kanseri hastalarının IGF-1 düzeyleri arasında bir fark görülmedi.

Izycki ve ark. (151) küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer hastalarının kemoterapi öncesi ve kemoterapi sonrası IGF-1 düzeyleri incelenmiş ve sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında kemoterapi öncesi tüm hastaların IGF-1 düzeyleri kontrol grubundan oldukça yüksek olarak ölçülmüştür. Yine aynı çalışmada akciğer kanseri hastalarının kemoterapi öncesi ve kemoterapi sonrası IGF-1 düzeylerinde ise bir fark gözlenmemiştir.

Dolaşımda IGF-1 düzeyleri doğum öncesi oldukça düşükken ergenlikte artar ve yetişkinlikte en yüksek düzeylerine ulaşır (32). Bazı çalışmalar, IGF-1 düzeylerinin yaşa bağımlı olduğunu (152,153) ve özellikle 60 yaş ve sonrasında azalmaya başladığını ileri sürmektedir (154). Çalışmamızda hasta grubunun medyan yaşı 61.5, kontrol grubunun medyan yaşı ise 48'dir. Bu fark, dolaşım düzeyleri yaşa bağlı olarak değişen IGF-1'in karşılaştırılmasını güçleştirmektedir. Akciğer kanseri hastalarında yükselen IGF-1 düzeyleri, 60 yaş ortalaması nedeniyle düşerek kontrol grubuna yaklaşmış olabilir. Bu düşünceler ancak çalışmanın benzer yaşta hasta ve kontrol gruplarıyla tekrarlanmasıyla desteklenebilir.

IGF'ler dolaşımda 6 farklı bağlayıcı proteinden birine bağlı hâlde bulunurlar (7). IGFBP-4 bu bağlayıcı proteinlerden biridir ve neredeyse tüm çalışmalar IGF aktivitelerini inhibe ettiğini göstermektedir (13,74). IGFBP-4'ün aşırı ekspresyonunun IGF-1 etkilerini inhibe ederek büyümenin yavaşlamasına neden olduğu çeşitli dokularda gözlenmiştir (59,61). IGFBP-4 her ne kadar büyüme üzerinde inhibe edici rollere sahip olsa da IGF ailesinin oluşturduğu sistemin ve büyümenin vazgeçilmez bir üyesidir. IGFBP-4 knockout fareler, doğum öncesi dönemde %10-15 gelişim geriliği göstermektedirler ve her yaşta normal yabani tiplerden küçüktürler (81). IGFBP-4, IGF'leri yüksek afinite ile bağlayarak etkilerini sınırlandırır ancak bu bağlanma IGF'lerin işlev göreceği dokulara taşınması ve bu dokularda PAPP-A gibi proteazların yardımıyla aktif olarak salınması ve reseptörlerine bağlanarak aktivitelerini gerçekleştirmeleri için de gerekli olup çok yönlüdür (53).

IGFBP-4 çeşitli tümör hücreleri tarafından yüksek düzeyde eksprese edilmektedir ve IGF aktivitelerini sınırlandırarak tümör büyümesini düzenler. IGFBP-4'ün anti-anjiyojenik ve anti-tümörjenik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (61). IGFBP-4 ekspresyonu küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde (NSCLC) gösterilmiştir (14). IGFBP-4'ün pek çok kanserde olduğu gibi akciğer kanserinde de yüksek düzeyde eksprese edildiği gözlenmiştir (11). Bizler de yapmış olduğumuz bu çalışmada, tedaviye göre oluşturulan gruplarda (tedavi alan ve tedavi almayan) dâhil olmak üzere, akciğer kanserinin tüm histolojik alt gruplarının (AK, SHK, KHK) IGFBP-4 düzeylerinin kontrol grubundan oldukça yüksek olduğunu gördük. Çalışmamızda, tedavi görmeyen akciğer kanseri hasta grubunun IGFBP-4 düzeyleri 161.6 olarak ölçüldü benzer şekilde akciğer kanseri hastalarının dolaşımında IGFBP-4 düzeylerini ölçen diğer bir çalışmada, hasta grubunun IGFBP-4 düzeyleri 208 ng/mL olarak ölçülmüştür (101).

Akciğer kanserinin farklı histolojik tip ve evrelerindeki gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise IGFBP-4 düzeyleri açısından bir fark bulunmadı. Bu bulguları destekleyen bir çalışmada, skuamöz hücreli akciğer kanseri hastalarından oluşturulan grubun IGFBP-4 seviyeleri ile akciğer kanserinin skuamöz hücreli olmayan diğer histolojik alt tiplerinden oluşturulan grup arasında bir fark gözlenmemiştir (155).

Adenokarsinoma hücrelerinde yapılan bir çalışma, epigenetik olarak baskılanmış IGFBP-4'ün azalan IGF inhibisyonu ile sonuçlandığını göstermektedir (156). İnsan prostat kanseri, kolon kanseri ve glioblastoma hücreleri gibi histolojik olarak farklı tümör tipleri üzerinde yapılan çalışmalarda IGFBP-4, tümör oluşumunu inhibe edici etkiler göstermiştir (61). Malign prostat epitel hücre hattında yapılan bir çalışmada, aşırı eksprese edildiği gözlenen IGFBP-4, diğer hücrelere transfer edilmiş ve bu farelerde tümör gelişimini geciktirdiği gözlenmiştir (157).

Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biri, vücudun enerji metabolizmasının kanser gelişimine uygun olacak şekilde yeniden programlanmasıdır (108). Yapılan bir çalışma IGFBP-4'ün akciğer kanseri hücrelerinde, hücre büyümesinin bir promotorü olarak tanımlamış ve enerji metabolizmasının kanser gelişimine göre düzenlenmesinde kilit rol oynadığını ileri sürmüştür (158).

PAPP-A ile IGFB-4 arasındaki ilişki oldukça sıkıdır. PAPP-A, IGFBP-4-IGF kompleksine karşı yüksek afiniteye sahiptir ve IGFBP-4'ün proteolizinden sorumludur (81). PAPP-A ve IGFBP-4 arasındaki ilişki IGFBP-4 knockout, PAPP-A knockout ve bunların kombinasyonlarıyla yapılan çalışmalarla aydınlatılmaya çalışılmıştır. PAPP-A knockout fareler, IGFBP-4 knockout farelerle benzer büyüme eksikliği gösterir (93). PAPP-A'dan yoksun fareler yaşamlarını sürdürebilir ancak IGFBP-4 konsantrasyonlarında artışa ve dolayısıyla serbest IGF seviyelerinde azalmaya yol açar. Bu durum, yapılan araştırmalarda farelerde %40-%60 büyüme eksikliğiyle sonuçlanmıştır (94). PAPP-A, büyümeyi uyaran aktivitelerini hastalıklı dokular ve tümör hücrelerinde de göstermektedir (74).

Çeşitli çalışmalar PAPP-A'nın tümör kaynaklı hücrelerde aşırı eksprese edildiğini göstermektedir (20,161). PAPP-A ve kanseri ilişkilendiren çalışmalarda PAPP-A, potansiyel bir onkojen olarak karşımıza çıkmakta ve bazı kanserlerde geçici olarak artış gösterirken bazılarında sürekli olarak eksprese edilmektedir (100). PAPP-A knockout farelerde spontane tümörlerin insidansı belirgin olarak azalmıştır ve bu fareler diğer yavrulara kıyasla medyan ve maksimum ömürde %20-%40'lık bir artışa sahiptirler (159). İnsan yumurtalık kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalar PAPP-A'nın aşırı ekspresyonunun tümör agresifliğini artırdığını, PAPP-A ekspresyonunun azalmasının yumurtalık kanseri hücrelerinin büyümesini ve migrasyonunu azalttığını göstermektedir (17,160). Düşük tümörjenik potansiyele sahip SKOV3 yumurtalık kanser hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, hücrelerin bir kısmına PAPP-A bir kısmına ise boş vektörler transfekte edilerek karşılaştırma yapılmış, PAPP-A'yı aşırı

eksprese eden hücrelerde tümör oluşma süresi kısalmışken tümör büyümesi önemli ölçüde artmıştır (160).

Bulut ve ark. (18) ilk kez akciğer kanseri hastalarında serum PAPP-A düzeylerinin yükseldiğini göstermiş, sonrasında yapılan çalışmalar ise PAPP-A'nın akciğer kanserindeki rolünü aydınlatmaya başlamıştır. Mikkelsen ve ark. (14) normalde yüksek PAPP-A ekspresyonu gösterdiği bilinen akciğer kanseri A549 hücre hatlarında PAPP-A ekspresyonunu azaltarak tümör büyümesinin azaldığını ve tümör büyümesini uyaran sistemin IGF sinyalleri olduğunu göstermiştir. Bu hücelere PAPP-A'ya karşı inhibe edici bir monoklonal antikorun haftalık olarak uygulanması, IGFBP-4 proteolizini azaltmış ve tümör büyümesini inhibe etmiştir. Salim ve ark. (161) PAPP-A'yı küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerinde metastazı öngören bir biyobelirteç olarak tanımlamıştır ve farklı histolojilerde NSCLC tümör hücrelerinin PAPP-A'yı aşırı eksprese ettiğini desteklemiştir.

Bu çalışmada, akciğer kanserinin farklı tip ve evrelerindeki hastaların PAPP-A düzeylerini kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görmedik. Hasta grupları tüm tip ve evreler bir arada olacak şekilde tedavi alımına göre sınıflandırıldığında, tedavi görmeyen akciğer kanseri hastalarının PAPP-A düzeyleri (4.04 ng/mL), kontrol grubunun PAPP-A düzeylerinden (2.89 ng/mL) bir miktar yüksek olarak ölçüldü ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Akciğer kanseri hastalarında dolaşımda PAPP-A düzeylerini araştırarak başka bir çalışmada hasta grubunun PAPP-A düzeyleri 1.0 ng/mL olarak ölçülmüştür.

PAPP-A'nın enzimatik olarak aktif ve inaktif formlarının bulunduğu bilinmektedir. Dolaşımda PAPP-A'nın bir kısmı proMBP ile kompleks oluşturur ve bu formu aktif değildir (74). Ayrıca PAPP-A aktivitesinin çeşitli moleküller tarafından inhibe edildiği bilinmektedir (101). Yakın zamanda keşfedilen STC-2 (101) PAPP-A ile kovalent bir yapı oluşturarak, STC-1 (85) ise bağlanma afinitesini etkileyerek

aktivitesini inhibe eder. Çalışmamızda tedavi görmeyen akciğer kanseri hastalarında kısmen yüksek olarak ölçülen PAPP-A düzeyleriyle birlikte, IGFBP-4 düzeylerinin oldukça yüksek olarak ölçülmesi dolaşımda bulunan PAPP-A inhibitörlerinin (101) bir sonucu olabilir.

Pan ve ark. (20) akciğer kanseri hastalarında gözlenen serum düzeylerindeki artışın akciğer kanseri hücrelerinden kaynaklanıp kaynaklanmadığını tespit etmek için, sağlıklı insan bronşiyal epitel hücre hatları (HBE) ile insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatları (NSCLC), PAPP-A salgısı ve protein içeriği bakımından karşılaştırılmış ve akciğer kanseri hücre hatlarından salgılanan PAPP-A önemli ölçüde yüksek olarak ölçülmüştür. Yine aynı çalışmada, PAPP-A'nın aktif olup olmadığını tespit etmek için serum IGFBP-4 seviyeleri ölçülmüş ve akciğer kanseri hücre hatlarında PAPP-A aktifken HBE hücre hatlarında IGFBP-4 parçalanması saptanmadığından PAPP-A'nın aktif olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, tümör oluşumunda ve ilerlemesinde PAPP-A'nın aktif durumda olmasının PAPP-A seviyesinden daha önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Espelund ve ark. (101) akciğer kanseri hastalarının patolojik plevral sıvıları ve serumlarında PAPP-A konsantrasyonlarını ölçmüş, PAPP-A seviyelerinin çalışmada yer alan tüm plevral sıvılarda serumdan yaklaşık 47 kat yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Yine bu çalışmada, bulgularımıza benzer şekilde akciğer kanserinin plevral sıvısında PAPP-A ve IGFBP-4'ün her ikisinde yüksek düzeylerde olduğu gözlenmiştir ve çalışmaya STC-2'de dâhil edilmiştir. Bu hastalarda IGFBP-4 ve STC-2 düzeylerinin pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Sonuçlar STC-2 düzeylerindeki artışın PAPP-A inhibisyona ve dolayısıyla IGFBP-4 düzeylerinde artışa neden olabileceğini desteklemektedir.

Tedavi gören (kemoterapi ve/veya radyoterapi) akciğer kanseri hasta grubu ile kontrol grubunun PAPP-A düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

bulunmadı. Nispeten beklenebilecek bu sonuçlar; tümör hücrelerini hedef alan, tümör büyümesini baskılayıcı tedavilerin; insan vücudunda büyümenin önemli bir düzenleyicisi olan IGF ailesinin bir üyesi olan PAPP-A gibi tümör gelişimini uyaran diğer mekanizmalarla etkileşiminden kaynaklanıyor olabilir (162).

Bu çalışma incelenen 3 parametrenin akciğer kanseri ile olan ilişkisini incelemekle birlikte, kendi aralarındaki ilişkinin incelenmesine olanak sağlamıştır. PAPP-A'nın, IGFBP-4'ü parçalaması IGF'lerin serbest kalmasını sağlar. Aralarındaki bu temel çalışma prensibi dikkate alındığında, PAPP-A ile IGFBP-4 arasında negatif, PAPP-A ile IGF-1 arasında pozitif, IGFBP-4 ile IGF-1 arasında yine negatif bir korelasyon beklenir (4). Çalışmamız kapsamında kontrol grubunun PAPP-A, IGFBP-4 ve IGF-1 düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde IGFBP-4 ile IGF-1 arasında beklenen negatif korelasyon tespit edilmiştir. Hasta grupları incelendiğinde ise bu ilişki görülmemiştir. Hasta ve kontrol gruplarının PAPP-A ve IGFBP-4, IGF-1 düzeyleri arasında bir ilişki tespit edilmemiştir.

IGF-1, IGFBP-4, PAPP-A ilişkisi biyokimyasal olarak kısmen aydınlatılmış olsa da IGF-IGFBP-4-PAPP-A ilişkisine bir şekilde dâhil olan diğer moleküller ve aktiviteleri, IGFBP-4 proteininin IGF bağımsız aktiviteleri, IGFBP-4'ün PAPP-A ile proteolizi sonrası ortaya çıkan IGFBP-4 fragmanlarının sahip olabileceği biyolojik aktiviteler, PAPP-A ekspresyonunun düzenlenmesinin altında yatan mekanizmalar, henüz tam olarak açıklanamamıştır. Hücresel düzende kilit rol oynayan bu moleküllerin çalışma sistemi hakkında daha fazla araştırma yapılması, özellikle kanser hastalığının potansiyel bir biyobelirteci olarak PAPP-A'nın tümör patolojisine nasıl dâhil edildiğinin açıklanmasına yardımcı olacaktır.

PAPP-A ve IGFBP-4'ü kanserle ilişkilendiren çalışmalar, bu moleküllerin tümör hücrelerinin düzenlenmesi üzerine olan pek çok farklı etkisine dikkat çekmektedir (163). Özellikle kanser hastalarında gözlenen yüksek düzeyleri göz ardı edilemez.

Bizler de çalışmamızda, akciğer kanseri hastalarında PAPP-A düzeylerinin yükseldiğini ifade eden tüm çalışmalarla benzer doğrultuda sonuçlar elde ettik, ancak gözlenen yükseklik akciğer kanseri hastasının tanısal bir biyobelirteci olarak kullanılmasının desteklenmesi için yeterli değildir. Çalışmamızda her ne kadar PAPP-A hedeflenmiş olsa da akciğer kanseri hastalarının IGFBP-4 düzeyleri sağlıklı bireylerde oldukça yüksek olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar IGFBP-4'ün kanser patolojisindeki yerini desteklemele birlikte bir kanser biyobelirteci olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.



6. LİMİTASYONLAR

Kontrol grubunun yaş ortalaması hasta grubuna göre daha düşüktür. Kontrol grubunun oluşturulması için dışlama kriterleri belirlenmiştir. Bu dışlama kriterlerinin içerdiği hastalıklara sahip olmayan, yaş olarak hasta grubuna benzer sağlıklı bireyler bulunamamıştır.

Bazı çalışmalara göre serum PAPP-A düzeyinde artışa neden olabileceği düşünülen KOAH hastalığı, çalışmamızda yer alan akciğer kanseri hasta grubunun bir kısmında bulunmaktadır. Akciğer kanseri olup yine bir göğüs hastalığı olan KOAH hastası olmayan birey bulunmasında zorluk yaşanmıştır.

Çalışmada elde ettiğimiz sonuçların bir kısmı gruplar arasında nispeten farklı olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum, özellikle tedavi görmemiş akciğer kanseri hasta grubundaki veri yetersizliğinden kaynaklanıyor olabilir. Veri sayısı artırıldığında tespit edilen yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı bir düzeye ulaşması muhtemeldir.

Tüm numune sayısı 83 olan çalışmamızda, Ultrasensitive PAPP-A ELISA kiti kullanılarak PAPP-A düzeylerinin ölçülmesi sırasında 21 değer kitin okuma sınırı altında kaldığı için ölçülememiştir.

KAYNAKLAR

1. Lin TM, Halbert SP, Kiefer D, Spellacy WN, Gall S. Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins. *Am J Obstet Gynecol* 1974; 118(2):223-236.
2. Lin TM, Halbert SP, Spellacy WN. (1974). Measurement of pregnancy-associated plasma proteins during human gestation. *J Clin Invest* 1974; 54(3):576-582.
3. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, Yates JR, Conover CA. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *PNAS* 1999; 96(6):3149-3153.
4. Conover CA. Key questions and answers about pregnancy-associated plasma protein-A. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(5):242-249.
5. Collett-Solberg PF, Cohen P. Genetics, chemistry, and function of the IGF/IGFBP system. *Endocrine*, 2000; 12(2):121-136.
6. Forbes B, McCarthy P, Norton R. Insulin-like growth factor binding proteins: A structural perspective. *Front endocrino* 2012; 3:38.
7. Boldt HB, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): A local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17.1:10-18.
8. Shimasaki S, Ling N. Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1,-2,-3,-4,-5 and-6). *Progress in growth factor research* 1991; 3(4):243-266.
9. Oxvig, C. The role of PAPP-A in the IGF system: Location, location, location. *Journal of cell communication and signaling* 2015; 9(2):177-187
10. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92.18:1472-1489.
11. Xiao Y, Zhu S, Yin W, Liu X, Hu Y. IGFBP-4 expression is adversely associated with lung cancer prognosis. *Oncology letters* 2017; 14(6):6876-6880.
12. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Pnina B. The Role of the IGF System in Cancer Growth and Metastasis: Overview and Recent Insights. *Endoc Rev* 2007; 28(1):20-47.
13. Damon SE, Maddison L, Ware JL, Plymate SR. Overexpression of an inhibitory insulin-like growth factor binding protein (IGFBP), IGFBP-4, delays onset of prostate tumor formation. *Endocrinology* 1998; 139(8):3456-64.
14. Mikkelsen JH, Resch ZT, Kalra B, Savjani G, Kumar A, Conover CA, Oxvig C. Indirect targeting of IGF receptor signaling in vivo by substrate-selective inhibition of PAPP-A proteolytic activity. *Oncotarget* 2014; 5(4):1014-1025.
15. Mansfield AS, Visscher DW, Hart SN, Wang C, Goetz MP, Oxvig C, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A expression in human breast cancer. *Growth Horm IGF Res* 2014; 24(6):264-267.
16. Dalgin GS, Holloway DT, Liou LS, DeLisi C. Identification and characterization of renal cell carcinoma gene markers. *Cancer informatics* 2007; 3:65-92.
17. Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, Hirashima Y, Kanayama N, Terao T. Genetic downregulation of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) by bikunin reduces IGF-I-dependent Akt and ERK1/2 activation and subsequently reduces ovarian cancer cell growth, invasion and metastasis. *Int J Cancer* 2004; 109(3):336-347.
18. Bulut I, Coskun A, Ciftci A, Cetinkaya E, Altıay G, Caglar T, Gulcan E. Relationship between pregnancy-associated plasma protein-A and lung cancer. *Am J Med Sci* 2009; 337:241-244.

19. Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer. Lung Cancer. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. (erişim tarihi: 03.18.2019) <https://gco.iarc.fr/>
20. Pan H, Hanada S, Zhao J, Mao L, Ma MZQ. Protein secretion is required for pregnancy-associated plasma protein-A to promote lung cancer growth in vivo. *PloS one* 2012; 7(11):48799.
21. De Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: Crystal structure of the complex. *Science* 1992; 255(5042):306-312.
22. Murray PG, Higham CE, Clayton PE. 60 years of neuroendocrinology: The hypothalamo-GH axis: The past 60 years. *J Endocrinol* 2015; 226(2):123-140.
23. Darzy KH, Shalet SM. Pathophysiology of radiation-induced growth hormone deficiency: Efficacy and safety of GH replacement. *Growth Horm IGF Res* 2006; 16:30-40.
24. Møller N, Jørgensen JOL. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocr Rev* 2009; 30(2):152-177.
25. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16:3-34.
26. Pavelić J, Matijević T, Knežević J. Biological and physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *Indian J Med Res* 2007; 125(4):511-522.
27. Le Roith D, Scavo L, Butler A. What is the role of circulating IGF-1?. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12(2):48-52.
28. Le Roith D. Insulin-Like Growth Factors. *N Engl J Med* 1997; 336:633-40.
29. Van Cauter E, Leproult R, Plat L. Age-related changes in slow wave sleep and REM sleep and relationship with growth hormone and cortisol levels in healthy men. *Jama* 2000; 284(7):861-868.
30. Laron, Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): A growth hormone. *Mol Pathol* 2001; 54(5):311.
31. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human IGF-I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978; 253:2769-2776.
32. LeRoith D, Raizada MK. (Eds.). *Molecular Biology and Physiology of Insulin and Insulin-Like Growth Factors*. Berlin: Springer Science & Business Media, 2012.
33. Leroith D, Yakar S. Mechanisms of disease: Metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Nat Rev Endocrinol* 2007; 3(3):302.
34. Harbılı S. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF): Egzersiz metabolizması ve kas dokusu üzerine etkileri. *Genel Tıp Dergisi*; 2008; 18(4):177-184.
35. Lang TF. The bone-muscle relationship in men and women. *Journal of osteoporosis* 2011; 2011(1).
36. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endoc rev* 2000; 21(3):215-244.
37. Bergman D, Halje M, Nordin M, Engström W. Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review. *Gerontology* 2013; 59(3):240-249.
38. El-Shewy HM, Luttrell LM. Insulin-like growth factor-2/mannose-6 phosphate receptors. *Vitam horm* 2009; 80:667-697.
39. Belfiore A. The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *CurrPharm Des* 2007; 13:671-686.
40. Maures T, Chan SJ, Xu B, Ding J, Sun H, Duan C. Structural, biochemical, and expression analysis of two distinct insulin-like growth factor (IGF)-I receptors and their ligands in zebrafish. *Endocrinology* 2002; 143:1858-1871.
41. Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clinical cancer research* 2008; 14(20):6364-6370.
42. Juul A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *GrowthHorm IGF Res* 2003; 13:113-70.
43. Werner H, Weinstein D, Bentov I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: Structures, receptors and signalling pathways. *Arch Physiol Biochem* 2008; 114(1):17-22.

44. Leroith D, Roberts JR, Charles T. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer letters* 2003; 195(2):127-137.
45. Killian JK, Oka Y, Jang HS, Fu X, Waterland RA, Sohda T, Sakaguchi S, Jirtle, R. L. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) variants in American and Japanese populations. *Hum mutat* 2001; 18(1):25-31.
46. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 1997; 18:801-31.
47. Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 2002; 23:824–54.
48. Perks CM, Newcomb PV, Norman MR, Holly JM. Effect of insulin-like growth factor binding protein-1 on integrin signalling and the induction of apoptosis in human breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* 1999; 22:141-50.
49. Russo VC, Azar WJ, Yau SW, Sabin MA, Werther GA. IGFBP-2: The dark horse in metabolism and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26(3):329-346.
50. Boisclair YR, Rhoads RP, Ueki I, Wang J, Ooi GT. The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *J Endocrinol* 2001; 170:63–70.
51. Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, Kley N. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 1995; 377(6550):646.
52. Mohan S, Bautista CM, Wergedal J, Baylink DJ. Isolation of an inhibitory insulin-like growth factor (IGF) binding protein from bone cell-conditioned medium: a potential local regulator of IGF action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(21):8338-8342.
53. Mazerbourg S, Callebaut I, Zapf J, Mohan S, Overgaard M, Monget P. Up date on IGFBP-4: regulation of IGFBP-4 levels and functions, in vitro and in vivo. *Growth Horm IGF Res* 2004; 14(2):71-84.
54. LaTour D, Mohan S, Linkhart TA, Baylink DJ, Strong DD. Inhibitory insulin like growth factor binding protein: Cloning, complete sequence and physiological regulation. *Mol Endocrinol* 1990; 4(12):1806–1814.
55. Bach LA. Insulin-like growth factor binding proteins 4–6, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* 2015; 29(5):713–722.
56. Chelius D, Baldwin MA, Lu X, Spencer EM. Expression, purification and characterization of the structure and disulfide linkages of insulin-like growth factor binding protein-4. *J Endocrinol* 2001; 168: 283–296.
57. Honda Y, Landale EC, Strong DD, Baylink DJ, Mohan S. Recombinant synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-4 IGFBP-4: Development, validation and application of a radioimmunoassay for IGFBP-4 in human serum and other biological fluids. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1389– 1396.
58. Clemmons DR. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 198; 140:19-24.
59. Wang J, Niu W, Witte DP, Chernausk SD, Nikiforov YE, Clemens TL, Sharifi B, Strauch AR, Fagin JA. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4) in smooth muscle cells of transgenic mice through a smooth muscle α -actin-IGFBP-4 fusion gene induces smooth muscle hypoplasia. *Endocrinology* 1998; 139(5):2605-2614.
60. Rosen C, Donahue LR, Hunter S, Holick M, Kavookjian H, Kirschenbaum A, Mohan S, Baylink DJ. The 24/25-kDa serum insulin-like growth factor-binding protein is increased in elderly women with hip and spine fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74(1):24–27.
61. Moreno MJ, Ball M, Andrade MF, McDermid A, Stanimirovic DB. Insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) is a novel anti-angiogenic and anti-tumorigenic mediator secreted by dibutyryl cyclic AMP (dB-cAMP)-differentiated glioblastoma cells. *Glia* 2006; 53(8):845-857.

62. Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature* 2008; 454(7202):345-349.
63. Ueno K, Hirata H, Majid S, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R. IGFBP-4 activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway and induces M-CAM expression in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 129(10):2360-2369.
64. Twigg SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem* 1998; 273(11): 6074-6079.
65. Sorrell AM, Shand JH, Tonner E, Gamberoni M, Accorsi PA, Beattie J, Allan G, Flint DJ. Insulin-like growth factor-binding protein-5 activates plasminogen by interaction with tissue plasminogen activator, independently of its ability to bind to plasminogen activator inhibitor-1, insulin-like growth factor-I, or heparin. *J Biol Chem* 2006; 281(16):10883-10889.
66. Bach LA. Insulin-like growth factor binding proteins 4-6. Best practice & research: Clinical endocrinology & metabolism 2015; 29(5):713-722.
67. Ruan W, Xu E, Xu F, Ma Y, Deng H, Huang Q, Lv B, Hu H, Lin J, Cui J, Di M, Dong J, Lai M. IGFBP7 plays a potential tumor suppressor role in colorectal carcinogenesis. *Cancer biology & therapy* 2007; 6(3):354-359.
68. Akiel M, Rajasekaran D, Gredler R, Siddiq A, Srivastava J, Robertson C, Jariwala NH, Fisher PB, Sarkar D. Emerging role of insulin-like growth factor-binding protein 7 in hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatocellular carcinoma* 2014; 1:9-19.
69. Bunn RC, Fowlkes JL. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14(4):176-181.
70. Cohen P, Graves HC, Peehl DM, Kamarei M, Giudice LC, Rosenfeld RG. Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(4):1046-1053.
71. Conover C A, Oxvig C, Overgaard MT, Christiansen M, Giudice LC. Evidence that the insulin-like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy associated plasma protein-A. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(12):4742-4745.
72. Overgaard MT, Boldt HB, Laursen LS, Sottrup-Jensen L, Conover CA, Oxvig C. Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 proteinase. *J Biol Chem* 2001; 276(24):21849-21853.
73. Yan X, Baxter RC, Firth SM. Involvement of pregnancy-associated plasma protein-A2 in insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 proteolysis during pregnancy: a potential mechanism for increasing IGF bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(3):1412-1420.
74. Hjortebjerg R. IGFBP-4 and PAPP-A in normal physiology and disease. *Growth Horm IGF Res* 2018; 41:7-22.
75. Boldt HB, Overgaard MT, Laursen LS, Weyer K, Sottrup-Jensen L, Oxvig C. Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): Classification as a metzincin. *Biochem J*, 2001, 358.2: 359-367.
76. Overgaard MT, Haaning J, Boldt HB, Olsen IM, Laursen LS, Christiansen M, Gleich GJ, Sottrup-Jensen L, Conover CA, Oxvig C. Expression of recombinant human pregnancy-associated plasma protein-A and identification of the proform of eosinophil major basic protein as its physiological inhibitor. *J Biol Chem* 2000; 275(40):31128-31133.
77. Qin QP, Christiansen M, Oxvig C, Pettersson K, Sottrup-Jensen L, Koch C, Norgaard-Pedersen B. Double-monoclonal immunofluorometric assays for pregnancy-associated plasma protein A/proeosinophil major basic protein (PAPP-A/proMBP) complex in first-trimester maternal serum screening for Down syndrome. *Clin Chem* 1997; 43(12):2323-2332.

78. Resch ZT, Oxvig C, Bale LK, Conover CA. Stress activated signaling pathways mediate the stimulation of pregnancy associated plasma protein-A expression in cultured human fibroblasts. *Endocrinology* 2006; 147(2):885–890.
79. Muhl H, Pfeilschifter J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon gamma. *Int Immunopharmacol* 2003; 3(9) :1247–1255
80. Laursen LS, Kjaer-Sorensen K, Andersen MH, Oxvig C. Regulation of insulin- like growth factor (IGF) bioactivity by sequential proteolytic cleavage of IGF binding protein-4 and-5. *Mol Endocrinol* 2007; 21(5):1246–1257.
81. Ning Y, Schuller AG, Conover CA, Pintar JE. Insulin-like Growth Factor (IGF) binding protein-4 is both a positive and negative regulator of IGF activity in vivo. *Mol Endocrinol* 2008; 22(5):1213–25.
82. Boldt HB, Kjaer-Sorensen K, Overgaard MT, Weyer K, Poulsen CB, Sottrup-Jensen L, Conover CA, Giudice LC, Oxvig C (2004) The Lin12-notch repeats of pregnancy-associated plasma protein-A bind calcium and determine its proteolytic specificity. *J Biol Chem* 279: 38525–38531
83. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69(3):562–573
84. Chang AC, Hook J, Lemckert FA, McDonald MM, Nguyen MA, Hardeman EC, Little DG, Gunning PW, Reddel RR. The murine stanniocalcin 2 gene is a negative regulator of postnatal growth. *Endocrinology* 2008; 149(5):2403–2410.
85. Kloverpris S, Mikkelsen JH, Pedersen JH, Jepsen MR, Laursen LS, Petersen SV Oxvig C. Stanniocalcin-1 potently inhibits the proteolytic activity of the metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein-A. *J Biol Chem* 2015; 290(36):21915–21924.
86. Gagliardi AD, Kuo EY, Raulic S, Wagner GF, DiMattia GE. Human stanniocalcin-2 exhibits potent growth-suppressive properties in transgenic mice independently of growth hormone and IGFs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(1):92–105.
87. Gyrupe C, Christiansen M, Oxvig C. Quantification of proteolytically active pregnancy-associated plasma protein-A with an assay based on quenched fluorescence. *Clin Chem* 2007; 53(5):947–954.
88. Guibourdenche J, Frendo JL, Pidoux G, Bertin G, Luton D, Muller F, Porquet D, Evain-Brion, D. Expression of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) during human villous trophoblast differentiation in vitro. *Placenta* 2003; 24(5):532-539.
89. Chen BK, Leiferman KM, Pittelkow MR, Overgaard MT, Oxvig C, Conover CA. Localization and regulation of pregnancy-associated plasma protein a expression in healing human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(9):4465-4471.
90. Miller, B. S., Bronk, J. T., Nishiyama, T., Yamagiwa, H., Srivastava, A., Bolander, M. E., & Conover, C. A. Pregnancy associated plasma protein-A is necessary for expeditious fracture healing in mice. *J endocrinol* 2007; 192(3):505-513.
91. Gruber HE, Buchanan L, Ingram JA, Zinchenko N, Norton HJ, Hanley Jr EN. The relationship between pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and human intervertebral disc degeneration. *Histol Histopathol* 2010; 25(10):1431.
92. Rehage M, Mohan S, Wergedal JE, Bonafede B, Tran K, Hou D, Phang D, Kumar A, Qin, X. Transgenic overexpression of pregnancy-associated plasma protein-A increases the somatic growth and skeletal muscle mass in mice. *Endocrinology* 2007; 148(12):6176-6185.
93. Wood TL, Rogler LE, Czick ME, Schuller AG, Pintar JE. Selective alterations in organ sizes in mice with a targeted disruption of the insulin-like growth factor binding protein-2 gene. *Mol Endocrinol* 2000; 14(9):1472–1482.
94. Conover CA, Bale LK. Loss of pregnancy-associated plasma protein A extends lifespan in mice. *Aging cell* 2007; 6(5):727-729.
95. Conover CA. Role of PAPP-A in aging and age-related disease. *Exp Gerontol* 2013; 48(7):612-613.

96. Bale LK, Chakraborty S, Conover CA. Inducible reduction in pregnancy-associated plasma protein-A gene expression inhibits established atherosclerotic plaque progression in mice. *Endocrinology* 2014; 155(4):1184–1187.
97. Boldt HB, Bale LK, Resch ZT, Oxvig C, Overgaard MT, Conover CA. Effects of mutated pregnancy-associated plasma protein-a on atherosclerotic lesion development in mice. *Endocrinology* 2013; 154(1):246-252.
98. Baxter R. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(5):329.
99. Sell C, Dumenil G, Deveaud C, Miura M, Coppola D, DeAngelis T, Rubin R, Efstratiadis A, Baserga, R. Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1994; 14(6).
100. Takabatake Y, Oxvig C, Nagi C, Adelson K, Jaffer S, Schmidt H, Keely PJ, Eliceiri KW, Mandeli J, Germain D. Lactation opposes pappalysin-1-driven pregnancy-associated breast cancer. *EMBO mol med* 2016; 8(4):388-406.
101. Espelund US, Bjerre M, Hjortebjerg R, Rasmussen TR, Lundby A, Hoefflich A, Folkersen BH, Oxvig C, Frystyk J. IGF bioactivity, Stanniocalcin-2, PAPP-A, and IGFBP-4 in pleural fluid and serum from patients with pulmonary disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102(9):3526–3534.
102. Kuhajda FP, Eggleston JC. Pregnancy-associated plasma protein A. A clinically significant predictor of early recurrence in stage I breast carcinoma is independent of estrogen receptor status. *Am J Pathol* 1985; 121(2):342–348.
103. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6):394-424.
104. Alteri R, Bertaut T, Brooks D, Chambers W, Chang E, Chen MS. Cancer Facts and Figures is an annual publication of the American Cancer Society. Atlanta, Georgia 2016; 23.
105. Sencan İ, Keskinçilic B. Türkiye kanser istatistikleri. 2017.
106. Culbertson MR. RNA surveillance: unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet* 1999; 15(2):74-80.
107. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
108. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646.
109. Stewart BW, Wild CP. World cancer report 2014.
110. Bartolome JM, Sartorius N. Classification of mental diseases. From Bertillon to CID-10: a century of international collaboration. *Actas Luso Esp Neurol Psiquiatr Cienc* 1994; 22(5):193-199.
111. Peto J. That the effects of smoking should be measured in pack-years: misconceptions 4. *Br J Cancer* 2012; 107:406– 407.
112. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins Cotran, Pathologic Basis of Disease, 7th edition, Philadelphia: E Saunders; 2005, p.711-773.
113. Woenckhaus M, Klein-Hitpass L, Grepmeier U, Merk J, Pfeifer M, Wild PJ, Bettstetter M, Wuensch P, Blaszyk H, Hartmann A, Hofstaedter F, Dietmaier W. Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers. *J Pathol* 2006; 210(2):192-204.
114. Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene* 2002; 21(45):6915.
115. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF Minna JD. Lung Cancer: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax*. 2003; 58(10):892-900.
116. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2007; 75(1):56-63.
117. Zhang J, Fujimoto J, Zhang J, Wedge DC, Song X, Zhang J, Seth S, Chow C, Cao1 Y, Gumbs C, Gold KA, Kalhor N, Little L, Mahadeshwar H, Moran C, Protopopov A, Sun H, Tang J, Wu

- X, Ye Y, William WN, Lee JJ, Heymach JV, Ki Hong W, Swisher S, Wistuba II, Futreal PA. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science* 2014; 346(6206):256-259.
118. Wood SL, Pernemalm M, Crosbie PA, Whetton AD. Molecular histology of lung cancer: from targets totreatments. *Cancer Treat Rev*; 41(4):361-375.
 119. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer. *Chest* 2003; 123(1): 97- 104
 120. Lung and Bronchus Cancer. National Cancer Institute. (Erişim tarihi: 02.20.2018) <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
 121. SUNG, Hye-Jin; CHO, Je-Yoel. Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics. *BMB reports* 2008, 41(9): 615-625.
 122. CHO, William Chi-Shing. Potentially useful biomarkers for the diagnosis, treatment and prognosis of lung cancer. *Biomed Pharmacother* 2007; 61(9):515-519.
 123. Nicholson SA, Beasley MB, Brambilla E, Hasleton PS, Colby TV, Sheppard MN, Falk RMS, Travis, W. D. Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(9):1184-1197.
 124. Peifer M, Fernández-Cuesta L, Sos ML, George J, Seidel D, Kasper LH, Plenker D, Leenders F, Sun R, Zander T, Menon R, Koker M, Dahmen I, Müller C, Di Cerbo V, Schildhaus HU, Altmüller J, Baessmann I, Becker C, Wilde B, Vandesompele J, Böhm D, Ansén S, Gabler F, Wilkening I, Heynck S, Heuckmann JM, Lu X, Carter SL, Cibulskis K, Banerji S, Getz G, Park KS, Rauh D, Grütter C, Fischer M, Pasqualucci L, Wright G, Wainer Z, Russell P, Petersen I, Chen Y, Stoelben E, Ludwig C, Schnabel P, Hoffmann H, Muley T, Brockmann M, Engel-Riedel W, Muscarella LA, Fazio WM, Groen H, Timens W, Sietsma H, Thunnissen E, Smit E, Heideman DAM, Snijders PJF, Cappuzzo F, Ligorio C, Damiani S, Field J, Solberg S, Brustugun OT, Lund-Iversen M, Sängler J, Clement JH, Soltermann A, Moch H, Weder W, Solomon B, Soria JC, Validire P, Besse B, Brambilla E, Brambilla C, Lantuejoul S, Lorimier P, Schneider PM, Hallek M, Pao W, Meyerson M, Sage J, Shendure J, Schneider R, Büttner R, Wolf J, Nürnberg P, Perner S, Heukamp LC, Brindle PK, Haas S, Thomas RK. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat genet* 2012; 44(10):1104.
 125. Dreijerink KM, Höppener JW, Timmers HM, Lips CJ. Mechanisms of disease: Multiple endocrine neoplasia type 1 relation to chromatin modifications and transcription regulation. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2(10):562–570.
 126. Gorman G. New and emerging strategies for the treatment of small cell lung cancer. *J Pharm Sci Emerg Drugs* 2012; 1(1):1–2.
 127. Ogimoto I, Shibata A, Fukuda K. World Cancer Research fund/american institute of cancer research 1997 recommendations: Applicability to digestive tract cancer in Japan. *Cancer Causes Control* 2000; 11(1): 9-23.
 128. Alberts WM. Diagnosis and management of lung cancer executive summary: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2007; 132(supp 3):1S-19S.
 129. Charloux A, Quoix E, Wolkove N, Small D, Pauli G, Kreisman H. The increasing incidence of lung adenocarcinoma: reality or artefact? A review of the epidemiology of lung adenocarcinoma. *J Epidemiol* 1997; 26(1):14-23.
 130. Suzuki M, Shigematsu H, Iizasa T, Hiroshima K, Nakatani Y, Minna JD, Gazdar AF, Fujisawa T. Exclusive mutation in epidermal growth factor receptor gene, HER-2, and KRAS, and synchronous methylation of nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2006; 106(10):2200-2207.
 131. Stelter AA, Xie J. Molecular oncogenesis of lung cancer. in *Molecular Pathology of Lung Diseases*. Zan- der DS, Popper HH, Jagirdar J, Haque AK, Cagle PT, Barrios R, Eds. New York: Springer; 2008, 169–175.
 132. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, MokT, Lee C,

- Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007; 316(5827):1039-1043.
133. Pao W, Hutchinson KE. Chipping away at the lung cancer genome. *Nat Med* 2012; 18(3):349–351.
 134. Hammar SP, Brambilla C, Pugatch B, et al. Squamous cell carcinoma. In: Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC, eds. *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon: IARC Press; 2004:26–30.
 135. Khuder SA, Mutgi AB. Effect of smoking cessation on major histologic types of lung cancer. *Chest* 2001; 120(5):1577-1583.
 136. Hammerman PS, Hayes DN, Wilkerson MD et al.; Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012; 489(7417):519–525.
 137. Brambilla E, Pugatch B, Geisinger K, Gal A, Sheppard MN, Guinee DG. Large cell carcinoma. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart* 2004; 48.
 138. Jiang SX, Kameya T, Shoji M, Dobashi Y, Shinada J, Yoshimura H. Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: a histologic and immunohistochemical study of 22 cases. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(5):526-38.
 139. Eleazar JA, Borczuk AC. Molecular pathology of large cell carcinoma and its precursors. in *Molecular Pathology of Lung Diseases*. Zander DS, Popper HH, Jagirdar J, Haque AK, Cagle PT, Barrios R (Eds), New York: Springer; 2008:279–292.
 140. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The New Lung Cancer Staging System. *Chest* 2009; 136(1):260-271.
 141. Compton CC, Byrd DR, Garcia-Aguilar J, Kurtzman SH, Olawaiye A, Washington MK. (Eds.). *AJCC Cancer Staging Atlas: A Companion to the Seventh Editions of the AJCC Cancer Staging Manual and Handbook*. Berlin: Springer Science & Business Media, 2012.
 142. Rami-Porta R, Bolejack V, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2015; 10(7): 990-1003.
 143. Asamura H, Chansky K, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the N Descriptors in the Forthcoming 8th Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2015; 10(12): 1675-84.
 144. Eberhardt WE, Mitchell A, Crowley J, Kondo H, Kim YT, Turrisi A 3rd, Goldstraw P, Rami-Porta R. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the M Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2015; 10(11): 1515-22.
 145. Zhao L, Sun L, Chu X. Chemiluminescence immunoassay. *Trends in Analytical Chemistry*, 2009; 28(4):404-415.
 146. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol* 2013; 133(9):12.
 147. Macaulay VM, Teale JD, Everard MJ, Joshi GP, Smith IE, Millar JL. Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I is a mitogen for human small cell lung cancer. *Brit J Cancer* 1988; 57(1):91.
 148. London SJ, Yuan JM, Travlos GS, Gao YT, Wilson RE, Ross RK, Yu, MC. Insulin-like growth factor I, IGF-binding protein 3, and lung cancer risk in a prospective study of men in China. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(10):749–754.
 149. Lukanova A, Toniolo P, Akhmedkhanov A, Biessy C, Haley NJ, Shore RE, Riboli E, Rinaldi S, Kaaks R. A prospective study of insulin-like growth factor-I, IGF-binding proteins-1, -2 and -3 and lung cancer risk in women. *Int J Cancer* 2001; 92(6):888–92.
 150. Kim WY, Jin Q, Oh SH, Kim ES, Yang YJ, Lee DH, Feng L, Behrens C, Prudkin L, Miller YE, Lee JJ, Lippman SM, Hong WK, Wistuba II, Lee HY. Elevated epithelial insulin-like growth

- factor expression is a risk factor for lung cancer development. *Cancer res* 2009; 69(18):7439-7448.
151. Izycski T, Chyczewska E, Naumnik W, Ossolinska M. Serum levels of IGF-I and IGFBP-3 in patients with lung cancer during chemotherapy. *Oncol Res Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* 2006; 16(1):49-54.
 152. Hall K, Enberg G, Ritzén M, Svan H, Fryklund L, Takano K. Somatomedin A levels in serum from healthy children and from children with growth hormone deficiency or delayed puberty. *Eur J Endocrinol* 1980; 94(2):155-165.
 153. Yu H, Mistry J, Nicar MJ, Khosravi MJ, Diamandis A, van Doorn J, Juul A. Insulin-like growth factors (IGF-I, free IGF-I and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in blood circulation. *J Clin Lab Anal.* 1999; 13(4):166–172.
 154. Junnila RK, List EO, Berryman DE, Murrey JW, Kopchick JJ. The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2013; 9(6):366.
 155. Kubasiak JC, Seder CW, Pithadia R, Basu S, Fhied C, Phillips WW, Daly S, Shersher DD, Yoder MA, Chmielewski G, Edell ES, Maldonado F, Liptay MJ, Borgia JA. Value of circulating insulin-like growth factor–associated proteins for the detection of stage I non–small cell lung cancer. *Thorac Cardiovasc Surg* 2015; 149(3):727-734.
 156. Sato H, Sakaeda M, Ishii J, Kashiwagi K, Shimoyamada H, Okudela K, Tajiri M, Ohmori T, Ogura T, Woo T, Masuda M, Hirata K, Kitamura H, Yazawa T. Insulin-like growth factor binding protein-4 gene silencing in lung adenocarcinomas. *Pathol Int* 2011; 61(1):19-27.
 157. Damon SE, Maddison L, Ware JL, Plymate SR. Overexpression of an inhibitory insulin-like growth factor binding protein (IGFBP), IGFBP-4, delays onset of prostate tumor formation. *Endocrinology* 1998; 139(8):3456–64.
 158. Yang B, Zhang L, Cao Y, Chen S, Cao J, Wu D, Chen J, Xiong H, Pan Z, Qiu F, Chen J, Ling X, Yan M, Huang S, Zhou S, Li T, Yang L, Huang Y, Lu J. Overexpression of lncRNA IGFBP4–1 reprograms energy metabolism to promote lung cancer progression. *Molecular cancer* 2017; 16(1):154.
 159. Conover CA. PAPP-A: a new anti-aging target? *Aging cell* 2010; 9(6):942-946.
 160. Boldt HB, Conover CA. Overexpression of pregnancy-associated plasma protein-A in ovarian cancer cells promotes tumor growth in vivo. *Endocrinology* 2011; 152(4):1470-1478.
 161. Salim H, Arvanitis A, de Petris L, Kanter L, Haag P, Zovko A, Ozata DM, Lui WO, Lundholm L, Zhivotovsky B, Lewenson R, Viktorsson K. miRNA-214 is related to invasiveness of human non-small cell lung cancer and directly regulates alpha protein kinase 2 expression. *Genes Chromosomes Cancer* 2013; 52(10):895–911.
 162. Chander H, Halpern M, Resnick-Silverman L, Manfredi JJ, Germain D. Skp2B overexpression alters a prohibitin-p53 axis and the transcription of PAPP-A, the protease of insulin-like growth factor binding protein 4. *PloS one* 2011; 6(8): 22456.
 163. Conover CA, Oxvig C. 40 years of IGF1: PAPP-A and cancer. *J Mol Endocrinol* 2018; 61(1): 1-10.

EK 1. Çalışma kapsamında elde edilen veriler

KODU	Cinsiyet	Yaş	Akciğer Kanserinin Histolojik Tipi	8.TNM Evresi	Sigara Kullanımı	Tedavi	IGF-1 (ng/mL)	IGFBP-4 (ng/mL)	PAPP-A (ng/mL)
H1	E	46	AK	IVA	+	-	171	96	2,30
H2	E	62	AK	IIB	+	-	171	107,8	
H3	E	66	SHK	IVA	+	-	82,8		3,28
H4	E	59	AK	IVA	+	-	130	159	3,04
H5	E	63	KHK	IVA	-	-	155	175	4,48
H6	E	78	AK	IVA	-	-	100	252	4,73
H7	K	52	AK	IVA	-	-	61,7	227	18,6
H8	E	69	KHK	IVA	-	-	73,2	52,8	4,98
H9	E	72	KHK	IIIB	+	-	125	180,5	
H10	K	71	KHK	IVA	-	-	90,6	206	2,04
H11	E	49	KHK	IIIC	+	-	135	122	2,17
H12	E	41	SHK	IVA	+	-	117	161	5,97
H13	E	73	KHK	IVA	-	-	90,3	107,8	2,30
H14	E	45	AK	IVA	+	-	95	129	5,48
H15	E	65	AK	IVA	+	-	67,2	352,5	5,23
H16	E	49	KHK	IIIA	+	-	182	147	8,87
H17	E	71	SHK	IIIB	+	-	139	165,6	1,77
H18	E	69	SHK	IVA	+	-	51,7	228,6	27,6

H19	E	59	AK	IIIB	+	-	141	102	3,60
H20	E	61	SHK	IIB	+	-	189	194	16,5
H21	E	77	AK	IA	-	-	130	188,8	2,83
H22	K	60	KHK	IIIB	+	-	114	208	0,65
H23	E	54	SHK	IA	+	-	161	104,5	
H24	E	65	D	IVA	-	-	125	105,6	
H25	E	59	D	IB	+	+	116	165	3,22
H26	E	56	KHK	IVA	+	+	127	179,6	
H27	E	56	KHK	IVA	-	+	83,8	149	3,09
H28	E	55	SHK	IVA	+	+	152	161,6	2,30
H29	E	64	SHK	IIIA	+	+	120	257,5	
H30	E	55	AK	IVA	+	+	144	137,4	2,96
H31	E	75	SHK	IIA	-	+	194	170,4	8,4
H32	E	52	SHK	IIB	-	+	217	90,6	2,57
H33	E	75	SHK	IVA	-	+	126	152,4	
H34	K	57	AK	IVA	-	+	129	132	0,5
H35	K	62	SHK	IVA	-	+	159	181,3	3,85
H36	K	68	D	IIIA	-	+	60	172	
H37	K	57	SHK	IVA	+	+	143	87	3,47
H38	E	60	KHK	IVA	+	+	108	145,5	
H39	E	66	KHK	IIIB	+	+	82,8	135,6	2,83

H40	E	70	SHK	IVA	+	+	131	118,3	
H41	E	56	KHK	IVA	+	+	86,2	103,4	7,32
H42	E	70	KHK	IA	+	+	144	237,18	
H43	E	65	SHK	IVA	+	+	162	217	0,94
H44	E	46	AK	IVA	+	+	170	100	0,65
H45	E	66	SHK	IVA	-	+	137	141	6,22
H46	E	62	SHK	IVA	-	+	188	195,4	2,04
H47	E	70	D	IA	+	+	142	126	
H48	E	52	AK	IVA	+	+	61	104,5	8,27
H49	E	62	SHK	IVA	+	+	157	188,8	7,31
H50	E	48	AK	IIIB	+	+	127	112	2,57
H51	E	63	AK	IIIB	+	+	142	407,3	
H52	K	54	SHK	IVA	-	+	133	159	0,79
H53	E	68	KK	IIIB	+	+	145	149,8	1,36
H54	K	54	KHK	IIIB	+	+	140	148,1	
H55	E	71	SHK	IIIA	+	+	85	83,09	0,94
H56	K	59	KHK	IIIA	+	+	145	107,8	1,77
H57	K	48	AK	IIIA	-	+	172	113	
H58	E	60	AK	IVA	+	+	226	235,8	5,35
H59	E	67	KHK	IIIA	-	+	89,1	284	
H60	E	56	SHK	IVA	+	+	294	244	1,36
K1	E	58			-		138	111,5	4,17

K2	E	47			-		145	86,9	4,48
K3	K	47			-		101	111	
K4	K	45			-		85,4	114	1,32
K5	E	74			-		95,7	138,3	11,1
K6	E	40			-		136	104,5	5,851
K7	K	44			-		138	67,689	1,9
K8	K	48			-		174	64,6	2,96
K9	K	44			-		136	79,1	2,57
K10	E	48			-		107	112	3,85
K11	E	74			-		104	172,8	
K12	K	44			-		148	89,43	2,17
K13	E	53			-		130	96,63	5,11
K14	K	64			-		115	129	2,57
K15	K	48			-		105	142	3,34
K16	K	46			-		85,5	56,36	
K17	K	48			-		140	94,2	
K18	K	46			-		125	81,7	4,36
K19	K	51			-		86,3	160	1,63
K20	E	50			-		156	97,8	0,94
K21	E	48			-		110	128	2,83
K22	E	50			-		142	77,75	1,36
K23	E	50			-		93,5	126	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İREM NUR	Soyadı	SAVAŞ
Doğum Yeri	BAKIRKÖY	Doğum Tarihi	12.08.1992
Uyruğu	T.C.	Telefon	5376027169
E-mail	iremnuryasa@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Acıbadem Üniversitesi	2019
Lisans	Fatih Üniversitesi	2014
Lise	Özel Safiye Sultan Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Stajyer	Meditaş	-2013
2.	Stajyer	Özel Medical Park Hastanesi	-2012
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE	Diğer

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	63.67		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
R-Project	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer