

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**AKCİĞER KANSERİNDE DOKU VE SERUM
VEGF, ANJİOPOİETİN-1 VE ANJİOPOİETİN-2
DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. NURHİLAL YUSUFOĞLU

İZMİR-2011

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından **2009.KB. SAG. 054** sayı ile desteklenmiştir.

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**AKCİĞER KANSERİNDE DOKU VE SERUM
VEGF, ANJİOPOİETİN-1 VE ANJİOPOİETİN-2
DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. NURHİLAL YUSUFOĞLU

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Prof. Dr. HÜRAY İŞLEKEL

İZMİR-2011

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından **2009.KB. SAG. 054** sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
Tablo Listesi.....	i
Şekil Listesi.....	ii
Grafik Listesi.....	iii
Kısaltmalar.....	iv
Teşekkür.....	vi
Özet.....	1
Abstract.....	3
<u>1. GİRİŞ VE AMAC</u>	5
<u>2. GENEL BİLGİLER</u>	7
2.1. AKCİĞER KANSERİ	7
2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.....	7
2.1.2. Akciğer Kanserinde Etyoloji.....	7
2.2. AKCİĞER KANSERİNİN HİSTOLOJİK SINIFLAMASI	10
2.2.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserleri.....	13
2.2.1.1. Skuamoz Hücreli Karsinom.....	13
2.2.1.2. Adenokarsinom.....	13
2.2.1.3. Büyük Hücreli Karsinom.....	13
2.2.2. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri.....	13
2.3. AKCİĞER KANSER EVRELEMESİ	15
2.4. ANJİOGENEZ	18

2.5. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF).....	23
2.5.1. VEGF Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	25
2.5.2. VEGF Reseptörleri.....	26
2.5.3. VEGF Reseptör Aktivasyon Mekanizması.....	29
2.6. ANJİOPOİETİNLER.....	30
<u>3.GEREC VE YÖNTEMLER.....</u>	38
3.1. ARAÇ VE GEREÇLER.....	38
3.1.1. Cihazlar ve Kitler.....	38
3.2. OLGULARIN SEÇİMİ, ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI.....	39
3.3. DOKU HOMOJENİZASYONU.....	39
3.4. BİYOKİMYA ANALİZLERİ.....	40
3.4.1.VEGF Ölçüm Yöntemi.....	40
3.4.2. Anjiopietin -1 Ölçüm Yöntemi.....	43
3.4.3. Anjiopietin-2 Ölçüm Yöntemi.....	46
3.4.4. Total Protein Ölçümü.....	49
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	50
3.5.1. Verilerin Kaydedilmesi.....	50
3.5.2. Verilerin Analizi ve Tablolar ile Gösterilmesi.....	50
<u>4. BULGULAR.....</u>	52
4.1. ÇALIŞMA GRUBUNU TANIMLAYICI BULGULAR.....	52
4.1.1. Çalışma Grubu.....	52

4.2. SERUM VE DOKUDA VEGF, ANG-1, ANG-2 DÜZEYLERİ.....	55
4.2.1. VEGF, Anjiopietin-1, Anjiopietin-2 Tekrarlanabilirlikleri.....	55
4.2.2. Hasta ve Kontrol Gruplarında Serum VEGF, Ang-1, Ang-2 Düzeyleri.....	55
4.2.3. Tümör ve Normal Akciğer Dokusunda VEGF, Ang-1, Ang-2 Düzeyleri.....	57
4.2.4. Serum VEGF, Ang-1, Ang-2 Düzeylerinin Akciğer Kanseri Klinikopatolojik Parametrelerine göre Karşılaştırılması	61
4.2.5. Tümör Dokusunda VEGF, Ang-1, Ang-2 Düzeylerinin Akciğer Kanseri Klinikopatolojik Parametrelerine göre Karşılaştırma	63
4.3. KORELASYON ANALİZLERİ.....	65
<u>5. TARTIŞMA.....</u>	67
<u>6.ÖNERİLER.....</u>	74
<u>7.KAYNAKLAR ve EKLER.....</u>	75
7.1. KAYNAKLAR.....	75
7.2. EKLER.....	79

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Malign akciğer tümörlerinde histolojik sınıflandırma.....	10
Tablo 2: Akciğer kanseride histopatolojik tümör tiplerinin farklı özellikleri.....	14
Tablo 3: Küçük Hücreli Dışı Akciğer kanserlerinde evrelendirme.....	15
Tablo 4: Küçük Hücreli Akciğer kanserinde evrelendirme	15
Tablo 5: UICC 7. Akciğer kanseri evrelenmesinde T (Tümör) tanımlayıcısı.....	16
Tablo 6: UICC 7. Akciğer kanseri evrelenmesinde N (Lenf Nodu) tanımlayıcısı	17
Tablo 7: UICC 7. Akciğer kanseri evrelenmesinde M (Metastaz) tanımlayıcısı	17
Tablo 8: Endojen anjiogenik ve anti-anjiogenik faktörler.....	22
Tablo 9: VEGF reseptör ligantları ve heparan sülfat proteoglikanları bağlayan VEGF ailesi izoformları.....	26
Tablo 10: Çalışmada kullanılan cihazlar.....	38
Tablo 11: Çalışmada kullanılan kitler.....	38
Tablo 12: Hasta ve kontrol grubu yaş ortalamaları.....	54
Tablo 13: Hasta ve kontrol serum VEGF, ang-1, ang-2, düzeyleri.....	55
Tablo 14: Tümör dokusu ve normal akciğer dokusu VEGF, ang-1,ang-2 düzeyleri.....	57
Tablo15: Serum VEGF, ang-1, ang-2 düzeylerinin akciğer kanseri klinikopatolojik parametrelere göre karşılaştırılması	61
Tablo16: Tümör dokusu VEGF, ang-1, ang-2 düzeylerinin akciğer kanseri klinikopatolojik parametrelere göre karşılaştırılması	63
Tablo 17: Korelasyon analizleri.....	66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Anjiogenez basamakları.....	19
Şekil 2: Anjiogenez basamakları.....	21
Şekil 3: VEGF'in monomer ve dimerize formu.....	24
Şekil 4: VEGF A, B, C, D genetik yapısı.....	25
Şekil 5: VEGF ailesi ligantları ve reseptörleri.....	28
Şekil 6: VEGFR'lerinin aktivasyon mekanizması.....	29
Şekil 7: Angiopoietin ailesinin yapısal organizasyonu.....	30
Şekil 8: Tie reseptör yapısı.....	31
Şekil 9: Aktive tümör endotelinde ve normal damarlarda angiopoietin sinyalizasyonu.....	33
Şekil 10: Angiopoietinlerin reseptöre bağlanmasının yapısal organizasyonu.....	35
Şekil 11: Angiopoietinlerin sinyalizasyon düzenlenmesi.....	36
Şekil 12: Damar yapılanmasında multifaktöryal regülasyon.....	37
Şekil 13: Akciğer kanser hastalarının patolojik tanılarına göre dağılımı.....	52
Şekil 14: Akciğer kanser hastalarının tümör differansiyasyonlarına göre dağılımı.....	53
Şekil 15: Akciğer kanser hastalarının cinsiyet dağılımı.....	53
Şekil 16: Kontrol grubu cinsiyet dağılımı	54

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: Serum VEGF standart eğrisi.....	42
Grafik 2: Doku VEGF standart eğrisi	43
Grafik 3: Serum Angiopoietin-1 .standart eğrisi	45
Grafik 4: Doku Angiopoietin-1 standart eğrisi	46
Grafik 5: Serum Angiopoietin-2 standart eğrisi	48
Grafik 6: Doku Angiopoietin-2 standart eğrisi	49
Grafik 7: Protein standart eğrisi	50
Grafik 8: Hasta ve kontrol grubu arasında serum angiopoietin-2 düzeyleri (box-plot).....	56
Grafik 9: Tümör ve eşlenik normal akciğer dokusunda VEGF düzeyleri (box-plot).....	58
Grafik 10: Tümör ve eşlenik normal akciğer dokusunda angiopoietin-1 düzeyleri(box-plot).	59
Grafik 11: Tümör ve eşlenik normal akciğer dokusunda angiopoietin-2 düzeyler(box-plot).	60

KISALTMALAR

KHAK: Küçük hücreli akciğer kanseri

KHDAK: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

BAK: Bronşioalveolar karsinomlar

T: Tümör

N: Lenf nodu

M: Metastaz

VPF: Vasküler permeabilite faktörü

EGF: Epidermal büyüme faktörü

TGF- β : Transforming büyüme faktör β

KGF:Keratosit büyüme faktörü

IGF:İnsulin benzeri büyüme faktörü

VHL:Von Hippel Lindau

Nrp-1:Neuropilin -1

Nrp-2: Neuropilin-2

ANG-1:Anjiopietin 1

ANG-2:Anjiopietin 2

ANG-3:Anjiopietin 3

ANG-4:Anjiopietin 4

PI3K: Fosfatidilinozitol-3-kinaz

PAK: p21 aktive protein kinaz

ELISA: Enzim-linked immunosorbent assay- Enzim bağlı immünosorbent ölçüm

HRP: Horse radish peroxidase

IL: İnterlökin

IHK: İmmunohistokimya

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilimsel birikimleriyle bana yardımcı olan, yetişmemde emeği geçen; başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Canan ÇOKER'e ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Tez çalışmalarım süresince bilimsel olarak bana yol gösteren, tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hüseyin İŞLEKEL'e ;

Tez hastalarımın toplanması konusunda bana destek olan Sayın Prof. Dr. Nezihe ÖZDEMİR ve Sayın Doç. Dr. Aydın ŞANLI'ya ;

Tez çalışmalarımda bana yardımcı olan Sayın Prof.Dr. Semra KOÇTÜRK'e ve Sayın Prof.Dr. Halil REŞMİ'ye

Tezimi hazırlama sürecinde her zaman yanımda olan, bu zorlu süreçte bana destek olan, Sayın Doç Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Tuncay KÜME'ye ;

Uzmanlık eğitimim boyunca arkadaşlık, dostluk ve sevgilerini esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma, bana her konuda destek olan ve hep yanımda olan Dr. Rabia KIYAK, Dr. Ayşegül SAMUR'a;

Çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Merve AKIŞ ve Melis KANT'a ;

Tez ve diğer tüm evraklarımın takibinde büyük duyarlılık gösteren, bana her zaman pozitif enerji veren anabilim dalı sekreterimiz Sayın Eda OLUM'a;

Tez hastalarımın toplanması süresince yardımlarını, sevgilerini ve dostluklarını esirgemeyen ameliyathane personeline;

Beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olan sevgili annem, babam, abim ,ablama, tezimin en yoğun çalışma döneminde bana destek olan sevgili yeğenlerim Aycan DAL ve Cansu DAL'a , bana en önemli manevi desteği veren biricik dostum, arkadaşım, ablam Zeynep DURU'ya sonsuz teşekkür ederim.

Fırtınalı günlerde beni yalnız bırakmayan, herkese teşekkürler...

Saygılarımla;

Dr. Nurhilal YUSUFOĞLU

ÖZET

Akciğer kanseri dünyadaki kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni olup, yılda bir milyondan fazla kişi de ölüme yol açmaktadır. Solit tümörler 2-3 mm³ boyuttan sonra gerekli oksijen ve besin ihtiyacını diffüzyon ile karşılayamaz ve anjiogeneze ihtiyaç duyarlar. Tümörlerde çok sayıda anjiyogenik faktör yanı sıra anti-anjiyogenik faktör de salgılanmaktadır. Tümör anjiyogenezinde kritik rolü olan en önemli anjiyogenik sitokin VEGF proteindir. Anjiopietin-1, reseptörü TIE-2'ye bağlanır ve endotel hücreleri ile çevresindeki ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimi teşvik ederek damarları stabilize eder. Anjiopietin-2 ise yarışmalı olarak TIE-2'ye bağlanır ve anjiopietin-1'in stabilize edici etkisini antagonize ederek damarlarda destabilizasyona yol açar, ancak bazı çalışmalarda Ang-2' nin etkilerinin doz-bağımlı ve değişken olabildiği belirtilmiştir.

Bu çalışmanın amacı akciğer kanser hastalarının serumlarında ve tümörlü-normal eşlenik dokularında bazı anjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin kantitatif olarak belirlenmesi; bu faktörlerin doku ve serum düzeyleri arasındaki ilişkilerin incelenmesi ve klinikopatolojik parametreler ile karşılaştırılmasıdır.

Çalışma grubunu 34 akciğer kanser hastası ve 32 sağlıklı gönüllü oluşturdu. Hastalardan operasyon öncesinde venöz kan, operasyon sırasında tümör ve eşlenik normal akciğer dokusu alındı. Kontrol grubu ve hastaların serumlarında ayrıca hastaların doku supernatanlarında VEGF, anjiopietin-1 ve anjiopietin-2 düzeyleri ELISA ile ölçüldü.

Serum anjiopietin-2 düzeyleri hasta serumlarında kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunurken ($p < 0,001$) serum VEGF ve anjiopietin-1 düzeyleri açısından hasta ve kontrol grubu arasında fark bulunmadı. VEGF düzeyi tümör dokusunda, anjiopietin-1 ve anjiopietin-2 düzeyleri ise normal dokuda anlamlı yüksek bulundu ($p < 0,001$). Hastaların cinsiyet, yaş, tümör differansiyasyonu, histolojik tip, T (tümör), N (lenf nodu), tümör invazyonunu (perinöral, arterial, venöz ve lenfatik) içeren klinikopatolojik ölçütlere göre oluşturulan alt gruplarının serum ve doku VEGF, anjiopietin-1 ve anjiopietin-2 değerleri açısından yapılan karşılaştırmalarında: Serum VEGF düzeyi T3-T4 hasta grubunda T1-T2 hasta grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0,042$); bunun dışında serum VEGF, anjiopietin-1, anjiopietin-2'nin diğer klinikopatolojik parametrelerle anlamlı ilişkisi saptanamadı. Tümör dokusu anjiopietin-1 düzeyi, orta- az differansiye tümörlerde iyi

differentiated tumors according to 65 years old group, 65 years old group according to significant high level (respectively $p=0,044$; $p=0,038$). Serum and tissue VEGF, angiopoietin-1, angiopoietin-2 levels between correlation when lung cancer patients serum levels VEGF and angiopoietin-1 levels between positive significant correlation found ($r=0,446$ $p=0,000$). Normal tissue angiopoietin-2 with serum VEGF values between negative significant correlation observed ($r=-0,400$ $p=0,019$) normal tissue angiopoietin-2 with serum angiopoietin-2 values between positive significant correlation found ($r=0,397$ $p=0,020$).

Result as our data VEGF, angiopoietin-1 and 2's lung cancer process included clearly demonstrated. Lung cancer normal lung tissue angiopoietin-2 levels increasing quantitatively and serum values correlation first time showed. This result of our study patients observation and evaluation, also treatment strategies determination light will be thought.

Anahtar kelimeler: Akciğer kanseri, angiogenesis, VEGF, angiopoietin-1, angiopoietin-2, tumor-normal tissue, ELISA

SUMMARY

Lung cancer is the commonest fatal malignancy in the developed world, causing more than one million deaths/year. Angiogenesis is an essential process if solids tumors are to grow beyond 2-3 mm³ since diffusion is no longer sufficient to supply the tissue with oxygen and nutrients. Besides numerous angiogenic factors, many antiangiogenic ones are released by solid tumors. Among the regulators of angiogenesis, VEGF is reported to be the most important one. Angiopoietin 1 binds to Tie-2, maintains and stabilizes mature vessels by promoting interaction between endothelial cells and surrounding extracellular matrix. Angiopoietin-2 competitively binds to Tie-2 and antagonizes the stabilizing action of angiopoietin-1, which results in destabilization of vessels. However some studies have shown that effects of angiopoietin-2 are dose dependent and variable.

The aim of this study was to investigate the the serum and tissue levels of VEGF, angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in patients with lung cancer. We also evaluated the correlation of tissue and serum parameters with respect to clinicopathological variables.

The study was conducted on 34 patients with lung cancer and 32 healthy controls. Preoperative serum and per-op tumor and matched normal tissue VEGF, angiopoietin-1 and angiopoietin-2 levels were determined by ELISA.

Serum angiopoietin-2 levels were significantly increased in patient group when compared to the control group ($p < 0,001$). No significant differences were found for serum VEGF and angiopoietin-1 levels between the two groups. In tumour tissue VEGF level was significantly higher than the normal matched tissue ($p < 0,001$). Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 levels were significantly higher in normal lung tissue compared to tumour tissue ($p < 0,001$). When the patients were stratified according to the clinicopathological parameters investigated (gender, age, tumour differentiation, histological type, invasion and lymph node status, T status) serum VEGF level were found to be significantly increased in T3-T4 than T1-T2 subgroups ($p = 0,042$). Moreover, tumor tissue angiopoietin-1 level was significantly higher in low differentiated group compared to the high differentiated group ($p = 0,044$). Angiopoietin-1 was also found to be higher in patients older than 65 years old than those younger than 65 ($p = 0,038$). A significant positive correlation existed between the serum VEGF and angiopoietin-1 levels ($r = 0,446$; $p = 0,000$). We have found a negative and

significant correlation between normal lung tissue angiopoietin-2 and serum VEGF levels ($r=-0,400$ $p=0,019$). When the correlations between serum and tissue parameters were investigated, a significant correlation was observed between angiopoietin- 2 levels in normal lung tissue and serum ($r=0,397$ $p=0,020$)

In conclusion, our data clearly demonstrated that; VEGF, angiopoietin-1 and 2 are all involved in lung cancer process. We showed, for the first time, the correlation between tissue and serum levels of angiopoietin-2 in lung cancer. We think that, this finding might be the basis for a potent marker in patient evaluation and follow-up and also might enlighten the therapeutic strategies against lung cancer.

Key Words: Lung cancer, angiogenesis, VEGF, angiopoietin-1, angiopoietin-2, matched tumour - normal tissue, ELISA

1. GİRİŞ ve AMAC

Akciğer kanseri dünyadaki kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni olup, yılda bir milyondan fazla kişide ölüme yol açmaktadır. Hastaların geç tanı alması ve hastalığın yüksek oranda tekrarlaması nedeni ile toplam sağ kalım oranı yaklaşık %10'dur. Gelişmiş ülkelerde sigara içiminin artması nedeni ile gelecekte de akciğer kanseri önemli bir sağlık problemi olarak görülmeye devam edecektir (1).

Akciğer kanseri iki temel histolojik tipten oluşmaktadır: Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK). Akciğer kanserlerinin % 13'ünden küçük hücreli akciğer kanseri, % 86'sından küçük hücreli dışı akciğer kanseri sorumludur. KHDAK, adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere en az üç alt histolojik tipe ayrılır. Küçük hücreli akciğer kanseri daha agresif tipte olup erken metastastatik yayılım ile karakterizedir. Başlangıçta kemoterapi ve radyoterapiye duyarlı olmasına karşın beş yıllık sağ kalım % 5'ten azdır (2).

Anjiogenez yeni kapiller damar gelişimi olup, fizyolojik anjiogenez embriyonik gelişme, yara iyileşmesi ve organ hipertrofisi gibi süreçlerde görülür. Kontrolsüz anjiogenez diyabetik retinopati, ateroskleroz, kronik inflamasyon, tümör büyümesi ve metastaz gibi birçok patolojik durumda izlenmektedir. Anjiogenez, hücreler ile çözümler faktörler ve ekstraselüler matriks bileşenleri arasındaki etkileşim sonucu endotelial hücrelerin differansiyasyonu, migrasyonu ve proliferasyonu ile seyreden kompleks bir süreçtir (3). Solid tümörler 2-3 mm³ boyutundan daha fazla büyümek için yeni damar oluşumuna gerek duyarlar (4). Tümörlerde çok sayıda anjiyogenik faktör yanı sıra anti-anjiyogenik faktör de salınmaktadır (5). Anjiogenez sürecinde anjiogenezi uyaran ve önleyen faktörler arasındaki dengenin uyarıcı faktörler lehine bozulması tümör dokusunda yeni kapiller damar oluşumunu başlatmaktadır (4).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) en önemli anjiogenik faktörlerden biri olup anjiogenezin tüm evrelerinde etkilidir (6). Anjiopietin-1, Tie-2 reseptörüne bağlanır ve endotel hücreleri ile çevresindeki ekstraselüler matriks arasında etkileşimini sağlayarak damarı stabilize eder (7). Anjiopietin-2, Tie-2 reseptörüne yarışmalı bağlanarak anjiopietin-1'in etkisini antagonize eder (7). Tie-2'nin bu farklı sinyallere uyumunun nasıl olduğu anlaşılamamıştır (8).

Anjiogenezin düzenlenmesinde büyüme faktörlerinin rol oynaması nedeniyle ilk antianjiogenik ajanlar VEGF-VEGFR'leri hedefleyen ajanlar olarak geliştirilmiştir. Bazı olgularda anti-VEGF-VEGFR tedavisine karşı direnç gelişmesi yeni tedavi modellerine ihtiyaç duyulmasına sebep olmuştur. Antianjiogenik ve antilenfanjiogenik tedavi için VEGF-VEGFR aile üyelerinin yanı sıra yeni potansiyel hedef olarak anjiopietin büyüme faktörleri ve TIE reseptörleri hedeflenmiştir (9).

Literatürde bu üç parametrenin (VEGF, anjiopietin-1, anjiopietin-2) akciğer kanserinde doku ve serumda birlikte kantitatif olarak incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada;

- 1) Akciğer kanser hastalarının serumlarında ve tümörlü-normal eşlenik dokularında VEGF, anjiopietin-1, anjiopietin-2 düzeylerinin ölçülmesi; benzer özellikte oluşturulan sağlıklı kontrol grubuyla serum değerlerinin karşılaştırılması
- 2) VEGF, anjiopietin-1, anjiopietin-2'nin doku ve serum düzeyleri arasındaki ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKCİĞER KANSERİ

Akciğerler ekstratorasik organ kanserlerinin sıklıkla metastaz yaptığı yer olup, primer akciğer kanseri de sık görülür (10). Kanser olgularının %12,8'inden akciğer kanseri sorumludur (11). Primer akciğer tümörlerinin (karsinomlar) %95'i bronşial epitelden köken alır, kalan % 5'i bronşial karsinoidler, mezenkimal maligniteler (fibrosarkomlar, leiomyomlar vb), lenfomalar ve benign lezyonları içerir (10). Gelişmiş ülkelerde akciğer kanserinde 5 yıllık sağ kalım oranı %15'den daha az olup gelişmekte olan ülkelerde bu oran % 5'dir (12).

2.1.1. AKCİĞER KANSERİ EPİDEMİYOLOJİSİ

Akciğer kanseri endüstrileşmiş ülkelerde kansere bağlı ölümlerin en önemli nedenidir (10). Dünyada kanser olgularının % 12,8'i ve kanser nedenli ölümlerin %17,8' inden akciğer kanseri sorumludur (11). Akciğer kanseri her yıl 1.350.000 yeni olgu ile görülen en yaygın kanserdir (13). Erkeklerde kanser kaynaklı ölümlerin üçte birini oluştururken, kadınlarda da başta gelen ölüm nedenlerinden birisi haline gelmiştir. Kadınlarda akciğer kanseri 1987'den günümüze kadar meme kanserinden daha çok ölüme neden olmakta ve görülme oranı artmaya devam etmektedir (10). En önemli risk faktörü sigara olup akciğer kanser riski ve sigara içimi arasında doza bağlı güçlü bir ilişki kanıtlanmıştır (13). Ülkemizde Sağlık Bakanlığının tüm sağlık kuruluşlarında tanı alan kanser olgularının kaydedildiği pasif kanser kayıt sistemi verilerine göre akciğer kanser insidansı 11,5 / 100.000'dir (11).

2.1.2. AKCİĞER KANSERİNDE ETYOLOJİ

Aktif sigara kullanımı, çevresel sigara dumanı, çeşitli mesleki maruziyetler (Radon, ağır metaller, Asbestoz vb), genetik faktörler ve hava kirliliği gibi pek çok faktör, akciğer kanseri oluşumunda önemli rol oynamaktadır (14).

Sigara: Akciğer kanserlerinin yaklaşık %75- 80'ninde neden sigara içimidir. Tüm yeni akciğer kanser olgularının yaklaşık %50'si eski sigara içicilerinde, tüm akciğer kanserlerinin %25'i ise hiç sigara içmeyenlerde görülmektedir (1).

Akciğer kanseri sıklığı ile sigara içme sıklığı arasında lineer bir ilişim mevcuttur. Sigara içmeyenlere göre ağır sigara içiciliği alışkanlığı olanlarda (20 yıl 2 paket /gün) risk 60 kat fazladır (10). Dünyada sigara içme prevalansının erkeklerde % 47-52, kadınlarda % 10-12 olduğu tahmin edilmektedir (15). Türkiye’de sigara içme prevalansı erkeklerde %63, kadınlarda %24’tür (11). Dünyada, kadınlardaki akciğer kanser olgularının %53’ünün, erkeklerde % 15’inin sigara içimine bağlı olmadığı tahmin edilmektedir (1). Sigara içiminin kesilmesi ile zamanla risk düşmekte fakat hiçbir zaman içmemiş kişilerin düzeyine ulaşamamaktadır. Pasif içicilerde ise risk, içmeyenlere göre yaklaşık 2 kat fazladır (10).

Sigara içme alışkanlığı olan kişilerin solunum yolları epitelinde progresif morfolojik değişiklikler gösterilmiştir (10). Sigara ile en fazla ilişkili histolojik tipler skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinomdur (16). Sigara içmeyen kişilerde daha çok görülen akciğer kanseri tipi adenokarsinomdur. Bu histolojik tip için sigara dışında bazı faktörlerin de önemli olduğunu düşünülmekte olup kişinin bağışıklık sisteminin özellikleri, ailede kanser öyküsü, geçirilmiş akciğer hastalığı öyküsü, hormonlar gibi faktörler rol oynayabilir. Ayrıca pasif sigara içiciliği, diyet, radon, mesleksi maruz kalmanın da önemli olabileceği düşünülmektedir (17).

Yaş ve Cinsiyet: Akciğer kanseri dünyada kadın ve erkekte kansere bağlı ölümlerin başlıca nedeni olmaya devam etmektedir (2). Hastaların çoğu 50-70 yaş grubundadır, 50’li ve 60’lı yaşlarda pik yapmaktadır (10). Erkeklerde daha sık görülmekle birlikte son yıllarda kadınlarda insidansı daha hızlı artış göstermektedir. Histolojik tipler ve sağ kalım açısından da cinsler arasında farklılıklar vardır. Kadınlarda adenokarsinom daha sık görülmektedir (16). Kadınlarda adenokarsinom % 44,7, küçük hücreli karsinom % 22,6, skuamöz hücreli kanser % 21,4 iken erkeklerde skuamöz hücreli akciğer kanseri % 36,2, adenokarsinom % 33,2, küçük hücreli karsinom % 18,4 oranında izlenmektedir (18).

Genetik Faktörler: Sigara içimi ve diğer çevresel etkenler akciğer kanserinin en önemli nedenleri olsalar da her sigara içen kişi akciğer kanseri olmamaktadır. Kişilerde karsinojenlerin mutajenik etkilerini koşullayan genetik faktörlerin varlığı akciğer kanseri gelişiminde önemli bir etken gibi görünmektedir. Prokarsinojenler karsinojenlere dönüşmek için P-450 monooksijenaz enzim sistemi aracılığı ile metabolik aktivasyona ihtiyaç duyarlar. P-450 genleri gibi spesifik genetik polimorfizmleri içeren kişilerin prokarsinojenleri daha

fazla metabolize etme kapasitesinin artması akciğer kanseri riskinin artırmaktadır (10). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanser (KHAK)'i arasında genetik farklılıklar vardır. Örneğin, G1-S hücre siklusu kontrol noktası akciğer karsinomlarının çoğunda bozulmuştur, bu durum farklı genetik mekanizmalar aracılığı ile olur; p16 /CDKN2A geni KHDAK'lerinde sıklıkla inaktif iken RB gen mutasyonları KHAK için karakteristiktir (10). Kanserli hastaların birinci derece yakınlarında akciğer kanseri riski 2,4 kat artmaktadır (11).

Beslenme: Akciğer kanserinde diyetin % 5 oranında etkili olduğu ileri sürülmektedir. Vitamin A ve β -karotenden fakir diyet akciğer kanseri riskini artırır. Diyetinde β -karoten/retinol miktarı yüksek olan olgularda akciğer kanserinin göreceli riski düşmektedir. Vitamin E ve selenyum benzer şekilde antioksidan etkiyle riski azaltmaktadır. Yüksek yağlı diyetle beslenen sigara tiryakilerinde akciğer kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir. Çay (özellikle yeşil çay) tüketimi de koruyucu etki göstermektedir (11).

Meslek ve çevresel faktörler: Radyoaktif maddelerin bulunduğu maden ocağı işçilerinde, asbest, arsenik, krom, uranyum, nikel, vinil klorid ve hardal gazına maruz kalanlarda akciğer kanseri insidansı artmaktadır. Sigara içmeyen fakat asbeste maruz kalanlarda risk 5 kat artmaktadır. Sigara içen ve aynı zamanda asbeste maruz kalanlarda akciğer kanseri riski sigara içmeyen ve asbeste maruz kalmayanlara göre 55 kat artmaktadır (10).

2.2. AKCİĞER KANSERİNİN HİSTOLOJİK SINIFLAMASI

Tablo-1. Malign akciğer tümörlerinde histolojik sınıflama (WHO 2004) (11).

<p><u>Malign Epitelyal Tümörler</u></p> <p>Skuamoz hücreli karsinom</p> <p>Papiller</p> <p>Berrak hücreli</p> <p>Küçük hücreli</p> <p>Bazaloid</p> <p>Küçük hücreli karsinom</p> <p>Kombine küçük hücreli karsinom</p> <p>Adenokarsinom</p> <p>Adenokarsinom, mikst tip</p> <p>Asiner adenokarsinom</p> <p>Papiller adenokarsinom</p> <p>Bronşiolalveoler</p> <p>Non–müsinöz</p> <p>Müsinöz</p> <p>Mikst müsinöz ve non–müsinöz ya da belirsiz hücre tipi</p> <p>Müsin salgılayan solid adenokarsinom</p> <p>Fetal adenokarsinom</p> <p>Musinoz (kolloid) karsinom</p> <p>Musinoz kist adenokarsinom</p> <p>Taşlı yüzük adenokarsinom</p> <p>Berrak hücreli adenokarsinom</p> <p>Büyük hücreli karsinom</p> <p>Büyük hücreli nöroendokrin karsinom</p> <p>Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom</p> <p>Bazaloid karsinom</p> <p>Lenfoepitelyoma benzeri karsinom</p> <p>Berrak hücreli karsinom</p> <p>Rabdoid fenotipinde büyük hücreli karsinom</p> <p>Adenoskuamoz karsinom</p>

Sarkomatoid karsinom

Pleomorfik karsinom

İğ hücreli karsinom

Dev hücreli karsinom

Karsinosarkom

Pulmoner blastom

Karsinoid tümörler

Tipik karsinoid

Atipik karsinoid

Tükürük bezi tipindeki karsinomlar

Mukoepidermoid karsinom

Adenoid kistik karsinom

Epitelyal-miyoepitelyal karsinom

Preinvazif lezyonlar

Skuamoz hücreli in situ karsinom

Atipik adenomatoz hiperplazi

Diffuz idyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi

Mezenkimal tümörler

Epiteloid hemanjiyotelyoma

Anjiyosarkom

Plöropulmoner blastom

Kondroma

Konjenital peribronşiyal miyofibroblastik tümör

Diffuz pulmoner lenfanjiyomatozis

İnflammatuar miyofibroblastik tümör

Lenfanjiyoleiyomiyomatozis

Sinovyal sarkom

Monofazik

Bifazik

Pulmoner arter sarkoması

Pulmoner ven sarkoması

Benign Epitelyal tümörler

Papillomalar

Skuamoz hücreli papillom

Ters yerleşimli

Glanduler papilloma

Mikst skuamoz hücreli ve glanduler papilloma

Adenomalar

Alveoler adenoma

Papiller adenoma

Tükürük bezi tipi adenom

Mukoz gland adenomu

Pleomorfik adenom

Diğerleri

Müsinöz kistadenom

Lenfoproliferatif tümörler

MALT tipi marjinal zon B-hücre lenfoması

Diffuz büyük B hücreli lenfoma

Lenfomatoid granulomatozis

Langerhans hücreli histiyositozis

Hamartoma

Sklerozan hemanjiom

Berrak hücreli tümör

Germ hücreli tümör

Teratom, matür

İmmatür

Diğer germ hücreli tümörler

İntrapulmoner blastom

Melanoma

Metastatik tümörler

2.2.1 KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERLERİ (KHDAK)

2.2.1.1. Squamoz Hücreli Karsinom

Erkeklerde daha sık görülüp sigara içme öyküsü ile yakın ilişkilidir. Santral bronkustan gelişme eğilimleri vardır ve lokal hiler lenf nodlarına yayılırlar, diğer histolojik tiplere göre toraks dışına yayılımları daha geçtir. Skuamöz metaplazi veya displazi bronşial epitelde oluştuktan sonra yıllar boyunca karsinoma in situ şeklinde kalabilir (10).

2.2.1.2. Adenokarsinom

Adenokarsinom kadınlarda, sigara içmeyenlerde ve 45 yaşından daha genç kişilerde en sık görülen primer akciğer tümürüdür (10). Genelde periferik yerleşimlidir. Daha yavaş büyür ve daha küçük kitleler oluşturur fakat erken evrede metastaz yapma eğilimi vardır. Histolojik olarak asiner (gland oluşturan), papiller, solid tipleri vardır. Dünya sağlık örgütünün güncel akciğer tümörleri sınıflamasında bronşioalveolar karsinomlar (BAK) adenokarsinomların alt tipi olarak belirtilmiştir. BAK' ler akciğerin periferinde tek bir nodül ya da daha sıklıkla multipl diffüz nodüller olarak ortaya çıkarlar (10).

2.2.1.3 Büyük Hücreli Karsinom

Küçük hücreli karsinomun sitolojik özelliklerini içermeyen ve glandüler ya da skuamöz differansiyasyon göstermeyen indifferansiye (ayrımlaşmamış) malign epitelial tümörlerdir (10).

2.2.2 KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER KANSERİ (KHAK)

Genellikle santral lokalizasyonlu olup hiler ve mediastinal lenf nodlarına erken metastaz yaparlar. Akciğerin nöroendokrin hücrelerinden köken alırlar ve paraneoplastik sendromlara neden olurlar (10).

Akciğer kanserinde histopatolojik tümör tiplerinin birbirinden farklı özellikleri Tablo-2 de verilmiştir (19).

Tablo-2. Akciğer kanserlerinde histopatolojik tümör tiplerinin özellikleri (19).

Küçük hücreli (KHAK) ve küçük hücreli dışı (KHDAK) akciğer kanserlerinin özellikleri				
Histolojik tipler				
Özellikler	KHAK(% 25)	KHDAK (%75)		
		Skuamoz	Adeno	B. hücreli
Sıklık	%20-30 (30)	% 40-60 (50)	%20-30 (15)	% 5-10 (5)
Cins	Erkeklerde	Erkeklerde	Kadınlarda	Kadınlarda
Yaş	Genç-Orta	Orta-ileri	Orta	Orta-ileri
Sigara ilişkisi	Kuvvetli	Kuvvetli	Zayıf	Kuvvetli
Yerleşim	2/3 santral	2/3 santral	2/3 periferik	2/3 periferik.
Kavite-Abse	Kitle	Sık	Nodül < 4 cm	Kitle>4 cm
Histoloji	Dar sitoplazmalı, küçük lenfosit benzer hiperkromatik nükleuslu, ince kromatinli, keratin +	Keratin formasyonu, hücreler arası ipliğimsi bağlantılar (desmozom), sitoplazmalar geniş	Skar zemini Asiner, papiller veya sitoplazmasında müsün içeren yapılar	Büyük nükleus, belirgin nükleolus, bol sitoplazma, keratinizasyon yok
Kökeni	Bronş mukozasında nöroendokrin orijinli K tipi granüler hücrelerden	Bronş epiteli, bazal membrana paralel bazal hücrelerden	Bronş epiteli, müsün salgılayan bezlerden veya bronkoalveolar epitelinden	

2.3. AKCİĞER KANSER EVRELEMESİ

Tablo 3. Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde evrelendirme (19, 20)

EVRE	TNM
I	IA: T1N0M0
	IB: T2N0M0
II	IIA: T1N1M0
	IIB: T2N1M0 T3N0M0
III	IIIA: T3N1M0 T1-2-3 N2 M0
	IIIB: T1-4 N3 M0 T4 N1-3 M0
IV	T1-4 N1-3 M1

Tablo 4. Küçük hücreli akciğer kanserinde evrelendirme (19, 20).

Küçük hücreli akciğer kanserinde evreler
Sınırlı (% 30) Primer tümör bir hemitoraksta sınırlı, aynı taraf hiler lenfadenopati Aynı veya karşı taraf supraklavikular veya mediastinal lenfadenopati Atipik hücre içermeyen plevral sıvı
Yaygın (% 70) Karşı akciğer metastazı Karaciğer, kemik, beyin metastazı Malign hücre içeren plevral sıvı

Tablo 5. UICC 7. Akciğer Kanseri Evrelemesinde T (Tümör) Tanımlayıcısı (21).

T (Primer Tümör)	
TX	Primer tümörün değerlendirilemediği durumlar ya da balgam veya bronşial lavajda malign hücrelerin saptanması ile tümör varlığının gösterildiği ancak bronkoskopi ya da görüntüleme yöntemleri ile tümörün saptanamadığı durumlar
T0	Primer tümör kanıtı yok
Tis	İn-situ kanser
T1	Lob bronşundan daha proksimalde bronkoskopik invazyon kanıtı olmaksızın (ana bronшта tümör yok), normal akciğer veya viseral plevra ile çevrili, en geniş çapı 3 cm veya daha kısa tümör*
T1a	Tümör en geniş çapı 2 cm veya daha kısa
T1b	Tümörün en geniş çapı 2 cm den uzun ancak 3 cm veya daha kısa
T2	Tümörün en geniş çapı 3 cm den uzun ancak 7 cm veya daha kısa ya da Aşağıdaki özelliklerden birini taşıyan tümör; Karinadan 2 cm veya daha distalde ana bronş invazyonu Visseral plevra invazyonu Bir akciğerin tamamını tutmayan, hiler bölgeye doğru uzanan obstruktif pnömoni veya atelektazi
T2a	Tümörün en geniş çapı 3 cm den uzun ancak 5 cm veya daha kısa
T2b	Tümörün en geniş çapı 5 cm den uzun ancak 7 cm veya daha kısa
T3	7 cm den büyük tümör ya da Aşağıdaki yapılara direkt olarak invazyon gösteren herhangi bir tümör; göğüs duvarı (süperior sulkus tümörleri dahil), diafragma, frenik sinir, mediastinal plevra, parietal perikart ya da ana bronшта invazyon gösteren tümör (karina* tutulumu olmaksızın, anabronşun 2 cm içinde) ya da bir akciğerin tamamında obstruktif pnömoni veya atelektaziye neden olan tümör ya da Primer tümör ile aynı lobda ayrı tümöral nodul/nodüllerin varlığı
T4	Aşağıdaki yapılardan birine invazyon gösteren herhangi bir tümör; Mediasten, kalp, büyük damarlar, rekküren larengeal sinir, özefagus, vertebra cismi, karina. Aynı taraf akciğerde, primer tümörden farklı lobda tümör nodul/nodüllerin

Tablo 6. UICC 7. Akciğer Kanseri Evrelemesinde N (Lenf Nod) Tanımlayıcısı (21).

N (Bölgesel Lenf Nodları)	
NX	Bölgesel lenf nod değerlendirmesi yapılamadı
N0	Bölgesel lenf nod metastazı yok
N1	Aynı taraf peribronşial ve/veya aynı taraf hiler ve/veya intrapulmoner lenf nod/nodlarında metastaz ya da direkt invazyonu
N2	Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodu/nodlarında metastaz
N3	Karşı taraf mediastinal, karşı taraf hiler, aynı taraf veya karşı taraf skalen veya supraklavikuler lenf nod/nodları metastazı

Tablo 7. UICC 7. Akciğer Kanseri Evrelemesinde M (Metastaz) Tanımlayıcısı (21).

M (Uzak Metastaz)	
MX	Uzak metastaz değerlendirilemedi
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var
M1a	Karşı akciğer ayrı tümör nodül/nodülleri Primer tümör ile aynı tarafta plevra nodüller veya malign plevra(veya perikardial)sıvı**
M1b	Uzak metastaz
<p>* Ana bronşun proksimaline kadar uzanabilen,bronş duvarı dışına invazyon göstermeyen herhangi bir büyüklükte yüzeysel tümör.</p> <p>** Akciğer kanserinde plevral (ve perikardial) sıvıların çoğu tümöre bağlıdır.Ancak bazı hastalarda plevral (perikardial) sıvının tekrarlanan sitopatolojik değerlendirmelerinde tümör saptanamaz.Sıvı eksuda ve hemorojik değildir.Bu bulgular ve klinik değerlendirme sıvının tümör ile ilişkili olmadığını işaret ederse,sıvı evreleme esnasında dikkate alınmaz ve M0 olarak sınıflandırılır.</p>	

2.4. ANJİYOGENEZ

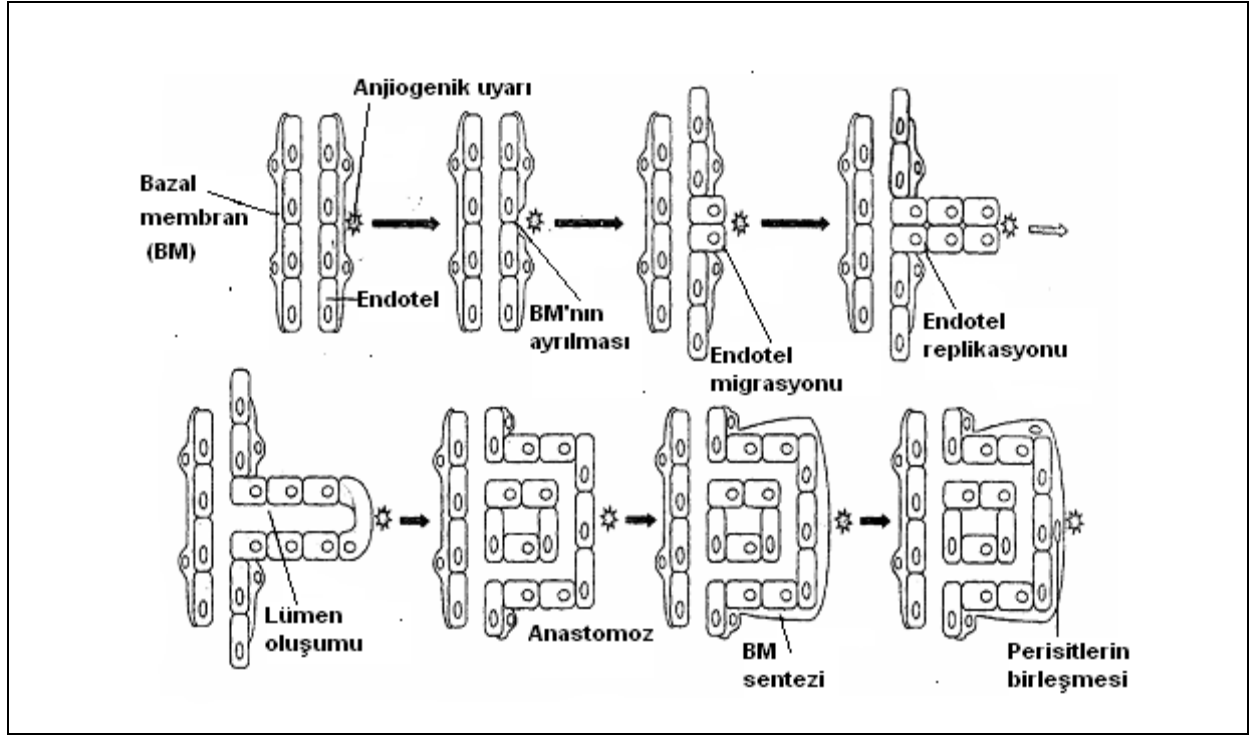
Anjiogenez, hücreler ile çözünür faktörler ve ekstraselüler matriks bileşenleri arasındaki etkileşim sonucu endotelial hücrelerin differansiyasyonu, migrasyonu ve proliferasyonu ile seyreden son derece karmaşık bir süreçtir (3). Var olan kan damarlarından yeni kapiller damar gelişimi olarak tanımlanan anjiogenez fizyolojik ve patolojik olarak sınıflandırılabilir (22). Fizyolojik anjiogenez embryonik gelişim, yara iyileşmesi, ovulasyon ve organ hipertrofisi gibi süreçlerde görülürken, kontrolsüz anjiogenez diyabetik retinopati, ateroskleroz, kronik inflamasyon, tümör büyümesi ve metastaz gibi birçok patolojik durumda rol oynamaktadır (3, 22).

Tümörün kendi damar oluşumunu uyarması olarak bilinen tümör anjiogenez kavramı 1930'lara dayanmaktadır. 1971'de tümörlerin yeterli kan dolaşımı olmadan belirli boyuttan daha fazla büyüemeyeceği hipotezini ortaya atan Folkman, ayrıca lokal tümör büyümesi ve metastazında tümör anjiogenez inhibisyonunun tedavide kullanılabileceğini ilk kez belirten bilim insanıdır (23). Tümör anjiogenezi, premalign bir lezyonun kansere dönüşümünden metastatik lezyonların gelişimine kadar uzanan tümör gelişim basamaklarında rol oynamaktadır (24). Primer tümör ve metastatik tümör gelişimi yeni damar oluşumuna bağlıdır (25). Solit tümörler 2-3 mm³ boyuttan sonra gerekli oksijen ve besin ihtiyacını diffüzyon ile karşılayamaz ve anjiogeneze ihtiyaç duyarlar (26). Tümör mikro kan damarları tümör hücrelerine yeterli miktarda besin, oksijen temin ederken atık metabolitlerin drenajını sağlar. Metastatik tümör gelişimi iki adımda gerçekleşir: İlk olarak malign hücrelerin primer tümör odağından dolaşıma geçmeleri gereklidir. İkinci olarak uzak organlara ulaştıktan sonra saptanabilir boyutta tümör gelişimi için anjiogeneze gereksinim vardır (25).

Tümör kaynaklı anjiogenez büyüme faktörleri, hücre reseptörleri ve adezyon molekülleri ile kontrol edilen, birçok basamağı içeren karmaşık bir süreçtir (26).

Bu süreçteki basamaklar:

1. Endotel hücre aktivasyonu
2. Bazal membran yıkımı
3. Endotel hücre migrasyonu
4. Ekstrasellüler matriks invazyonu
5. Endotel hücre proliferasyonu
6. Kapiller lümen oluşumu (27).

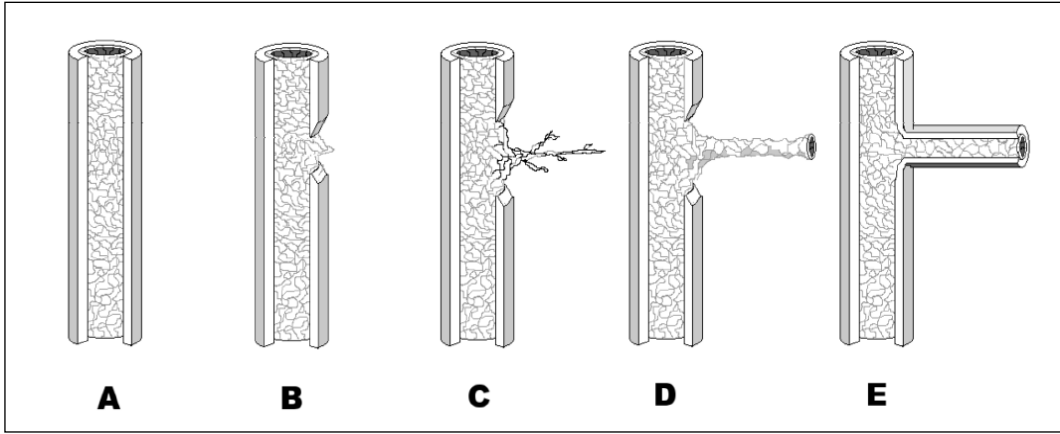


Şekil 1. Anjienez basamakları (28).

Anjienez sürecinde endotel hücreleri ve ekstrasellüler ortam arasında kompleks ve dinamik bir etkileşim vardır. Anjienez mevcut kapiller damarlardaki endotel hücrelerinden filizlenme ile ya da kapillerlerin bölünerek iki ya da daha fazla yavru damar oluşumu ile gerçekleşmektedir. Bazal membran lamininler, tip IV kollagen, tip VIII kollagen ve proteoglikanlardan oluşmaktadır. Endotel hücrelerinin ekstrasellüler matrikse invazyonundan önce bazal membranın yıkımı gereklidir. Anjiogenik uyarıya yanıt olarak endotel hücreleri yüksek mitotik indeks, artmış göç ve matriks yıkım kapasitesi gösteren aktif fenotip özelliği kazanırlar. Aktive olan endotel hücreleri komşu intimal hücreler ve perivasküler hücreler arasındaki sıkı bağlantıları yıkmaya ve ekstrasellüler doku içine invazyon yeteneğine sahiptirler (29). Aktive endotel hücrelerinden dimerik transmembran integrin $\alpha_v\beta_3$, ekspres olup ekstrasellüler matriks proteinleri (vitronectin, tenascin, fibronectin vb.) ile etkileşir ve damar oluşumu sırasında endotel hücre göçünü düzenler. Ayrıca aktive olan endotel hücrelerinde bazal membranı ve ekstrasellüler matriksi parçalayan matriks metallo proteinazlar gibi proteolitik enzimler sentezlenir (26). Kapiller intimadan ve ekstravasküler alandan ayrılan endotel hücreleri proliferasyon ederler; kemotaktik anjiogenik uyarılara doğru göç ederek yeni damar oluşumuna katılırlar (29).

Yeni damar oluşumunda başlangıçta endotel hücreleri solit kordonlar oluştururlar daha sonra endotel hücrelerinin iç tabakaları apoptoza uğrar ve damar lümenini oluştururlar. Son olarak oluşan immatür damarlar perisit ve düz kas hücreleri ile stabilize edilir (26). Yeni oluşan damar ağının stabilizasyonunda anjiogenez basamakları tersine işleyerek bazal membran yeniden yapılandırılması, hücre proliferasyonunun durması, junction kompleks oluşumu ve damar duvarının perisitler ile desteklenmesi gerçekleşir (27). Stabilizasyon basamağı tümörlerdeki yeni oluşan damarlarda tam oluşmadığından tümör damarlarında geçirgenlik fazladır (26).

Neoplastik bir mutasyon meydana geldiğinde başlangıçta avasküler bir tümör büyüme evresi mevcuttur. Tümör hücreleri diffüzyon ile beslenirler ve tümör 1-2 mm³ boyuta kadar büyür. Bu boyuttaki tümörler anjiyogenik fenotipe dönüşümünden önce yıllarca sessiz kalabilirler ve "uyuyan tümör" olarak değerlendirilirler (25). Bu dönüşüm anjiyogenik geçiş (**angiogenic switch**) olarak tanımlanmaktadır (27, 30). Solit tümörlerde anjiogenik geçiş proanjiogenik ve antianjiogenik moleküller arasındaki denge ile kontrol edilir. Proanjiogenik faktörlerin etkisinin anjiostatik moleküllerinkinden daha fazla olması tümöre anjiogenik fenotip kazandırır bu da yeni kan damarlarının gelişimine yol açar. Anjiogenik fenotipin kazanılması erken tümör progresyonunda önemli bir adım olarak kabul edilir ve tümörün mikroskobik lezyondan hızla büyüyen ve metastatik potansiyele sahip bir kitleye dönüşmesine imkan sağlar. Onkojen kökenli protein ekspresyonu yanı sıra hipoksi, düşük pH, besin maddelerinin yetersizliği gibi hücre stres faktörleri veya reaktif oksijen türleri anjiogenik yolağın stimülasyonunda önemlidir (25).



Şekil 2. Anjiogenez basamakları **A-** Mural doku (bazal membran, perisitler ve adventisya) ile çevrili tek tabaka endotelden oluşan stabil damar yapısı **B –** Endotel hücreleri tarafından mural dokunun parçalanması **C–** Endotel hücrelerin perivasküler doku içine invazyonu ve yeni damar filizlenmesi **D –** Lümen ve tüp oluşumu **E –** Filizlenmiş kapillerin perisitler ve bazal membran ile stabilizasyonu (29).

Tablo 8. Endojen anjiogenik ve anti- anjiogenik faktörler (31).

Anjiyogenik faktörler	Anti-anjiyogenik faktörler
VEGF	Trombospondin
bFGF	Angiostatin (plasminojen kısmı)
aFGF	Endostatin (kollajen XVIII kısmı)
Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)	Antianjiyogenik antitrombin III
Hepatosit Büyüme Faktörü	Vazostatin
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	Prolaktin
İnsulin-benzeri büyüme faktörü	Troponin
TGF- α ve β	Anjiopietin - 2
TNF - α	İnterferon - α - γ
Plasental Büyüme Faktörü	İnterlökin -12
Anjiopietin – 1	Fibronektin
Angiyogenin	Metalloproteinaz inhibitörleri
Pleotrofin	Plazminojen aktivatör inhibitör 1
IL - 8	Platelet faktör 4 (PF4)
Granulosit- koloni uyarıcı faktör (G-CSF)	Retinoik asid
Proferin	2 – Metoksi östradiol
Leptin	Dopamin

2.5. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), pek çok önemli biyolojik aktivitesi olan multifonksiyonel bir moleküldür. VEGF ilk defa karsinoma hücre hatlarından salgılanan permeabilite faktörü olarak bulunmuş ve vasküler permeabilite faktörü (VPF) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra VEGF anjiogenik faktör olarak izole edilmiş ve endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (32).

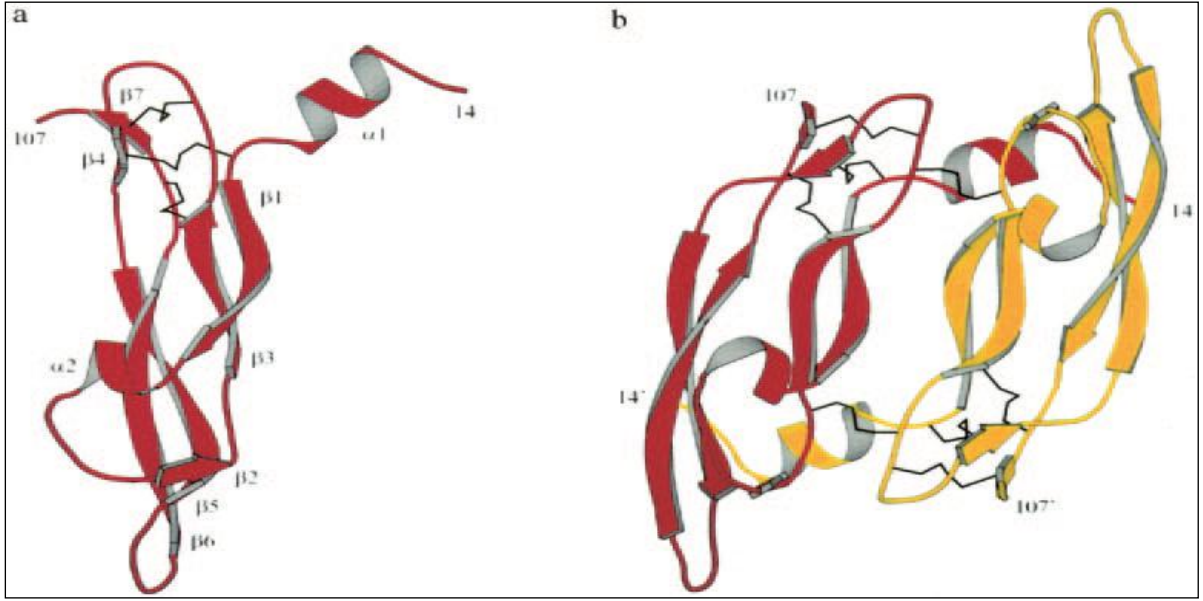
VEGF anjiyogenez, lenfanjiogenez ve vaskülogenezde önemli rol oynar (33). Endotel hücreleri yanı sıra makrofajlar, stroma hücreleri, retinal epitel hücreleri ve malign hücrelerden salgılanır (30). VEGF etkisini çoğunlukla endotel hücreleri üzerinde göstermekle beraber hematopoetik kök hücreleri, monositler, osteoblastlar ve neuronlar üzerindeki VEGF reseptörlerine bağlanarakta gösterir (34). VEGF hematopoetik kök hücrelerinin gelişimi, ekstrasellüler matriksin yeniden şekillendirilmesi, inflamatuvar sitokinlerin rejenerasyonunu içeren farklı biyolojik aktiviteleri olan güçlü bir anjiyogenik peptit olup hem vasküler büyüme faktörü hem de vasküler permeabilite faktörü olarak bilinir (35). VEGF'in histamine göre damar geçirgenliğini 50.000 kat daha fazla arttırdığı gösterilmiştir (36). Arter, ven ve lenfatik damar endotel hücreleri için spesifik ve kritik bir mitojen olduğu kanıtlanmıştır (35).

VEGF her türlü kan damarının fizyolojik ve patolojik olarak büyümesini anjiogenik ve vaskulogenik süreçler aracılığı ile düzenler. VEGF anjiogenezin her aşamasında etkilidir. Proteolitik enzimlerin (matriks metalloproteinaz, plazminojen aktivatörü) sekresyonu ve aktivasyonu, ekstrasellüler matriksin yıkımının indüklenmesi, endotel hücrelerin göçü ve proliferasyonu, damar tüp yapısının organizasyonunu sağlar. Tek başına aktivitesini gösterebilir fakat diğer damar büyüme faktörleri ile sinerjisi sonucu etkisi potansiyalize olur (30).

Tümörlerin büyümesi ve metastaz yapabilmesi için anjiogenez ile yeni damar gelişiminin uyarılması gereklidir (35). Tümörlerin gelişiminde malign hücrelerin kendilerine yakın damarlara olan mesafelerine göre oksijen yoksunluğu artar. Hipoksi VEGF mRNA'nın transkripsiyon hızını arttırarak bu hücrelerde VEGF üretimini uyarır. p53 ve von Hippel-Lindau gen inaktivasyonu, RAS mutasyonları ve onkogen Src'in ekspresyonu hipoksi dışında VEGF gen ekspresyonunu arttıran faktörlerdir (30).

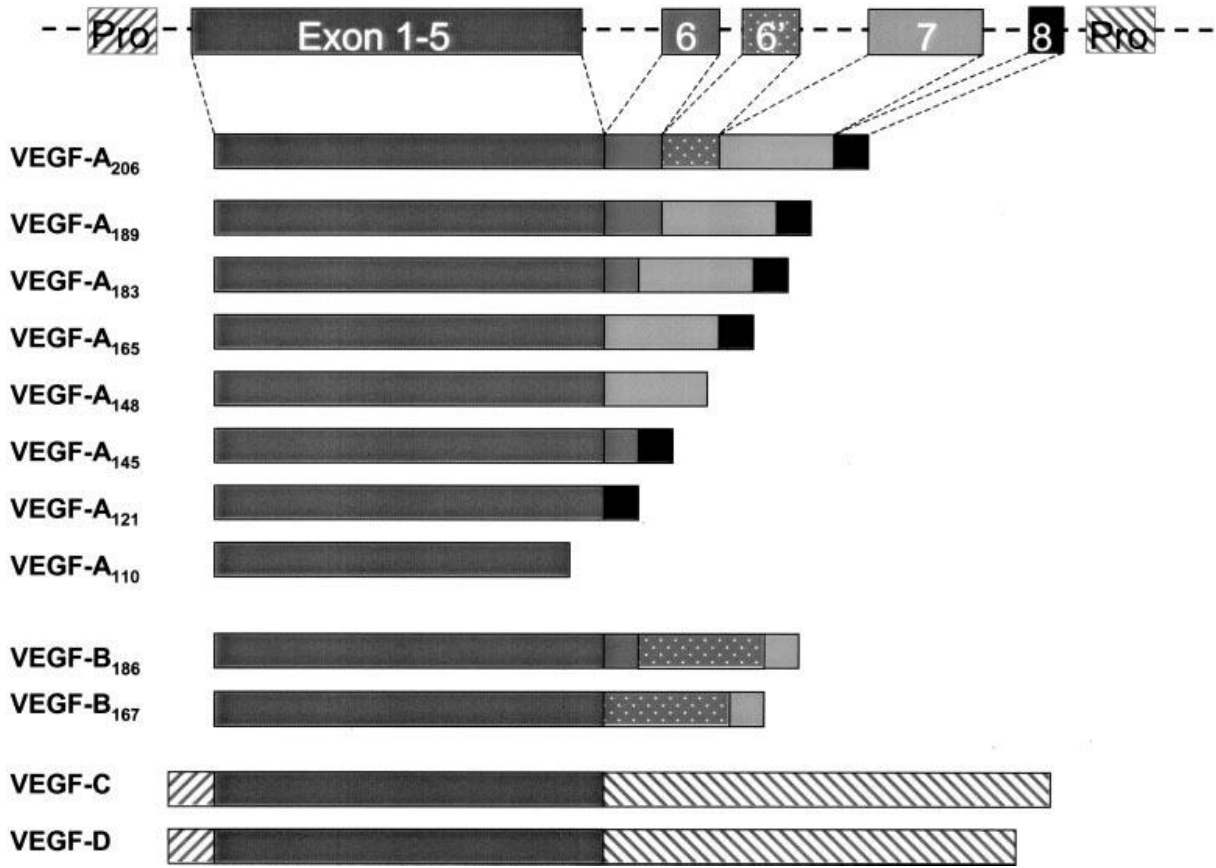
VEGF, 45-kDa molekül ağırlığında, bazik, heparine bağlanabilen homodimerik bir glikoproteindir. İnsan VEGF geni kromozom 6p21.3 de lokalize olup 7 intron ile ayrılmış 8 exondan oluşur (36). VEGF ailesi beş üyeden oluşur. VEGF (veya VEGF-A), VEGF-B,

VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörü (PlGF) (33, 37). VEGF'in bütün üyeleri ortak homolog domaini içermektedirler. VEGF'in bu çekirdek bölgesi molekül içi ve moleküller arası disülfid bağları yapan sekiz sistein kalıntısını kapsayan bir sistin düğüm motifinden oluşur. Her monomerin merkezinde 4 iplik β tabaka bulunmakta. Monomerler yan yana antiparalel birleşerek dimerize olurlar (38).



Şekil 3. (a) VEGF monomeri (b) VEGF monomerlerinin antiparalel olarak dimerize formu (38).

VEGF-A, VEGF ailesinde anjiogenez sürecinde birinci derecede önemli olan moleküldür (30). VEGF-A'nın en az yedi homodimerik izoformu vardır. İzoformlar tek VEGF geninden alternatif exon birleşmesi yolu ile oluşur. Bu izoformlar içerdikleri amino grup asit sayılarına göre: VEGF A₁₂₁, VEGF A₁₄₅, VEGF A₁₄₈, VEGF A₁₆₅, VEGF A₁₈₃, VEGF A₁₈₉, VEGF A₂₀₆ olarak adlandırılır (36, 38). *In vivo* sadece üç izoform VEGF A₋₁₂₁, 145, 165 anjiogenezi başlatabilir. Bunlar içinde biyolojik güç ve aktivitesinden dolayı VEGF A₋₁₆₅ benign ve malign hücrelerden salgılanan en etkili izoformdur (30).



Şekil 4. VEGF-A, B, C, D genetik yapısı. VEGF-A geni sekiz ekzondan oluşur ve ekzonların farklı birleşmesi yedi izoformu oluşturur. VEGF-A₁₂₁, ₁₄₅, ₁₄₈, ₁₆₅, ₁₈₃, ₁₈₉, ₂₀₆. Ek olarak VEGF-A₁₁₀ izoformu proteolitik ayrılma sonucu oluşur. VEGF-B'nin ₁₆₇ ve ₁₈₆ a.a içeren iki izoformu vardır. VEGF-C, D preproteinden proteolitik olarak serbestleşir. Tüm VEGF ailesi üyeleri 1-5 ekzonlar ile kodlanmış ortak homolog domain içerirler (38).

2.5.1 VEGF Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

VEGF gen ekspresyonu hipoksi, büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer ekstrasellüler molekülleri içeren farklı faktörler ile düzenlenir. Hipoksi hem in vivo hem de in vitro VEGF gen ekspresyonunda anahtar rol oynar; VEGF mRNA ekspresyonu düşük oksijen basıncına maruz kaldıktan sonra uyarılır. VEGF mRNA'nın hipoksiye bağlı transkripsiyonu VEGF geninin promoter bölgesinde HIF-1'i bağlayan yere HIF-1'in bağlanması aracılığı ile olur. VEGF'ün transkripsiyon düzeyi üzerinde büyüme faktörleri ve hipoksi sinerjik etki gösterir. VEGF üretimini uyarıcı büyüme faktörleri; epidermal büyüme faktörü (EGF), transforming büyüme faktör β (TGF- β), keratosit büyüme faktörü (KGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF). VEGF ekspresyonunu uyarıcı önemli sitokinler IL-1 α ve IL-6 olup diğer

sitokinler IL-10 ve IL-13 gibi VEGF ekspresyonunu baskılar. Prostoglandin E2, TSH, ACTH, VEGF mRNA nın ekspresyonunu artırabilir (36).

Von Hippel-Lindau (VHL) tümör supresör geni HIF-1'e bağlı hipoksiye cevapta ve VEGF geninin içerdiği hipoksiyle uyarılabilir birçok gen bölgesinin negatif regülasyonunda önemli rol oynar ve VEGF'in ekspresyonunu inhibe eder (36).

2.5.2 VEGF Reseptörleri

Damar endotel hücrelerinde VEGF'ün biyolojik aktivitesi spesifik reseptörleri ile etkileşimine bağlıdır (36). VEGF ailesinin üç tirozin kinaz reseptörü (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) ve iki non-enzimatik reseptörü (neuropilin-1 ve 2) vardır. Ayrıca VEGF ailesi üyelerinin birçoğu ekstrasellüler matrikste ve plazma membranında bulunan heparan sülfat proteoglikanlarına bağlanır. Tablo 9'da VEGFR ligandları ve ekstrasellüler matriks heparan sülfat proteoglikanlarına bağlanan VEGF izoformları gösterilmiştir. Tüm bu reseptörler yedi adet hücre dışı immünglobulin benzeri yapı, bir transmembranöz bölüm, bir jukstamembran bölüm ve bir de tirozin kinaz aktivitesi taşıyan hücre içi kısımdan oluşan tip V protein kinaz özelliğindedir (33).

Tablo 9. VEGF reseptör ligantları ve heparan sülfat proteoglikanları bağlayan VEGF ailesi izoformları (33).

VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	Neuropilin-1	Neuropilin-2	Syndecan
VEGF	VEGF(110-165)	Pro-ve mature VEGF-C	VEGF-165	VEGF(145-165)	VEGF(145-206)
VEGF-B	VEGF-C	Pro-ve mature VEGF-D	PIGF-152	PIGF-152	PIGF-152
PIGF	VEGF-D		Pro-VEGF-C	Pro-ve mature VEGF-C	PIGF-224
	VEGF-E		Pro-VEGF-D	Pro-VEGF-D	VEGF-B167
			Semaphorin-3C	Semaphorin-3C	
			Semaphorin-3F	Semaphorin-3F	
			Semaphorin-3A		
			VEGF-B		
			VEGF-E		

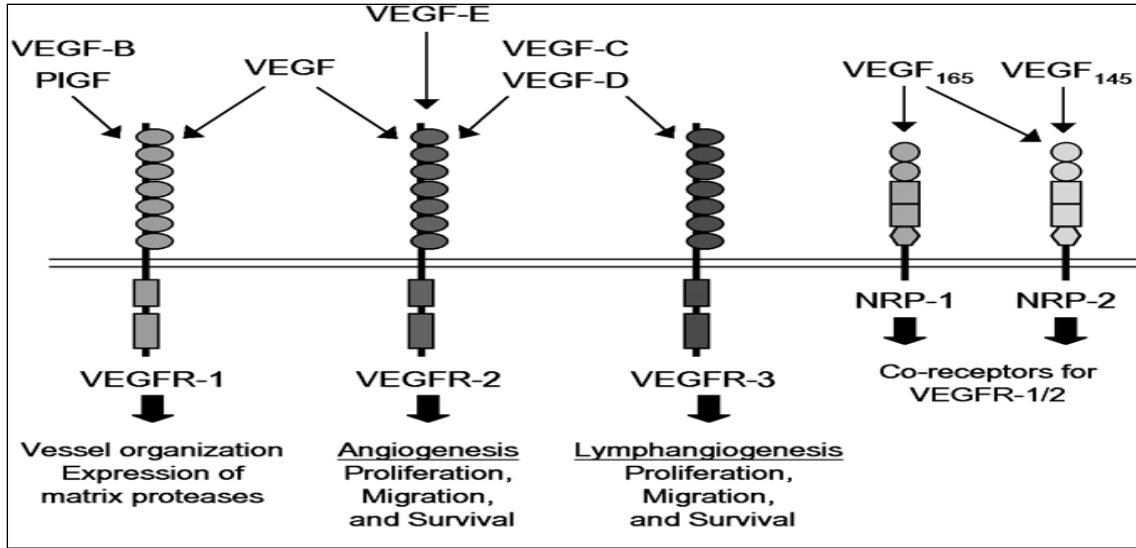
VEGF endotel hücreleri üzerindeki spesifik etkisini temel olarak VEGFR-1 ve VEGFR-2 ile regüle eder. VEGF'in, VEGFR-1'e affinitesi VEGFR-2 den daha fazladır. VEGFR-1 ve VEGFR-2'in farklı sinyal iletim fonksiyonları vardır. VEGFR-2'nin mitojenik, anjiogenik, permeabilite arttırıcı etkisi bulunmaktadır. VEGFR-1'in mitojenik aktivitesi olmayıp, öncelikli olarak damar yapısının organizasyonu, hematopoez ve matriks metalloproteinazların indüksiyonu ile ilişkilidir (30). Aynı ailenin üyesi olmakla birlikte VEGFR-3, VEGF olarakta adlandırılan VEGF-A'nin reseptörü değildir, sadece VEGF-C ve VEGF-D nin reseptörüdür ve en fazla lenfatik damar endotel hücrelerinden eksprese olur (33, 36).

Yaklaşık 210 kDa molekül ağırlığına sahip olan VEGFR-1 endotel hücrelerinin lokalizasyonu ve gelişim aşamasına bağlı olarak farklı fonksiyonlara sahiptir. VEGFR-1'in VEGF ile uyarılmasının ardından tirozin kinaz fosforilasyon aktivitesi VEGFR-2'ye göre zayıftır; direkt proliferatif veya hücre iskeleti üzerine etkileri yoktur ancak uyarıldığında endotel hücrelerinden plazminojen aktivatör inhibitör-1 ve ürokinaz tip plazminojen aktivatörünün ekspresyonunu arttırır. Ekstrasellüler matriks yıkımında, hücre göçünde ve monosit kemotaksisinde rol oynar (33).

VEGFR-2 molekül ağırlığı yaklaşık olarak 210 kDa'dır. VEGF'in uyardığı endotel hücre göçü, proliferasyonu ve permeabilite artışı ağırlıklı olarak VEGFR-2 üzerinden gerçekleşir (33).

VEGFR-3 embriyoda kapiller pleksusun yeniden yapılanmasında ve erişkinde lenfanjiogenez ve anjiogenezde anahtar rol oynar (33).

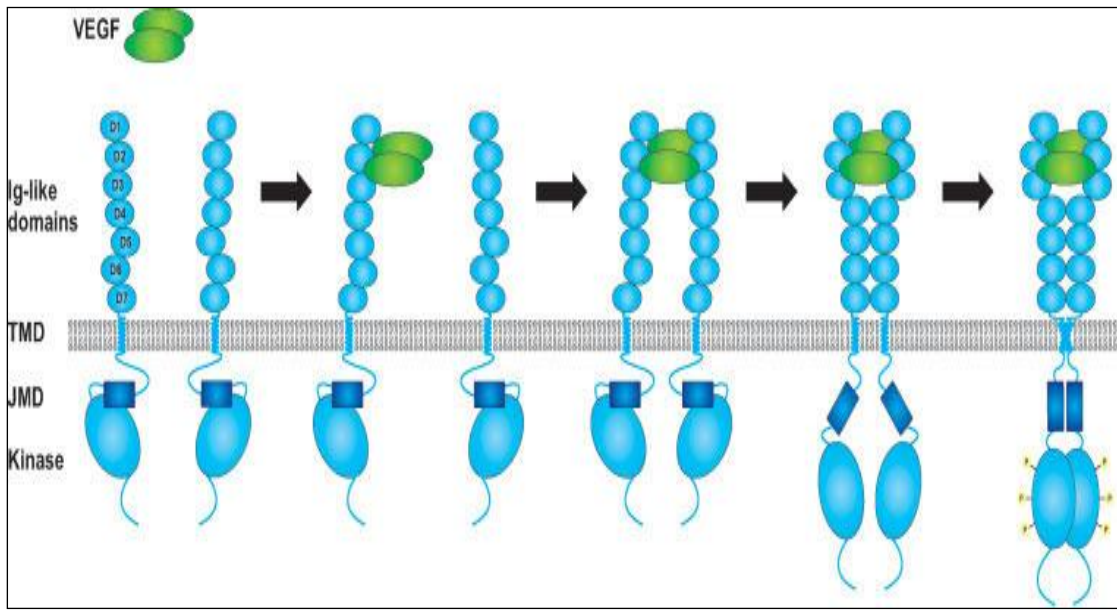
Nörofilinler, Nrp-1 ve Nrp-2 immunoloji, neuronal gelişim ve anjiogenezde rol oynar (34). Nörofilinler hem VEGF ailesi hem de neurogenizde etkili glikoproteinler olan semaforin ailesi için transmembran non-protein tirozin kinaz ko-reseptörleridir. VEGF-165, PIGF-152 ve VEGF-B'nin her iki izoformu neuropilin-1'e, VEGF-145, VEGF-165, PIGF-152 ve VEGF-C neuropilin-2'e bağlanır (33).



Şekil 5. VEGF ailesi ligandları ve reseptörleri (39).

2.5.3 VEGF Reseptör Aktivasyon Mekanizması

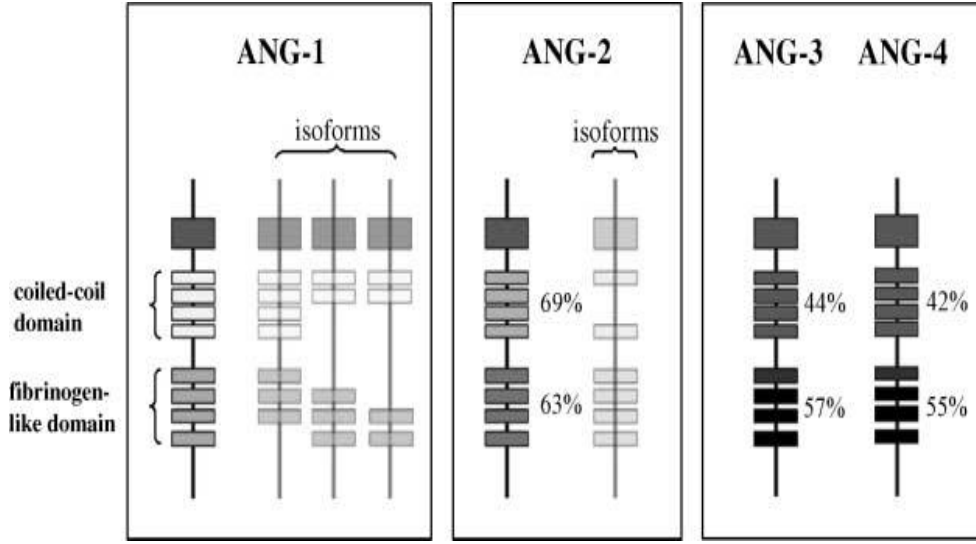
VEGF'in VEGFR'e bağlanması ile reseptörün homo- ve heterodimerizasyonunu düzenlenir, bunu takiben hücre içi yerleşimli jukstamembran domain ve reseptörün uçundaki karboksiterminalde bulunan spesifik tirozin kinaz kalıntılarının fosforilasyonu gerçekleşir. Bunun sonucunda endotel hücre proliferasyonu, migrasyonu ve sağ kalımı ile ilişkili sinyal yolağı aktive olmaktadır (40, 41).



Şekil 6. VEGFR'lerinin aktivasyon mekanizması. VEGF'in VEGFR'e bağlanması iki reseptör monomerin dimerizasyonuna yol açar. Ek olarak Ig benzeri domain 4, transmembran domainler ve jukstamembran domainler arasında etkileşim VEGF-VEGFR kompleksinin stabilizasyonunu sağlar, sonuç olarak kinaz aktivitesi ve tirozin kalıntılarının otofosforilasyonu gerçekleşir (41).

2.6 ANJİPOİETİNLER

Anjiopietinler ilk kez 1990'lı yılların ortasında kan damar oluşumu için gerekli büyüme faktörleri ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır. Bilinen dört anjiopietin vardır; Anjiopietin-1 (Ang-1), Anjiopietin-2 (Ang-2), Anjiopietin-3 (Ang-3) ve Anjiopietin-4 (Ang-4) (Şekil 7). Anjiopietinler iki domainden oluşur. N-terminal sarmal-bobin domaini ligantların homo-oligomerizasyonundan sorumludur. Oligomerizasyon reseptör aktivasyonu için gereklidir, ancak reseptör bağlanması için gerekli değildir. Reseptöre bağlanma C-terminalinde yer alan fibrinojen benzeri domain aracılığı ile gerçekleştirilir (42).

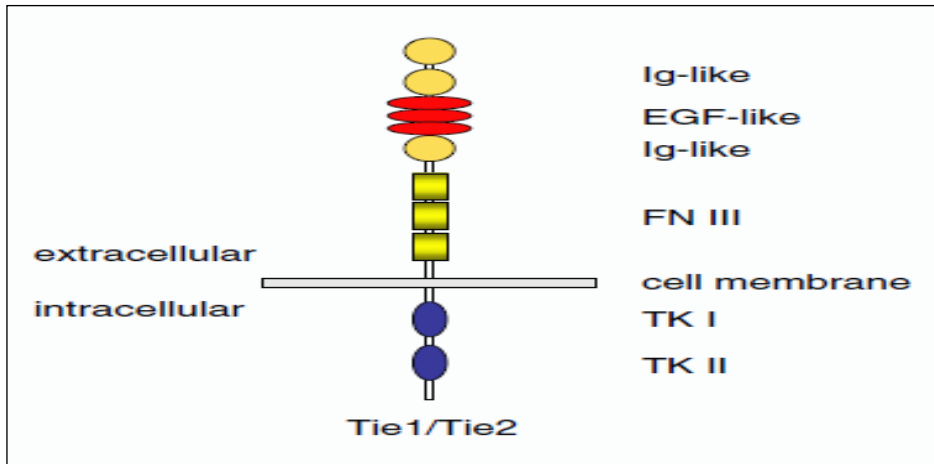


Şekil 7. Anjiopietin ailesinin yapısal organizasyonu (43).

Anjiopietinler salgılanan glikoproteinler olup yaklaşık 75 kDa ağırlığında dimerik moleküllerdir. 498 aa içeren Anjiopietin-1 8q22 kromozomunda, 496 aa içeren Anjiopietin-2 ise 8q23 kromozomunda lokalizedir. Her iki molekülün yapısı % 60 dizi homolojisi gösterir. Ang-1 dört farklı splice varyantı olarak üretilir. 1,5 kb ve 1,3 kb variantları reseptöre bağlanır ve otofosforilasyonu uyarır. 0,9 kb ve 0,7 kb varyantlar ile kodlanmış proteinler Tie-2'ye bağlanır fakat otofosforilasyonu uyaramaz. Ang-2'nin Ang-2(443) izoformunda sarmal-bobin parçası eksik olup Tie2 fosforilasyonunu stimule edemediği tesbit edilmiştir. Ang-1 Tie-2 reseptör agonisti gibi davranır oysaki Ang-2 antagonisttir (42).

Anjiopietinlerin Tie-1 ve Tie-2 olmak üzere, tirozin kinaz yapısında olan iki reseptörü vardır ve halen tartışmalı olsa da etkisini daha çok Tie-2 reseptörü üzerinden yaptığı düşünülmektedir (44). Tie-1 ve Tie-2 reseptörlerinin ekspresyonu büyük ölçüde endotel hücrelerden olur (45). Tie-2 reseptörü endotel hücrelerindeki ekspresyonu yanı sıra hematopoetik hücreler, endotel öncü hücreler ve tümör hücreleri ve melanom hücrelerinden eksprese olur. Monosit subpopulasyonunda Tie-2 pozitifliği anjiogenik aktivite ile ilişkilidir. Büyük damarların endotel hücrelerinde Tie-2 ekspresyonu küçük damarlardaki ekspresyonu ile karşılaştırıldığında daha fazladır. Tümör anjiogenezi esnasında Tie-2 ekspresyonu artar. Ligant bağlandığında reseptör dimerize olur (42).

Tie-1 ve Tie-2 Ig benzeri ve EGF benzeri kısımlar içerir. Ekstrasellüler kısım üç immunglobulin benzeri domain, üç EGF benzeri domain ve üç fibronektin tip III domaini içerir. Her iki reseptörde hücre içi domain kısa olup bölünmüş kinaz domaini içerir (Şekil8). Tie-1 ve Tie-2 reseptörlerinin sitoplazmik kısımları %76 benzer dizilim gösterir fakat ekstrasellüler kısımları %33 benzerliğe sahiptir (42).



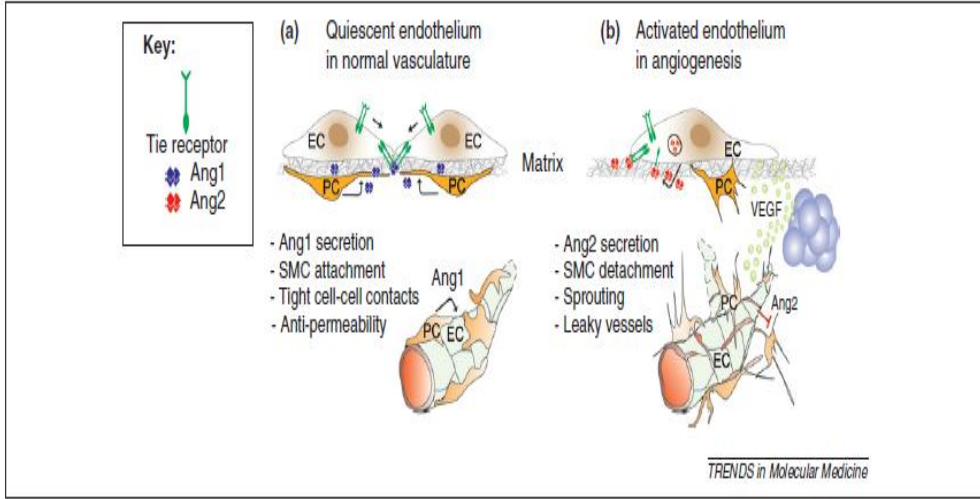
Şekil 8. Tie reseptör yapısı (42).

Anjiopietin-1, Anjiopietin-2, Tie-1 ve Tie-2, VEGF tarafından ilk damar pleksusunun oluşumundan sonraki gelişim sırasında damar yeniden şekillenmesi ve olgunlaşması için gereklidirler. Anjiopietin-1 ve Tie-2 kalp gelişimi için, Tie-1 ve anjiopietin-2 lenfatik gelişim için gereklidir. Anjiopietin-1 mural hücrelerin yokluğunda bile vasküler korumayı uyarır ve endotel hücreleri arasındaki boşlukları azaltarak VEGF ve

inflamasyonu kapsayan çeşitli ajanlarla uyarılmış damar geçirgenliğini dengeler. Egzojen anjiopietin-1 endotelial glikokaliksi arttırarak, sağlam küçük damarlarda damar geçirgenliğini azaltır. Bunun tersine anjiopietin-2 anjiogenik koşullarda perisitlerin ayrılmasını uyarır ve inflamasyon sırasında damar yeniden şekillenmesine aracılık eder (9).

İnflamasyon, tümör gibi nedenlerle uyarılmamış damarlarda anjiopietin-1 perisitlerde ve düz kas hücrelerinden üretilirken, reseptörü Tie-2 öncelikle endotel hücrelerinden eksprese olur. Anjiopietin-2 endotelial Weibel-Palade cisimlerinde depolanır ve trombin, histamin ve sfingozin 1-fosfat gibi çeşitli uyarılara cevap olarak salınır. Anjiopietin-1'in tümör hücreleri tarafından ılımlı ekspresyonu söz konusudur. Anjiopietin-2 ise aktive endotel tarafından üretilirken çoğu tümör hücresi tarafından üretilmez. Hipoksinin gelişimini ile VEGF üretimi ve anjiogenezin başlamasını takiben artmış anjiopietin-2 ekspresyonu damar regresyonuna ve perisitlerin ayrılmasına yol açar. Hücre biyolojisi çalışmaları anjiopietin-1 ve anjiopietin-2'nin aynı Tie-2 reseptörü üzerinden anjiogenezi ve damar stabilitesini uyarmasını nasıl gerçekleştirdiği konusunda fikir vermiştir (9).

Ang-1'in Tie-2 agonist etkisi hem in vitro hem de in vivo çalışmalarla desteklenmiştir. Ang-1 Tie-2'ye bağlanır ve tirozin fosforilasyonu yolu ile Tie-2 aktivasyonunu uyarır. Ang-1'in endotel hücreleri üzerindeki etkilerini fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K)-Akt yolağı üzerinden gösterir (46). PI3- kinaz protein kompleksi adaptör proteinler Grb2 ve Grb14, p85 subuniti ve Dok-R molekülünü içerir. Sinyal yolağında protein kinaz B/Akt yolağı (antiapoptotik yolakta önemli) ve p21 aktive protein kinaz (PAK, hücre göçünde önemli) aktive olur ve hücre göçü, apoptozun inhibisyonu gibi etkilere aracılık eder. Ang-1/Tie-2 yolağı embryonik gelişme, fizyolojik anjiogenez, damar bütünlüğünün korunması, inflamasyon ve tümör büyümesinde önemli roller oynar (47).



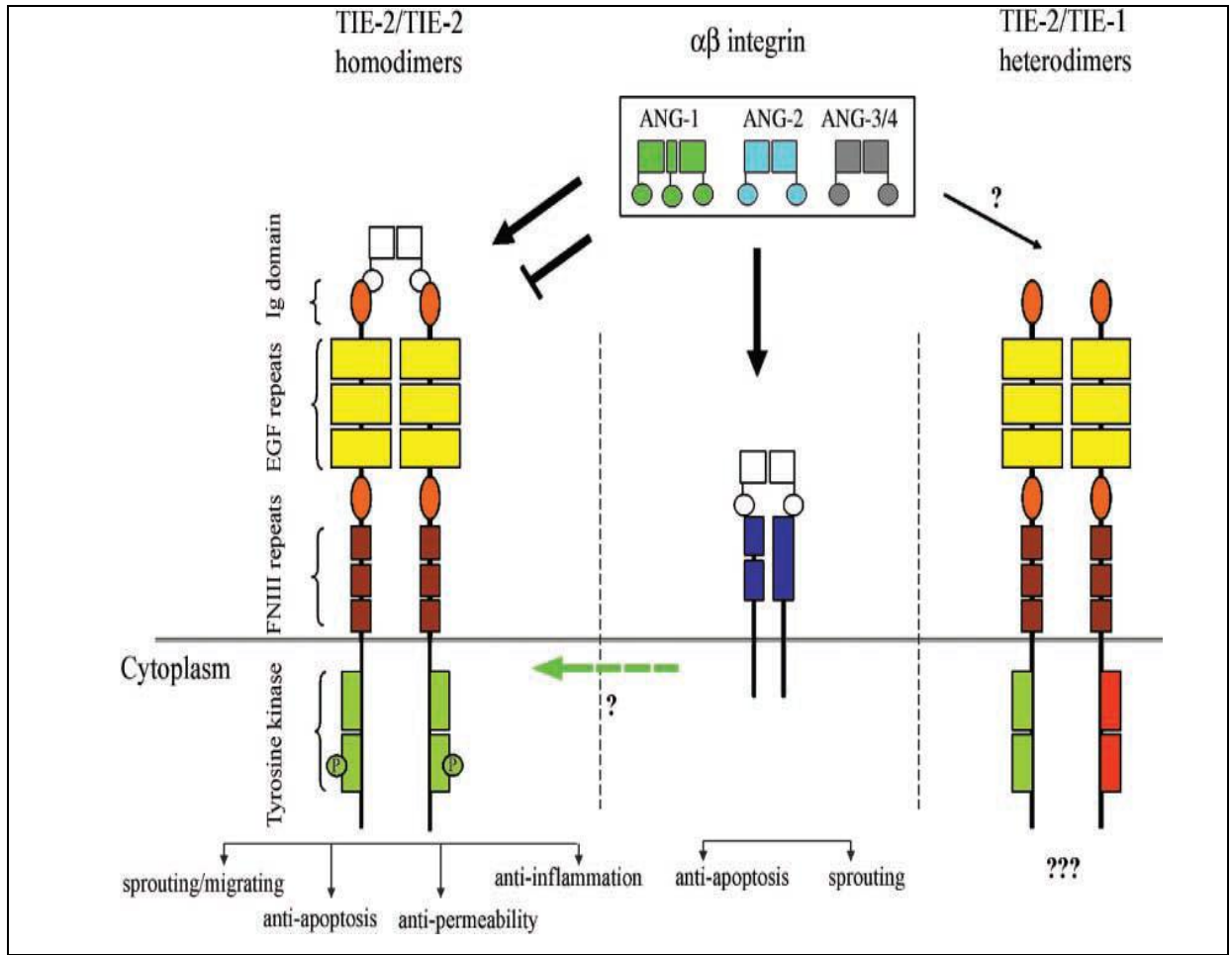
Şekil 9. Aktive tümör endotelinde ve normal damarlarda anjiopietin sinyalizasyonu . **a)** Endotel hücreleri anjiopietin-1 salgılayan perisit hücreleri ile kaplanmıştır. Anjiopietin- 1 damar stabilitesini ve endotel hücre sağkalımını teşvik eder. **b)** Anjiopietin -2 endotel hücrelerdeki Weibel-Palade cisimlerinde depolanır, damarların yeniden şekillenme bölgelerinde otokrin faktör olarak salgılanır (inflamasyon, yara veya tümör gelişimindeki gibi). Pasif endotel hücrelerinin aksine anjiogenik mobil endotel hücrelerinde anjiopietin bağlı Tie-2 reseptörü tercihen hücre ekstrasellüler matriks bağlantı bölgelerinde lokalize olup hücre göçü sırasında endotel hücre ile ekstrasellüler matriks etkileşimlerini yönetir. Tümörde anjiopietin-2 hipoksi ile artar ve yeni damar endotelinde ortaya çıkan ilk markırlardan biridir. Anjiopietin-2 uyarılmış endotel hücrelerinde anjiopietin-1’i antagonize eder ve VEGF gibi sitokinlere endotel hücre yanıtını geliştirir. Hücre kültürlerinde aşırı düzeydeki anjiopietin-2 Tie-2’ye bağlanmak için anjiopietin-1 ile yarışır ve EC-EC kavşaklarında Tie-2 tirozin fosforilasyonunu azaltır. Damarların normal kararlı hallerinde anjiopietin-1 damar maturasyonunu artırır ve sıvı sızıntısını inhibe eder oysaki anjiopietin-2’nin eksprese olduğu tümör kan damarlarında bazal membran organizasyonu kötüdür ve perisit hücre tabakası eksik olup damardan sızma olur (9).

Anjiopietin-2 aktive olan endotelden, endoteliyal Weibel-Palade cisimlerinden salınır bu anjiopietin-1-Tie2 sinyalizasyonunun antagonize edilmesini mümkün kılar böylece VEGF ve TNF α gibi ekzojen sitokinlere endotel hücre yanıtını kolaylaştırır (9). Ang-2’nin embriyodaki aşırı ekspresyonu sonucu damar sisteminin gelişimi bozulur bu da anjiogeneze antagonist olduğunu düşündürür. Ayrıca ang-2 anjiogeneze bFGF ile VEGF’ün sinerjik etkisini antagonize eder ve VEGF’ün anjiogenik aktivitesini dengeler (43). Ang-2’nin Tie-2 reseptörü ile durum bağımlı agonist ve antagonist ilişkisi damar gelişiminde ang-2’nin

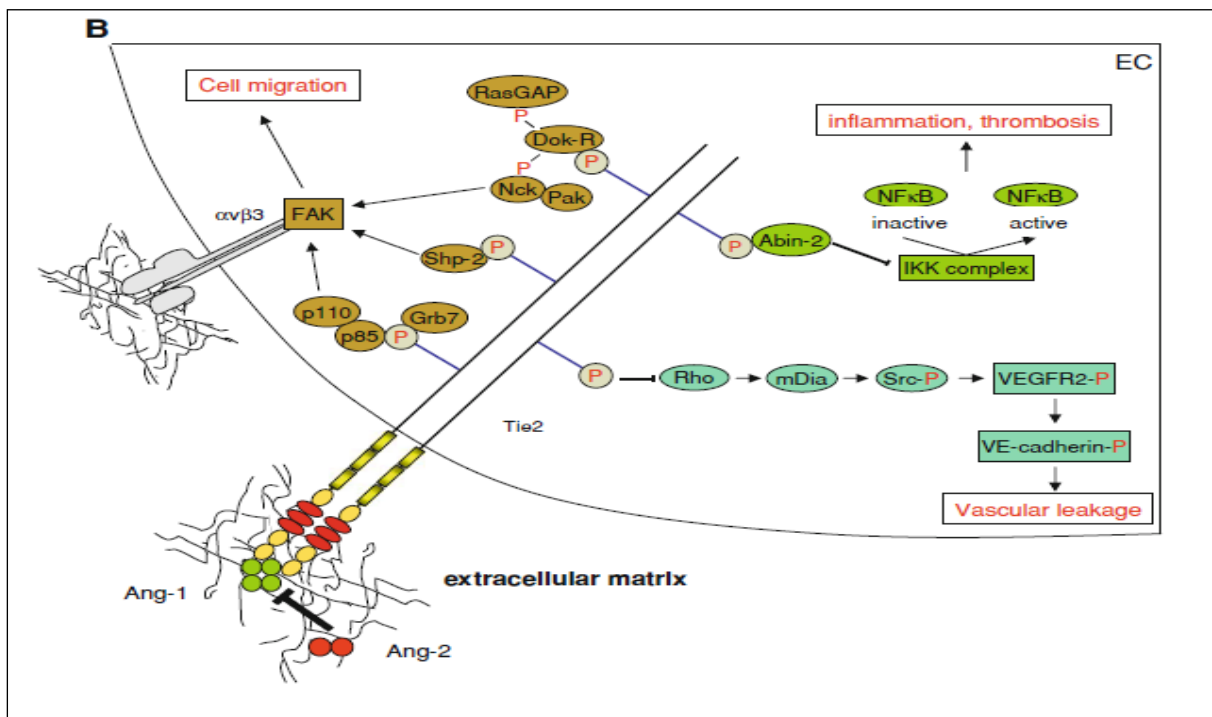
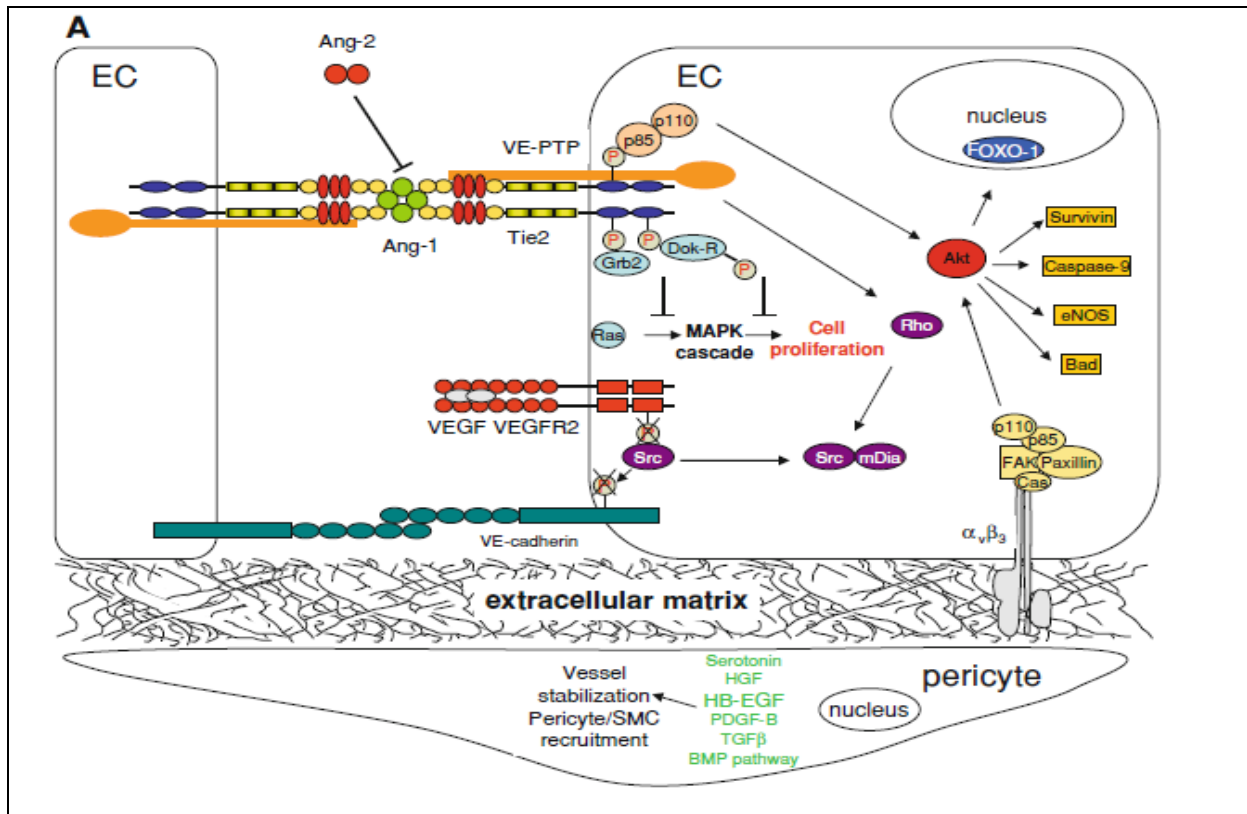
fonksiyonunun anlaşılmasını daha karmaşık hale sokmuştur. Tie-2'nin hücre içi sinyal yolağı birçok sitokini içerir bu da reseptörün regulasyon ve koordinasyonunun doza ve zamansal-uzamsal (spatiotemporal) olarak davranabileceğini düşündürür (43, 45). Ang-2 doğal olarak Tie-2'nin kompatitif antagonistidir. Ang-2 düzeyinin artışı hem in vivo hemde in vitro ang-1/Tie-2 sinyalizasyonunu inhibe edebilir fakat bazı çalışmalarda ang-2'nin etkilerinin doz ve durum bağımlı olduğu belirtilmiştir (46). VEGF varlığında ang-2, damar filizlenmesini teşvik eder böylece VEGF'nin stimülasyonunu artırır. VEGF'nin yokluğunda ang-2 damar regresyonunu hızlandıran bir suppresör olarak görev yapar (Şekil 12) (48).

Endotel hücre biyolojisinde Ang-1'in etkisi hakkında fikirbirliği olmasının aksine ang-2'nin damar olgunlaşması ve embryonik gelişme esnasındaki anjiogenezdeki etkisi ile ilgili çelişkili sonuçlar mevcuttur (47).

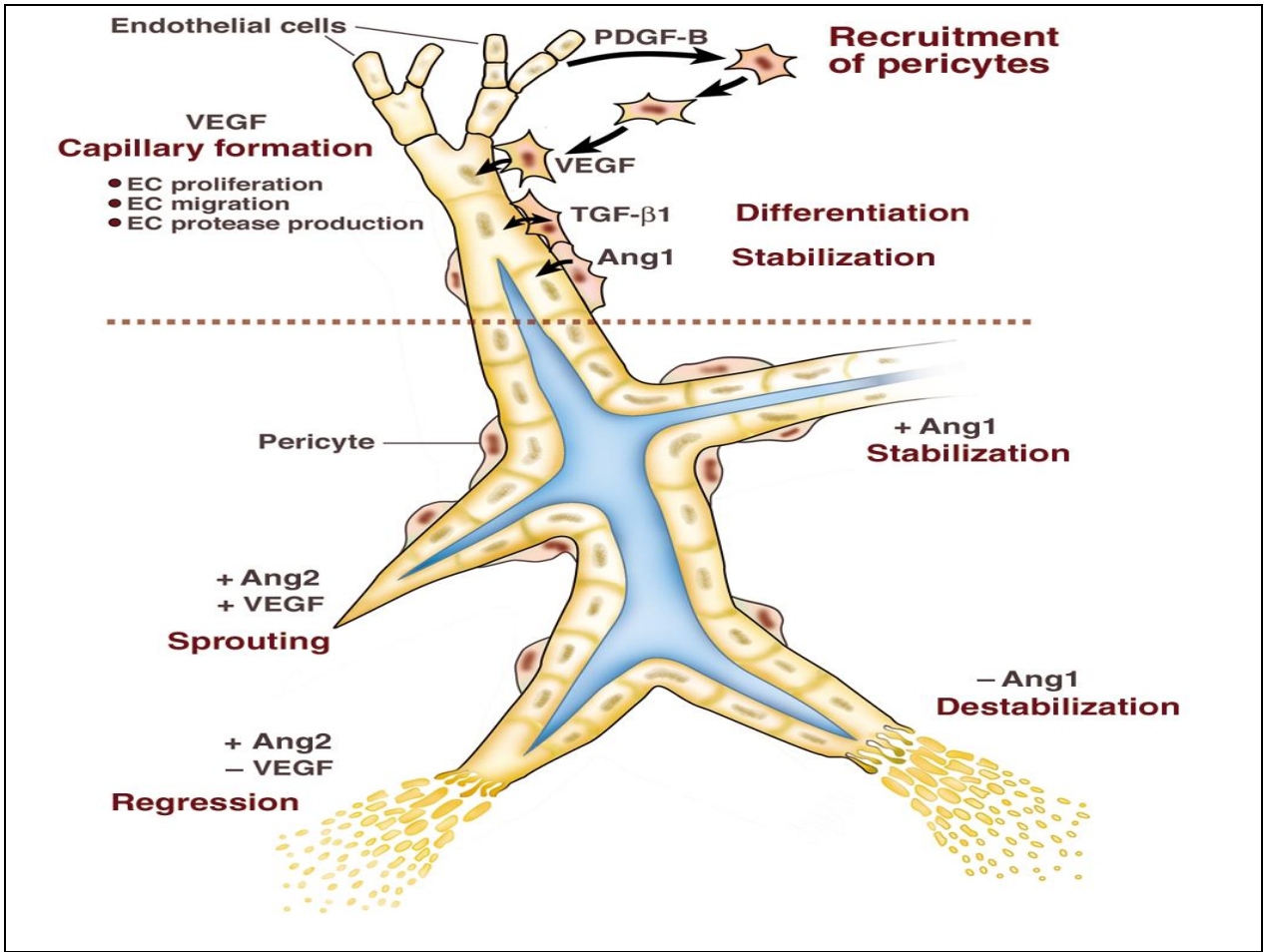
Sonuç olarak; ang-1, TIE-2'ye bağlanır ve endotel hücreleri ile çevresindeki ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimi teşvik ederek damarları stabilize eder, ang-2 ise yarışmalı olarak TIE-2'ye bağlanır ve ang-1'in stabilize edici etkisini antagonize ederek damarlarda destabilizasyona yol açar (49).



Şekil 10. Anjiopietinlerin reseptöre bağlanmasının yapısal organizasyonu (43).



Şekil 11. Anjiopietinlerin sinyalizasyonunun düzenlenmesi (42).



Şekil 12. Damar yapılanmasında multifaktöryal regülasyon (50).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. ARAÇ ve GEREÇLER

3.1.1. Cihazlar ve Kitler

Tablo 10. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka	Model	Üretici Firma
ELISA plak okuyucusu	BioTek	KC4	BioTek, USA
ELISA plak yıkayıcısı	Thermo	Wellwash 4MK2	Thermo, USA
Mikroplate shaker	IKA	KS 130 B	IKA, Germany
Saf su cihazı	Milipore Mili-Q	ZLX55003Y	Hettich Co, Germany
Santrifüj	Heraeus	Biofuge stratos	Heraeus, Germany
Tissuelyser II	Qiagen	85300	Retsch, Germany
Paslanmaz çelik boncuk	Qiagen	69989	Retsh, Germany
Homojenizasyon reaksiyon tüpü	Greiner	623201	Germany
Otomatik pipetler	Transferpette-8		Brand, Germany
Derin dondurucu	Thermo	VLT1740-5-V40	Thermo Electron Co, USA

Tablo 11. Çalışmada kullanılan kitler

Kit Adı	Yöntem	Katalog No	Firma
Human VEGF ELISA	Enzim İmmunassay	DVE00	Quantikine ®
Human Anjiopietin-1 ELISA	Enzim İmmunassay	DANG10	Quantikine ®
Human Anjiopietin-2 ELISA	Enzim İmmunassay	DANG20	Quantikine ®
BCA Protein Assay	Kolorimetrik	23225	Pierce ®

3.2. OLGULARIN SEÇİMİ, ÖRNEKLERİN TOPLANMASI ve SAKLANMASI

DEÜTF Hastanesi Göğüs Cerrahisi AD'ne başvuran ve operasyon planlanmış primer akciğer kanserli 34 hasta çalışmaya dahil edildi. Akciğer karsinoid tümörleri, kemoterapi, radyoterapi almış ve akciğer dışı malignitesi olan hastalar çalışmadan dışlandı. Kontrol grubu olarak 32 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi. Bu bireyler Göğüs Hastalıkları Sigara Bırakma Polikliniğine başvuran ve rutin tetkiklerinde (Akciğer grafisi, EKG, solunum fonksiyon testi, rutin biyokimya testleri) akciğer malignitesi olmadığı saptanan kişiler arasından seçildi.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar ve kontrol grubundaki bireylere bilgilendirilmiş onam formu okutulduktan sonra imzalatıldı. (EK 1 ve EK 2)

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 25 Haziran 2009 tarihli ve 24/15/2009 sayılı etik kurul onayı alındıktan sonra başlatıldı (EK 3).

Hastalardan operasyon öncesi 5 cc düz kan alındı, 4000g santrifüj sonrası ayrılan serum analize kadar -40 °C da saklandı. Ayrıca operasyon materyalinin patoloji uzmanı tarafından uygun görülen bölgelerinden yaklaşık 300-400 mg tümör dokusu ve en az 5 cm uzağından eşlenik normal akciğer dokusu alındı ve serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra analize kadar -80°C da saklandı.

Hastaların klinikopatolojik verileri hastane bilgi işlem sisteminden alındı. Klinikopatolojik veriler olarak yaş, cinsiyet, tümör boyutu, tümörün histolojik tipi, histolojik differansiyasyon derecesi, patolojik TNM, ven invazyonu, arter invazyonu, lenf damarı invazyonu, perinöral invazyon değerlendirildi.

3.3. DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

Homojenizasyon Protokolü:

1. 2 mL mikrosantrifüj tüpünün içine bir tane paslanmaz çelik boncuk (5mm çapında) konuldu ve en az 15 dakika kuru buz üzerinde inkube edildi.

2. Dokular -80°C 'dan çıkarılarak $+4^{\circ}\text{C}$ de çözüldü. 100 mg tartıldı ve önceden soğutulmuş tüplere konularak kuru buz üzerinde 15 dakika inkübe edildi.
3. Mikrosantrifüj tüpleri Tissuelyser LT adaptörüne (TissueLyser LT adaptörü oda sıcaklığında tutuldu) yerleştirildi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Tüplere 600 μL (1:7 oranında) homojenizasyon tamponu (pH: 7.4 Tris HCl 20 mM, 5 Mm MgCl_2 , 20 μM Pepstatin A, 20 μM Leupeptin, 50 μM PMSF) ilave edildi.
5. Raklar TissueLyser (Qiagen-Almanya) cihazına yerleştirildi.
6. Frekans 50, zaman 5 dakikaya ayarlandı (Program 1)
7. Elde edilen homojenat $+4^{\circ}\text{C}$ de 5000g de 10 dakika santrifuj edildi.
8. Santrifuj sonrası elde edilen supernatanlar alikvatlanarak total protein ölçümü ve biyokimyasal analizlere kadar -20°C saklandı (51).

3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

3.4.1. VEGF Ölçüm Yöntemi

Patolojik olarak tanı almış 34 akciğer kanserli hastanın serumları, tümörlü ve eşlenik normal akciğer dokularında ve 32 sağlıklı kontrol grubunun serumlarında VEGF düzeyi ölçümü ticari ELISA kiti (Quantikine R&D) (Katalog No: DVE00) ile gerçekleştirildi.

Test prensibi: VEGF'i kantitatif olarak tespit eden enzim bağlı immüno-sorbent ölçüm yöntemine (ELISA: Enzim-Linked ImmunoSorbent Assay) dayanmaktadır. Bu teknikte kuyucuklar VEGF'e karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlarla kaplanmıştır. Standartlar ve örneklerde bulunan insan VEGF'i kuyucuklara kaplanmış olan antikor tarafından tutulur. Yıkama ile bağlanmamış komponentler uzaklaştırılır. Daha sonra VEGF'e spesifik enzim bağlı poliklonal antikor içeren VEGF konjugatı eklenir. İkinci inkubasyon sürecinde, bu antikor standart ya da örnekteki insan VEGF'a bağlanır. Bağlanmayan sekonder antikorların uzaklaştırılması amacıyla yapılan yıkama işleminden sonra substrat solusyonu ilave edilir. Işıktan korunarak inkübe edilir. Enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan rengin yoğunluğu, örnekte bulunan VEGF miktarı ile doğru orantılıdır. Reaksiyon ortamına asit ilavesi ile

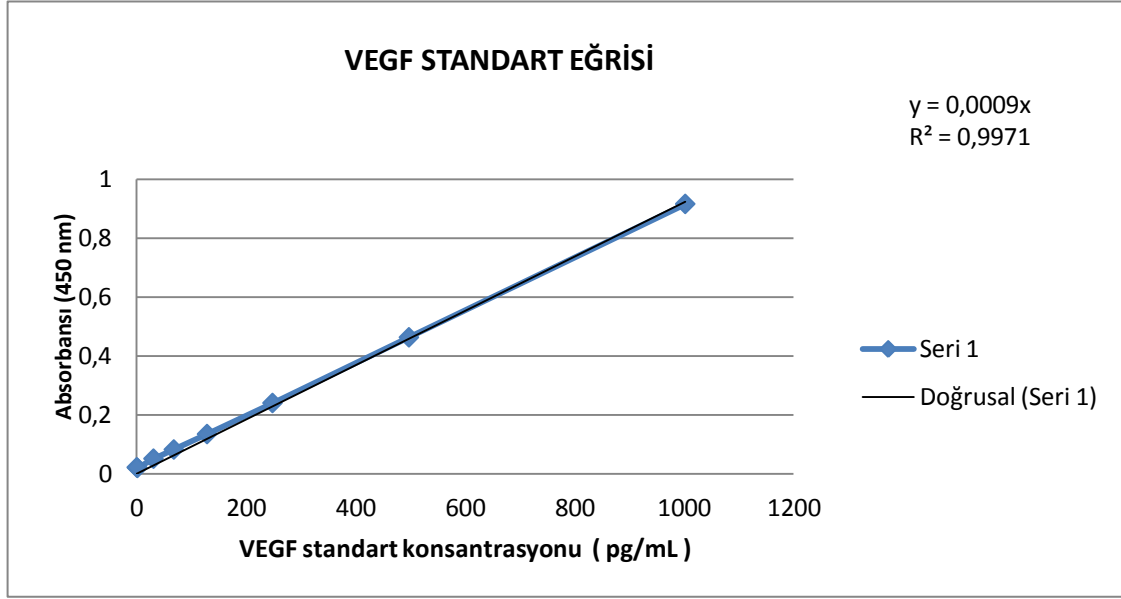
sonlandırılır ve 450 nm’de ölçüm yapılır. (Düzeltilme dalga boyu 540 nm). İnsan VEGF’ inden hazırlanan 7 farklı dilüsyondaki standarttan standart grafiği çizilerek örnekteki VEGF konsantrasyonları saptanır.

Yöntemin ölçüm aralığı: 9.0 – 1000 pg/mL

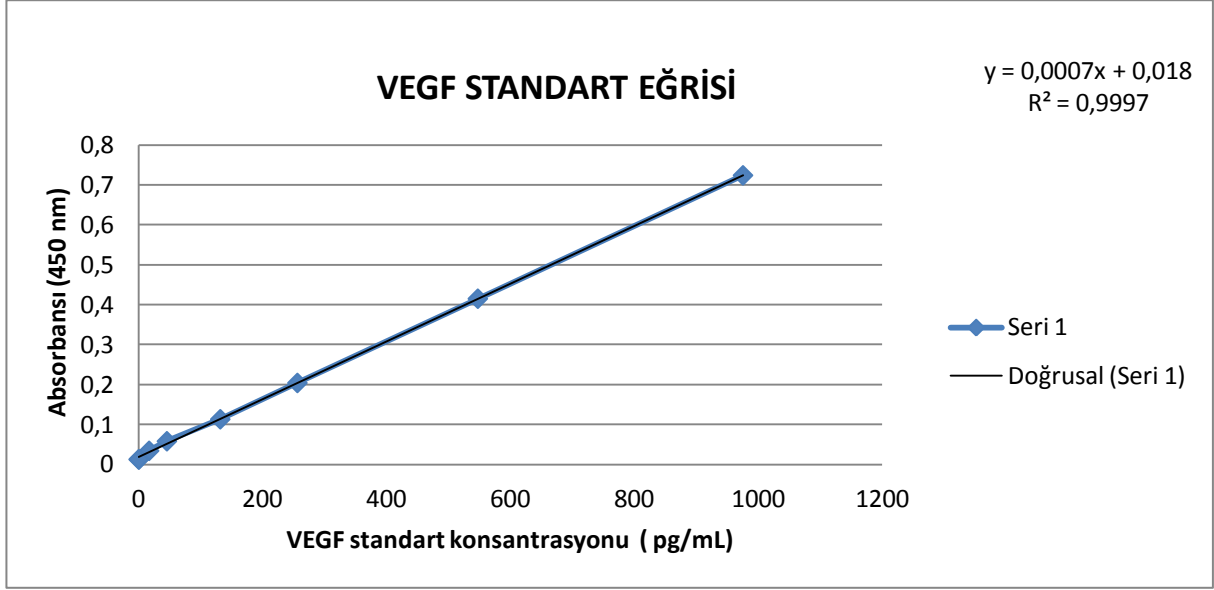
Standart Hazırlanışı ve Analiz Aşamaları :

- Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi.
- Standartlar hazırlanırken polipropilenli tüpler kullanıldı. Liyofilize standart 1000 µL kalibratör diluent RD6U ile çözülerek 2000 pg/mL’lik stok solüsyon hazırlandı. Standartın iyice çözünmesi için 15 dakika bekletildi. 2000 pg/mL stok solüsyonundan 500 µL alınarak, daha önceden içerisine 500 µL kalibratör dilüent RD6U konmuş 7 polipropilenli tüpte 1:2 seri dilüsyonlar yapılarak 7 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 pg/mL).
- Serum örneklerinde dilüsyon yapılmadan, doku süpernatantlarında ise yapılan ön dilüsyon çalışması (1/2, 1/5, 1/10) sonucuna göre doku homojenizasyon tamponu ile 1:2 dilüsyon yapılarak çalışıldı.
- Çalışılacak 96’lık ELISA plağındaki her kuyucuğa Assay diluentten RD1W’den 100 µL pipetlendi.
- Hazırlanan 7 farklı konsantrasyondaki standartlar (çift olarak) ve örnekler kuyucuklara 100’er µL pipetlendi. Kör olarak kalibratör dilüent RD6U kullanıldı.
- 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda plak 3 kez 400’er µL yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 200 µL VEGF konjugatı eklendi.
- 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda plak 3 kez 400’er µL yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 200 µL substrat solüsyonu eklendi. Işıktan korundu.

- 25 dakika boyunca oda sıcaklığında inkubasyona bırakıldı.
- Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendi.
- 30 dakika içinde 450 nm'de (540 nm düzeltme dalga boyu) ölçüm yapıldı.
- Serum ve doku VEGF konsantrasyonları hazırlanan iki farklı standart grafiğinden yararlanarak hesaplandı. Doku VEGF konsantrasyonları pg/mg protein başına verildi. Dilusyon yapılan tüm örnekler dilusyon oranları ile çarpıldı.



Grafik 1. Serum VEGF standart eğrisi



Grafik 2. Doku homojenatı VEGF standart eğrisi

3.4.2. ANJİOPOİETİN-1 Ölçüm Yöntemi

Patolojik olarak tanı almış 34 akciğer kanserli hastanın serumları, tümörlü ve eşlenik normal akciğer dokularında ve 32 sağlıklı kontrol grubunun serumlarında anjiopietin-1 düzeyi ölçümü ticari ELISA kiti (Quantikine R&D) (Katalog No: DANG 10) ile gerçekleştirildi.

Test prensibi: Anjiopietin-1'i kantitatif olarak tespit eden enzim bağlı immünosorbent ölçüm yöntemine (ELISA: Enzim-Linked ImmunoSorbent Assay) dayanmaktadır. Bu teknikte kuyucuklar anjiopietin-1'e karşı geliştirilmiş monoklonal antikörlerle kaplanmıştır. Standartlar ve örneklerde bulunan insan anjiopietin-1'i kuyucuklara kaplanmış olan antikör tarafından tutulur. Yıkama ile bağlanmamış komponentler uzaklaştırılır. Daha sonra anjiopietin-1'e spesifik enzim bağlı monoklonal antikör içeren anjiopietin-1 konjugatı eklenir. İkinci inkubasyon sürecinde, bu antikör standart ya da örnekteki insan anjiopietin-1'e bağlanır. Bağlanmayan sekonder antikörlerin uzaklaştırılması amacıyla yapılan yıkama işleminden sonra substrat solusyonu ilave edilir. Işıktan korunarak inkübe edilir. Enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan rengin yoğunluğu, örnekte bulunan anjiopietin-1 miktarı ile doğru orantılıdır. Reaksiyon ortama asit ilavesi ile sonlandırılır ve 450 nm'de ölçüm yapılır (Düzeltilme dalga boyu 540 nm). İnsan anjiopietin-

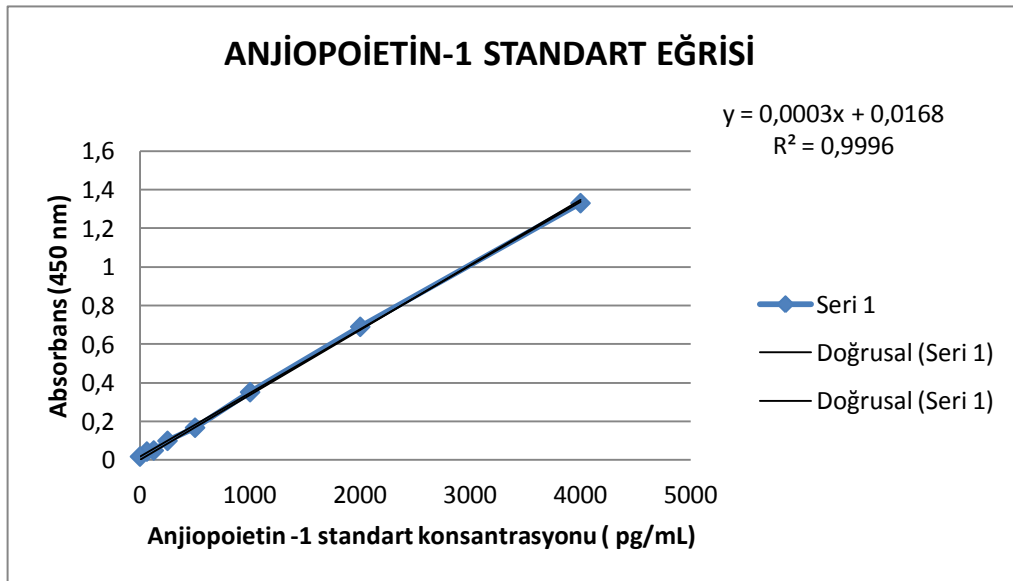
1'inden hazırlanan 7 farklı dilüsyondaki standarttan standart grafiği çizilerek örnekteki anjiopietin-1 konsantrasyonları saptanır.

Ölçüm aralığı: 3.45 – 4000 pg/mL

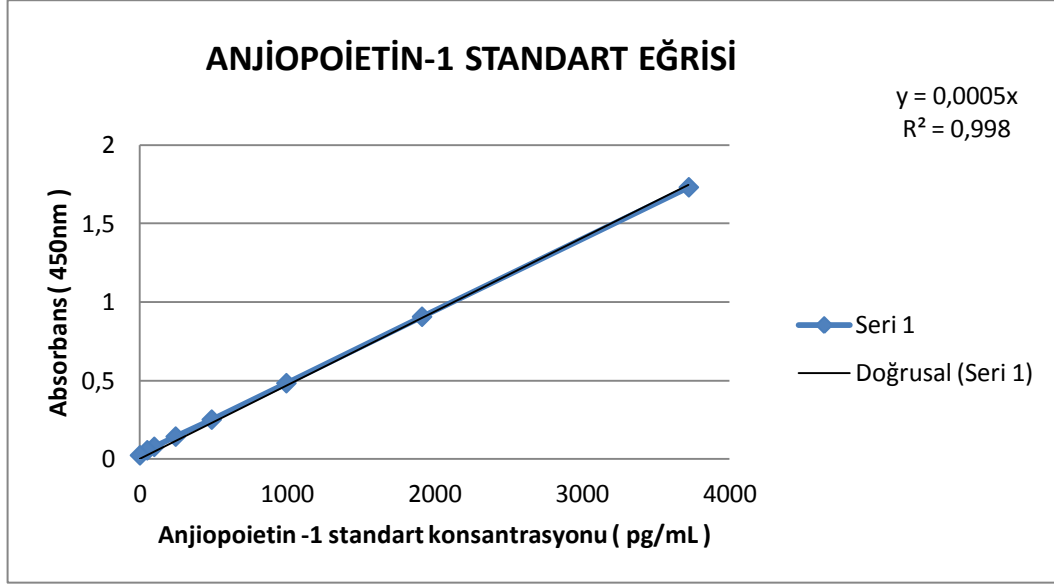
Standart Hazırlanışı ve Analiz Aşamaları :

- Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirilerek çalışıldı.
- Standartlar hazırlanırken polipropilenli tüp kullanıldı. Stok standart, konsantrasyonu 40.000 pg/mL olacak şekilde 1 mL distile su ile hazırlandı. Stok standart solusyonundan 100 µL, kalibratör dilüent RD5P'den 900 µL alınıp 1:10 dilüsyonla 4000 pg/mL konsantrasyonundaki 1. tüp hazırlandı. Sonra seri dilüsyon yapılarak 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 pg/mL konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Sekizinci tüpe kör olarak kalibratör dilüent RD5P tamponu eklendi.
- Serum örneklerinde 1:50 dilüsyon, doku süpernatantlarında ise yapılan ön dilüsyon çalışması (1/2, 1/5, 1/10) sonucuna göre doku homojenizasyon tamponu ile 1:10 dilüsyon yapılarak çalışıldı.
- Tüm kuyucuklara 100 µL assay dilüent RD1 eklendi.
- Hazırlanan 7 farklı konsantrasyonda standartlar (çift olarak) ve örnekler kuyucuklara 50'şer µL pipetlendi. Kör olarak kalibratör dilüent RD5P kullanıldı.
- 2 saat boyunca oda sıcaklığında üstü kapalı olarak ELISA plağı yatay çalkalayıcıya (500 ± 50 rpm) bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda içerik aspire edilip plak 4 kez 400'er µL yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 200 µL Anjiopietin-1 konjugatı eklendi.
- 2 saat boyunca oda sıcaklığında üstü kapalı olarak ELISA plağı yatay çalkalayıcıya (500 ± 50 rpm) bırakıldı.

- İnkübasyon sonunda içerik aspire edilip plak 4 kez 400'er µL yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 200 µL substrat solusyonu eklendi.
- 30 dk boyunca oda sıcaklığında ışıktan koruyarak (karanlık ortamda) inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklara 50 µL reaksiyon sonlandırma solusyonundan eklendi.
- Tüm kuyucuklarda oluşan renk yoğunluğu 450 nm'de (Düzeltme dalga boyu 540 nm) ölçüldü.
- Serum ve doku Anjiopietin-1 konsantrasyonları hazırlanan iki farklı standart grafiğinden yararlanarak hesaplandı. Doku Anjiopietin-1 konsantrasyonları pg/mg protein başına verildi. Dilusyon yapılan tüm örnekler dilusyon oranları ile çarpıldı



Grafik 3. Serum Anjiopietin-1 standart eğrisi



Grafik 4. Doku homojenatı Anjiopietin-1 standart eğrisi.

3.4.3. ANJİOPOİETİN -2 Ölçüm Yöntemi

Patolojik olarak tanı almış 34 akciğer kanserli hastanın serumları, tümörlü ve eşlenik normal akciğer dokularında ve 32 sağlıklı kontrol grubunun serumlarında anjiopietin-2 düzeyi ölçümü ticari ELISA kiti (Quantikine R&D) (Katalog No: DANG 20) ile gerçekleştirildi.

Test prensibi: Anjiopietin-2’i kantitatif olarak tespit eden enzim bağlı immünosorbent ölçüm yöntemine (ELISA: Enzim – Linked ImmunoSorbent Assay) dayanmaktadır. Bu teknikte kuyucuklar anjiopietin-2’e karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlarla kaplanmıştır. Standartlar ve örneklerde bulunan insan anjiopietin-2’i kuyucuklara kaplanmış olan antikor tarafından tutulur. Yıkama ile bağlanmamış komponentler uzaklaştırılır. Daha sonra anjiopietin-2’e spesifik enzim bağlı monoklonal antikor içeren anjiopietin-2 konjugatı eklenir. İkinci inkubasyon sürecinde, bu antikor standart ya da örnekteki insan anjiopietin-2’e bağlanır. Bağlanmayan sekonder antikorların uzaklaştırılması amacıyla yapılan yıkama işleminden sonra substrat solusyonu ilave edilir. Işıktan korunarak inkübe edilir. Enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan rengin yoğunluğu, örnekte bulunan anjiopietin-2 miktarı ile doğru orantılıdır. Reaksiyon ortama asit ilavesi ile sonlandırılır ve 450 nm’de ölçüm yapılır (Düzeltme dalga boyu 540 nm). İnsan anjiopietin-

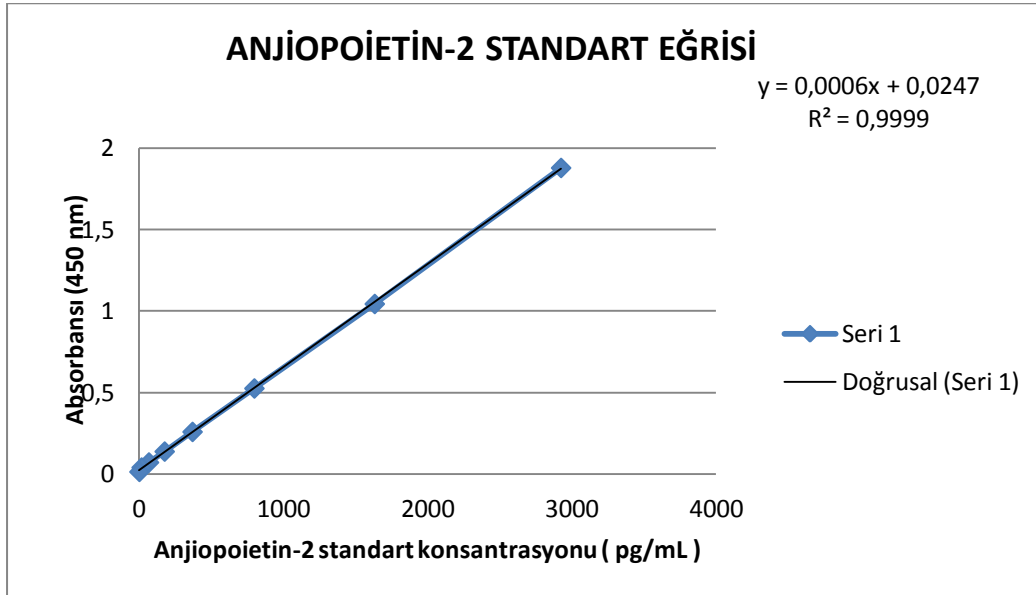
2'inden hazırlanan 7 farklı dilüsyondaki standarttan standart grafiği çizilerek örnekteki anjiopietin-2 konsantrasyonları saptanır.

Ölçüm aralığı: 8.29 - 3000 pg/mL

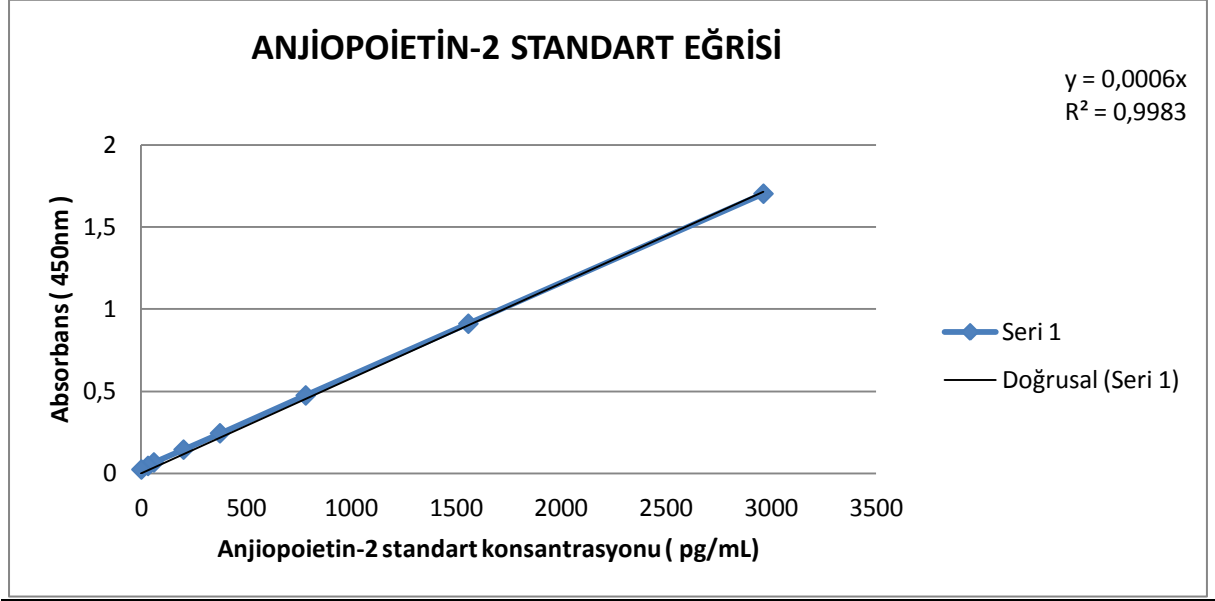
Standart Hazırlanışı ve Analiz Aşamaları :

- Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi.
- Standartlar hazırlanırken polipropilenli tüp kullanıldı. Liyofilize standart, üzerinde yazan miktar kadar (1000 µL) distile su ile çözülerek 30.000 pg/mL'lik stok solusyon hazırlandı. Standardın iyice çözünmesi için 15 dakika yavaşça karıştırıldı. 30.000 pg/mL stok solusyonundan 100 µL alınarak, daha önceden içerisine 900µL kalibratör dilüent RD5-5 konmuş ilk eppendorf tüpte 1:10 dilüsyon yapıldı. Sonraki 6 eppendorfa 500 µL kalibratör dilüent RD5-5 konuldu, hazırlanmış olan ilk eppendorftan 1:2 seri dilüsyonlar yapılarak 7 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı (3000; 1500 ; 750; 375; 187.5; 93.7; 46.9 pg/mL).
- Serum örneklerinde 1: 5 dilüsyon, doku süpernatantlarında ise yapılan ön dilüsyon çalışması (1/2, 1/5, 1/10) sonucuna göre doku homojenizasyon tamponu ile 1:2 dilüsyon yapılarak çalışıldı.
- Tüm kuyucuklara 100 µL assay diluent RD1-76 eklendi.
- Hazırlanan 7 farklı konsantrasyonda standart (çift olarak) ve örnekler kuyucuklara 50'er µL pipetlendi. Kör olarak RD5-5 kullanıldı.
- 2 saat oda sıcaklığında ELISA plak çalkalayıcıda inkube edildi.
- Plak 4 kez 400 µL yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 200 µL Anjiopietin-2 konjugatı eklendi.
- 2 saat boyunca oda sıcaklığında ELISA plak çalkalayıcıya inkube edildi.
- Plak 5 kez 400 µL yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 200 µL substrat solusyonu eklendi.

- 30 dk boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda inkubasyona bırakıldı.
- Tüm kuyucuklara 50 µL reaksiyon sonlandırma solusyonundan eklendi.
- Tüm kuyucuklarda oluşan renk yoğunluğu 450 nm’de ölçüldü. (Düzeltilme dalga boyu 540 nm)
- Serum ve doku Anjiopietin-2 konsantrasyonları hazırlanan iki farklı standart grafiğinden yararlanarak hesaplandı. Doku Anjiopietin-2 konsantrasyonları pg/mg protein başına verildi. Dilusyon yapılan tüm örnekler dilusyon oranları ile çarpıldı.



Grafik 5: Serum Anjiopietin-2 standart eğrisi.



Grafik 6: Doku homojenatı Anjiopietin-2 standart eğrisi

3.4.4 TOTAL PROTEİN ÖLÇÜMÜ

Tümör ve eşlenik normal akciğer dokusunun homojenizasyonu sonrası elde edilen supernatanlarda doku total protein ölçümü Pierce BCA Protein ölçüm kiti (Katalog No: 23225) ile gerçekleştirildi.

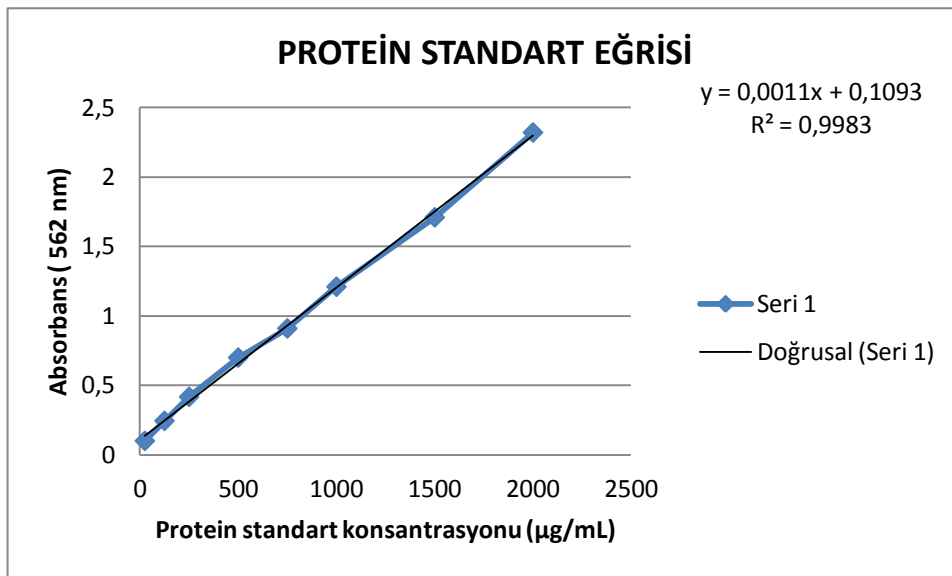
Test Prensipleri:

Protein düzeyleri Bicinkoninik asit (BCA) yöntemi ile belirlendi. Yöntemin temeli alkali ortamda Cu^{+2} -protein kompleksi oluşumuna ve Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesine dayanmaktadır. Örneklerde var olan protein miktarı indirgenmiş Cu^{+1} miktarı ile doğru orantılıdır. Oluşan renk 562 nm de spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

Standart Hazırlanışı ve Analiz Aşamaları :

- 2.0 mg/mL albumin stok standartının dilusyonu ile 8 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı (2000; 1500; 1000; 750; 500; 250; 125; 25 μ g/mL). Dilusyonda homojenizasyon tamponu (pH: 7.4 Tris HCl 20mM, 5Mm $MgCl_2$) kullanıldı .
- Standartların üç, doku supernatanlarının iki replikasyonu yapıldı.

- 25 µL hacimde standartlar ve örnekler mikropate kuyucuklarına pipetlendi.
- Her kuyucuğa 200 µL analiz reaktifi eklendi ve plate çalkalayıcıda 30 saniye çalkalandı.
- Plate 37 °C da 30 dakika inkube edildi.
- 562 nm de köre karşı spektrofotometrik olarak değerlendirildi.
- Standart eğrisi çizilerek doku protein konsantrasyonları hesaplandı.



Grafik 7: Protein standart eğrisi

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

3.5.1. Verilerin Kaydedilmesi

Analizlerden elde edilen veriler ‘Microsoft Office Excel 2007’ programı kullanılarak kaydedildi.

3.5.2. Verilerin Analizi ve Tablolar ile Gösterilmesi

İstatistiksel değerlendirmeler ve tablo hazırlama amacıyla ‘SPSS for Windows 15.0’ programı kullanıldı. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi için öncelikle ortalama değer ve standart

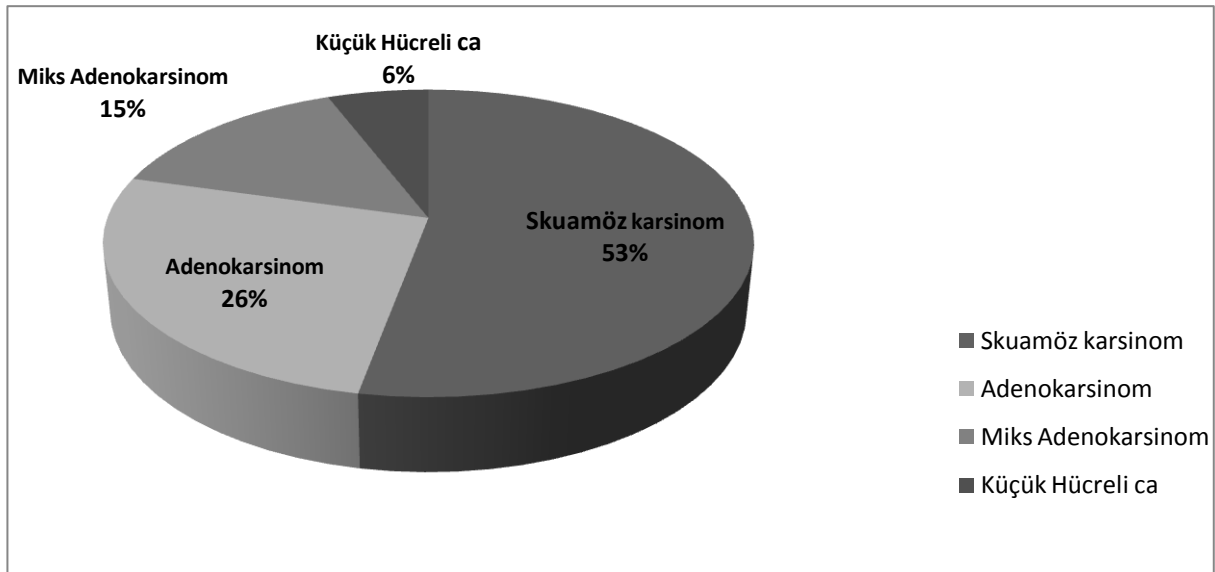
sapmaları hesaplandı. Grupların ortalamalarının karşılaştırılmasında parametrik independent samples t testi kullanıldı. Grupların ortanca değerlerinin birbirinden farklı olup olmadıklarını belirlemek için nonparametrik Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. İki bağımsız grup karşılaştırılmasında Mann - Whitney U testi, ikiden fazla grup karşılaştırılmasında Kruskal - Wallis testi kullanılmıştır. Grup parametreleri arasındaki korelasyonu belirlemek için "Spearman korelasyon testi" kullanıldı. Korelasyonun; $r = 0,00 - 0,24$ ise zayıf, $r = 0,25 - 0,49$ ise orta, $r = 0,50 - 0,74$ ise güçlü, $r = 0,75 - 1,00$ ise çok güçlü olarak değerlendirildi. $p < 0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

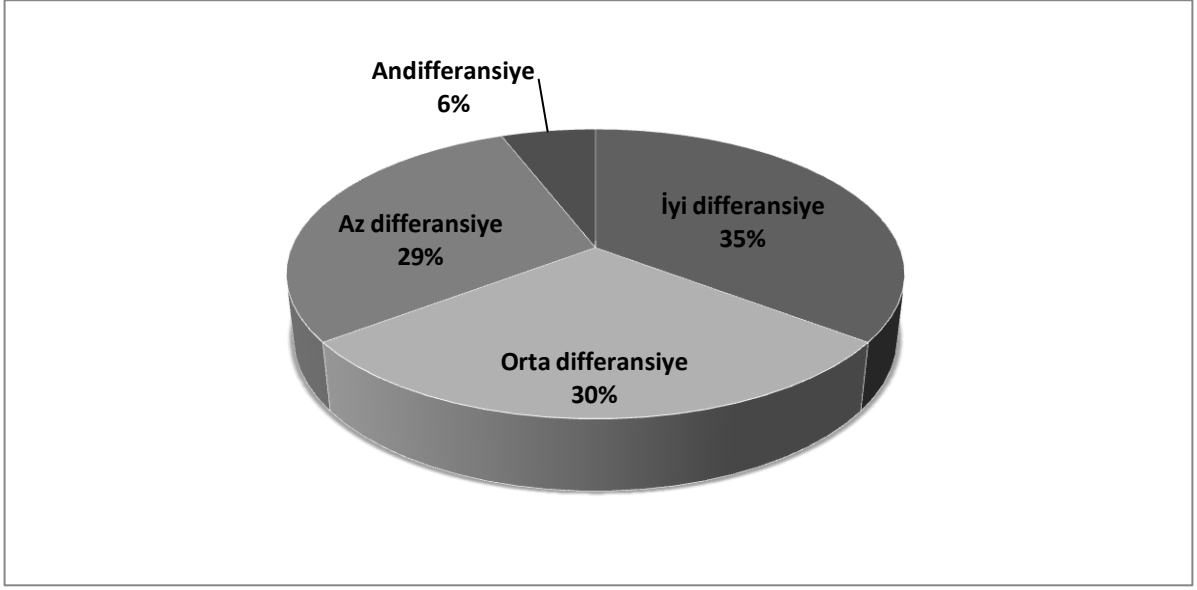
4.1. TANIMLAYICI BULGULAR

4.1.1. Çalışma Grubu

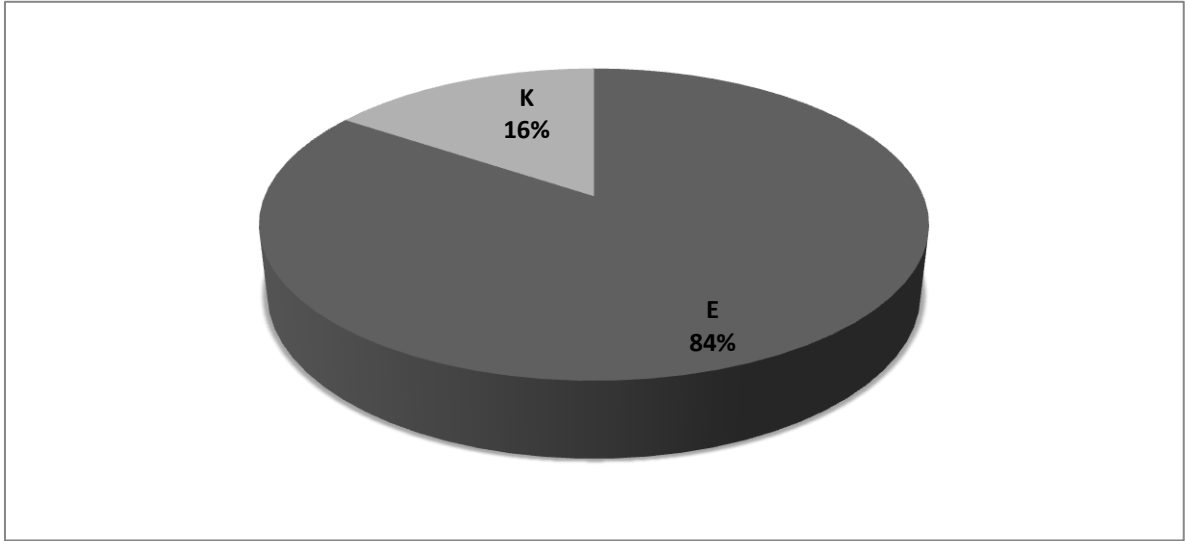
Histopatolojik sonuçlarına göre, 18 (%53) skuamöz hücreli karsinom, 9 (%26) adenokarsinom, 5 (%15) miks adenokarsinom ve 2 (%6) küçük hücreli karsinom olmak üzere toplam 34 hasta çalışmaya alındı (Şekil 13). Patolojik tanılarında hastaların 12'si iyi differansiye, 10'u orta differansiye, 12'si az differansiye olarak rapor edildi (Şekil 14). Hastaların 27'si erkek, 5'i kadın idi (Şekil 15). Kontrol grubu ise Göğüs Hastalıkları Sigara Bırakma Polikliniğine başvuran ve rutin tetkikler sonucu sağlıklı oldukları belirlenen 26'sı erkek, 6'sı kadın toplam 32 kişiden oluşturuldu (Şekil 16). Hasta ve kontrol grubu arasında yaş açısından anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,97$) (Tablo 12).



Şekil 13: Akciğer kanser hastalarının patolojik tanılarına göre dağılımı

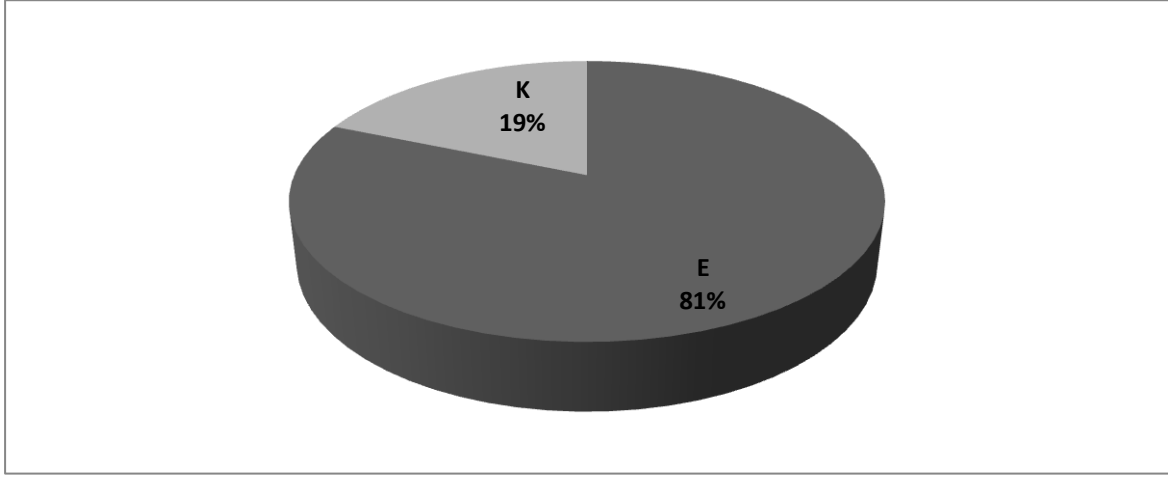


Şekil 14 : Akciğer kanser hastalarının tümör differansiyasyonlarına göre dağılımı



Şekil 15: Akciğer kanser hastalarının cinsiyete göre dağılımı

K: Kadın E:Erkek



Şekil 16 : Kontrol grubunda cinsiyet dağılımı

Tablo 12: Hasta ve kontrol grubu yaş ortalamaları, standart sapmaları, minimum ve maksimum değerleri

	n	Ort ± SS	Minimum	Maksimum
Hasta grubu	34	*65,23 ± 8,79	46	82
Kontrol grubu	32	64,15 ± 7,1	57	77

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p > 0,97$

$p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.2. SERUM VE DOKUDA VEGF, ANJİOPOİETİN-1, ANJİOPOİETİN-2 DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.2.1. VEGF, Anjiopietin-1, Anjiopietin-2 Tekrarlanabilirlikleri (% CV)

Aynı örneğin 10 kez ard arda çalışılması ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışmasında VEGF, anjiopietin-1 ve anjiopietin-2 için gün içi %CV'ler sırasıyla 8.4, 6.9, 7.3 olarak bulundu. Ortalama ve standart sapmaları sırasıyla 267.59 ± 22.55 pg/mL, 34704.45 ± 2418.86 pg/mL, 1441.78 ± 106.47 pg/mL.

4.2.2. Hasta ve Kontrol Gruplarında Serum VEGF, Anjiopietin-1 ve Anjiopietin-2 Düzeylerinin Karşılaştırılması

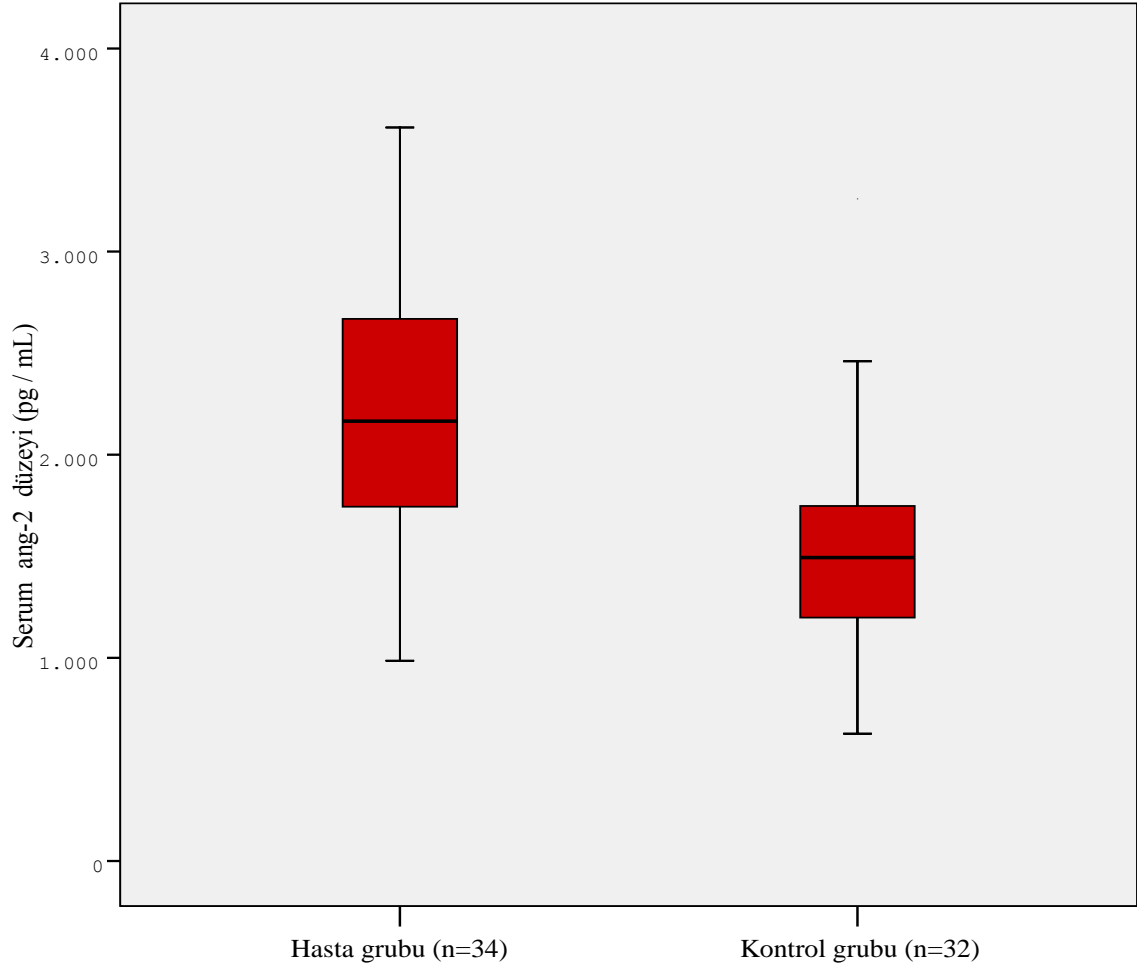
Akciğer kanserli hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında serum VEGF ve Anjiopietin-1 ortalamaları açısından anlamlı bir fark gözlenmezken, serum Anjiopietin-2 ortalaması hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,001$) (Tablo 13) (Grafik 8)

Tablo 13: Hasta ve kontrol gruplarına ait serum VEGF, Anjiopietin-1, Anjiopietin-2 düzeyleri

	Hasta grubu (n=34)	Kontrol grubu (n= 32)	p
Serum VEGF (pg /mL) (Ort \pm SS)	446,92 \pm 225,88	360,51 \pm 136,89	0,11
Serum Anjiopietin-1 (pg/mL) (Ort \pm SS)	54724,23 \pm 13568,39	56397,59 \pm 10719,39	0,57
Serum Anjiopietin-2 (pg/mL) (Ort \pm SS)	2193,685 \pm 675,020*	1546,032 \pm 533,94	< 0,001

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

p< 0,05 ise istatistiksel olarak anlamlıdır.



Grafik 8: Hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki serum anjiopietin-2 düzey farkları kutu grafiği (box- plot)

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0,001$)

* $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.2.3. Tümör Dokusu ve Eşlenik Normal Akciğer Dokusunda VEGF, Anjiopietin-1 ve Anjiopietin-2 Düzeylerinin Karşılaştırılması

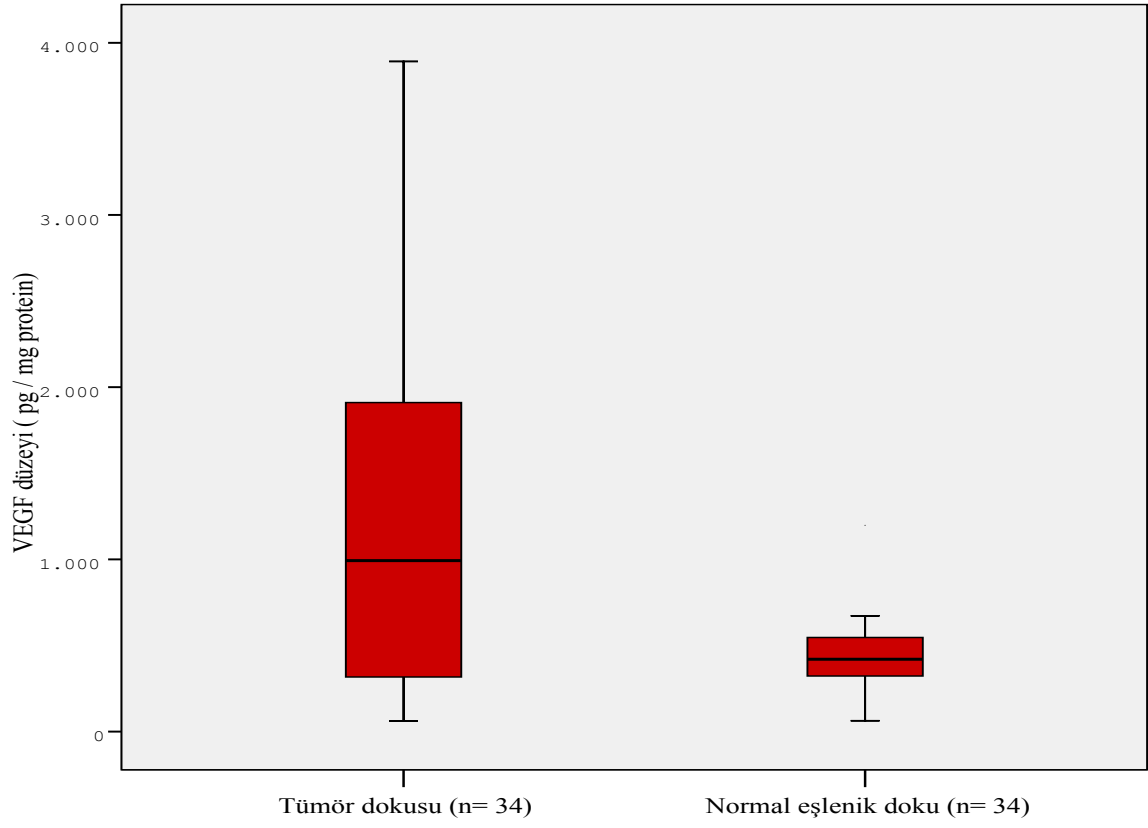
Hastaların tümör ve eşlenik normal akciğer dokularında (n=34), VEGF ortalamaları açısından anlamlı fark saptanmıştır. VEGF düzeyleri tümör dokusunda, eşlenik normal akciğer dokusuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,001$) (Grafik 9). Anjiopietin-1 ve Anjiopietin-2 ortalamaları açısından da, eşlenik normal akciğer dokusu ile tümör dokusu arasında anlamlı fark bulunmaktadır. Normal akciğer dokusunda Anjiopietin-1 ve Anjiopietin-2 düzeyleri tümör dokusundaki düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,001$) (Grafik 9, Grafik 10, Grafik 11) (Tablo 14).

Tablo 14: Tümör dokusu ve normal akciğer dokusundaki VEGF, Anjiopietin-1, Anjiopietin-2 düzeyleri

	Tümör dokusu (n=34)	Eşlenik normal akciğer dokusu (n= 34)	p*
VEGF pg/ mg protein (Ort \pm SS)	1184,28 \pm 1109,38	461,22 \pm 278,21	< 0,001
Anjiopietin-1 pg/ mg protein (Ort \pm SS)	172,21 \pm 53,07	298,4 \pm 162,31	< 0,001
Anjiopietin-2 pg/ mg protein (Ort \pm SS)	521,01 \pm 416,03	2375,94 \pm 1639,65	< 0,001

* $p < 0,001$ Tümör dokusu ile normal eşlenik akciğer dokusu karşılaştırıldığında

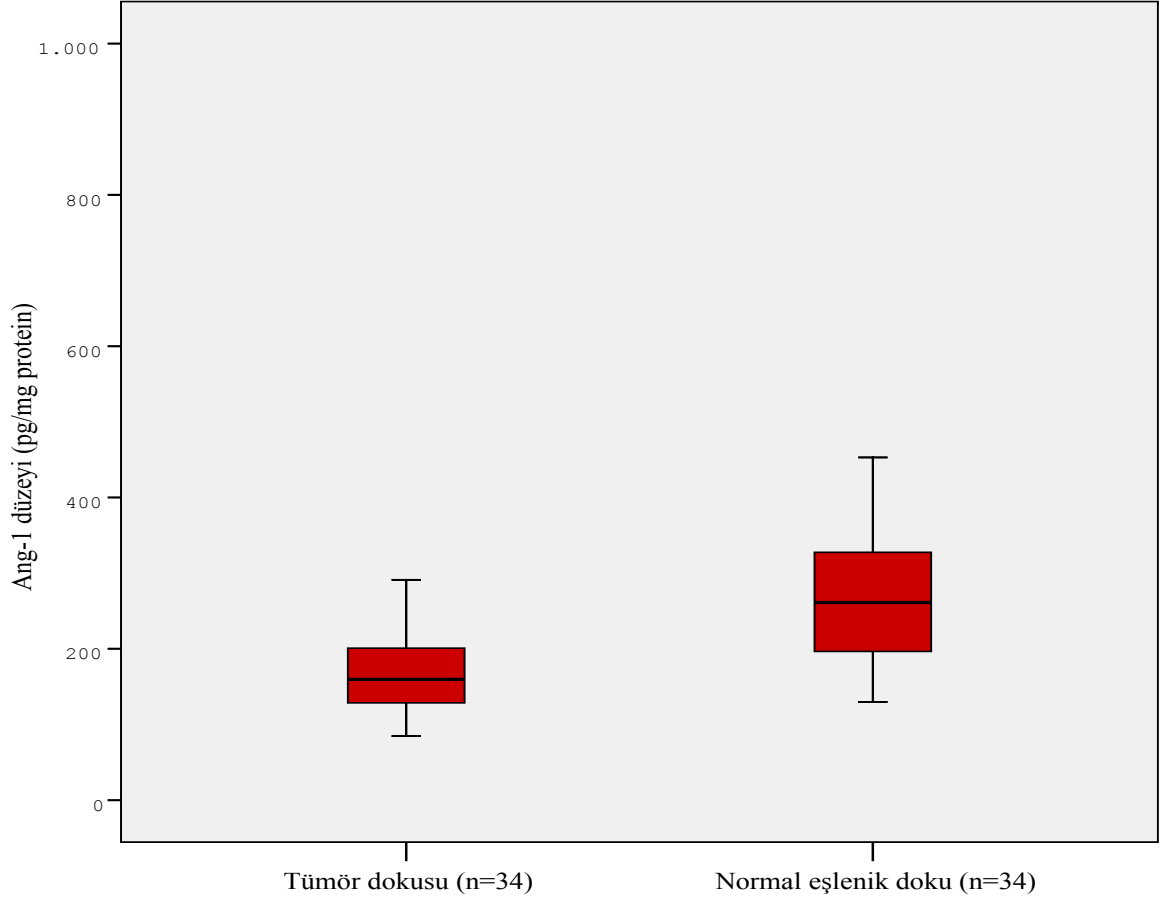
* $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.



Grafik 9: Tümör ve eşlenik normal akciğer dokusunda VEGF düzeyleri kutu grafiği (box-plot)

* Normal eşlenik doku ile karşılaştırıldığında ($p < 0,001$)

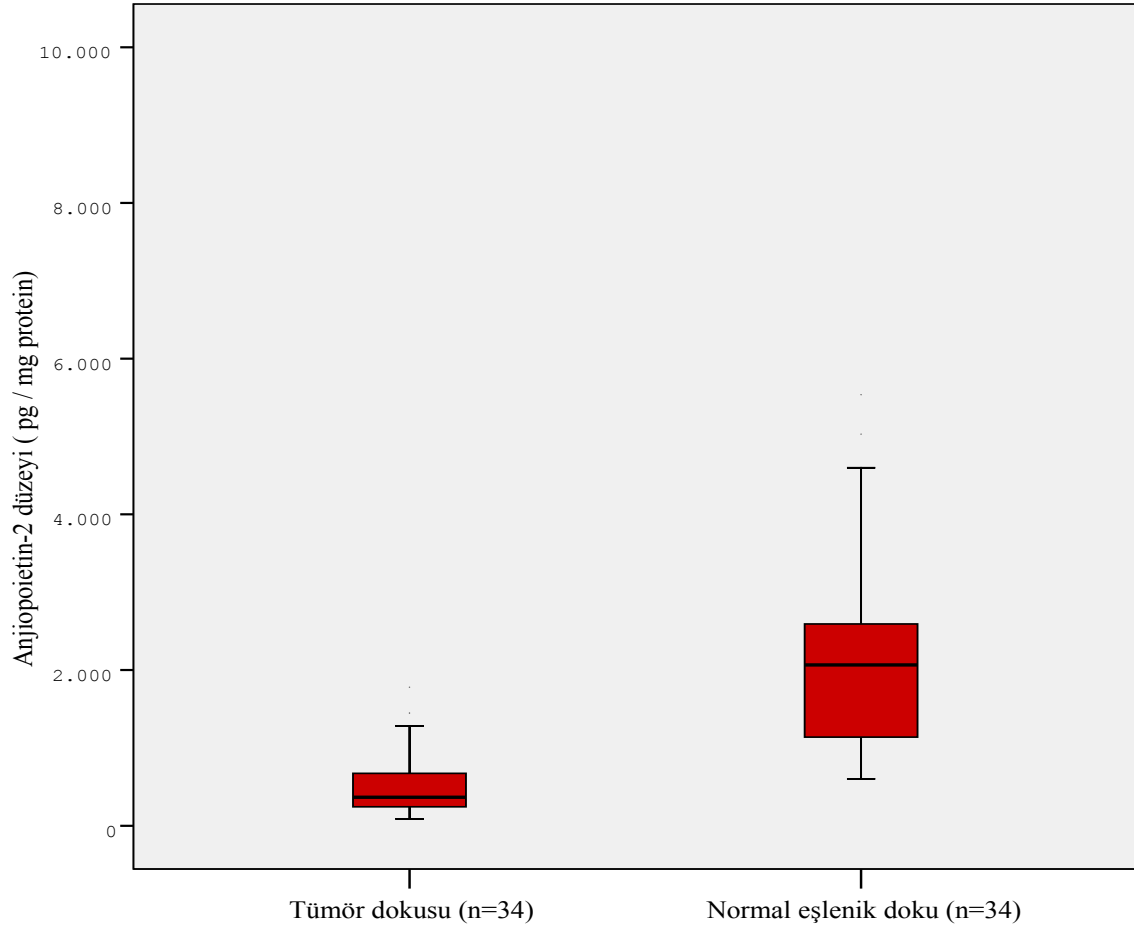
* $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.



Grafik 10 : Tümör dokusu ve eşlenik normal akciğer dokusunda Anjiopietin-1 düzeyleri kutu grafiği (box-plot)

* Tümör dokusu ile karşılaştırıldığında ($p < 0,001$).

* $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.



Grafik 11: Tümör dokusu ve eşlenik normal akciğer dokusunda Anjiopietin-2 düzeyleri kutu grafiği (box-plot)

* Tümör dokusu ile karşılaştırıldığında ($p < 0,001$).

* $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.2.4. Serum VEGF, Anjiopietin-1 ve Anjiopietin-2 Düzeylerinin Akciğer Kanseri Klinikopatolojik Parametrelerine göre karşılaştırılması

Serum VEGF ortanca düzeyleri, T3-T4 grubunda T1-T2 grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0,042$) (Tablo 16).

Tablo 15: Serum VEGF, Anjiopietin-1, Anjiopietin-2 düzeylerinin akciğer kanseri klinikopatolojik parametrelerine göre karşılaştırılması

Parametre	n	Serum VEGF ‡	Serum Anjiopietin-1 ‡	Serum Anjiopietin-2 ‡
Cinsiyet				
Erkek	29	337,22	52700	2185,84
Kadın	5	253,33	47033	2210,84
<i>p</i>		0,296	0,422	0,215
Yaş				
< 65	18	315,67	54783	2219,16
> 65	16	383,88	49700	2165
<i>p</i>		0,679	0,196	0,666
TM Boyutu (cm)				
< 5	18	302,77	50033	2135,83
> 5	16	431,11	53033	2444,16
<i>p</i>		0,067	0,823	0,088
TM Differansiye				
İyi	12	302,77	57283	2269,16
Orta-Az	22	348,33	50033	2144,16
<i>p</i>		0,971	0,249	0,627
Histolojik Tip				
Skvamöz hc. Ca	18	302,77	51700	2269,16
AdenoCa	9	421,11	50700	1969,16
Miks adenoCa	5	253,33	61700	2369
Küçük hc. Ca	2	611,11	46700	2144
<i>p</i>		0,596	0,773	0,911
T (Tümör Evre)				
T1-T2	20	296,66	50200	2177,5
T3-T4	14	423,88	61990	2165

<i>p</i>		0,042	0,137	0,861
N (Lenf Nodu)				
N0	24	335,55	50533	2165
N1	7	423	63283	2160
N2	3	267	59866	2106,7
<i>p</i>		0,165	0,291	0,918
Perinöral İnvazyonu				
Var	9	426	61700	2360
Yok	25	305	51200	2144
<i>p</i>		0,401	0,711	0,380
Arter İnvazyonu				
Var	14	327	58366	2077,5
Yok	20	335	50950	2177
<i>p</i>		0,753	0,302	0,986
Lenf İnvazyonu				
Var	7	281,11	48700	2144,16
Yok	27	346,66	52200	2185
<i>p</i>		0,360	0,798	0,966
Ven İnvazyonu				
Var	9	350	48700	2144,16
Yok	25	324,44	53366	2210,83
<i>p</i>		0,984	0,470	0,725

‡ Değerler median olarak ifade edilmiştir (pg / mL).

* $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

İki bağımsız grup karşılaştırılmasında Mann - Whitney U testi, ikiden fazla grup karşılaştırılmasında Kruskall - Wallis testi kullanılmıştır.

4.2.5. Tümör Dokusu VEGF, Anjiopietin-1 ve Anjiopietin-2 Düzeylerinin Akciğer Kanseri Klinikopatolojik Parametrelerine göre karşılaştırılması

Tümör doku ang-1 düzeyi 65 yaş üstü grupta, 65 yaş altı gruba göre ve orta-az differansiye tümörlerde iyi differansiye tümörlere göre anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,038$ $p=0,044$) (Tablo 15). Karşılaştırılan diğer parametreler arasında anlamlı fark bulunamadı.

Tablo 16: Tümör dokusu VEGF, Anjiopietin-1 ve Anjiopietin-2 düzeylerinin akciğer kanseri klinikopatolojik parametrelerine göre karşılaştırılması

Parametre	n	Tümör Doku VEGF †	Tümör Doku Anjiopietin-1 †	Tümör Doku Anjiopietin-2 †
Cinsiyet				
Erkek	29	1042,82	156,68	372,91
Kadın	5	407,63	172,93	245,02
<i>p</i>		0,204	0,610	0,274
Yaş				
< 65	18	429,68	149,45	347,39
> 65	16	1428,58	183,13	393,96
<i>p</i>		0,063	0,038 *	0,388
TM Boyutu (cm)				
< 5	18	996,68	155,03	318,20
> 5	16	988,63	164,37	418,36
<i>p</i>		0,955	0,352	0,469
TM Differansiye				
İyi	12	695,78	133,34	299,10
Orta-Az	22	1023,60	175,28	393,96
<i>p</i>		0,640	0,044*	0,207
Histolojik Tip				
Skuamöz hc. Ca	18	736,16	148,68	287,84
AdenoCa	9	1071,90	156,68	372,91
Miks adenoCa	5	923,18	168,55	767,83
Küçük hc. Ca	2	---	244,23	1150,41
<i>p</i>		0,609	0,283	0,07

T (Tümör Evre)				
T1-T2	20	483,69	153,62	312,88
T3-T4	14	1198,59	164,37	393,96
<i>p</i>		0,242	0,972	0,576
N (Lenf Nodu)				
N0	24	983,00	164,80	318,20
N1	7	1331,36	145,77	393,96
N2	3	728,50	147,36	441,23
<i>p</i>		0,752	0,438	0,867
Perinöral İnvazyonu				
Var	9	1612,20	162,58	372,91
Yok	25	483,69	156,68	331,98
<i>p</i>		0,232	0,682	0,953
Arter İnvazyonu				
Var	14	955,90	170,74	397,31
Yok	20	1019,75	149,45	347,39
<i>p</i>		0,820	0,263	0,441
Lenf İnvazyonu				
Var	7	695,78	166,15	519,66
Yok	27	1061,21	156,68	331,98
<i>p</i>		0,247	0,915	0,482
Ven İnvazyonu				
Var	9	476,04	185,33	519,66
Yok	25	1061,21	150,56	362,79
<i>p</i>		0,223	0,069	0,598

†Değerler median olarak ifade edilmiştir (pg / mg protein).

* $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır

İki bağımsız grup karşılaştırılmasında Mann - Whitney U testi, ikiden fazla grup karşılaştırılmasında Kruskal - Wallis testi kullanılmıştır.

4.3. KORELASYON ANALİZLERİ

Serum ve doku VEGF, anjiopöietin-1, anjiopöietin-2 arasındaki korelasyona bakıldığında akciğer kanserli hastaların serumlarında VEGF ve anjiopöietin-1 düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulundu ($r= 0,446$ $p= 0,000$). Tümör dokusunda VEGF, anjiopöietin-1 ve anjiopöietin-2 düzeyleri arasında ve tümör dokusu ile serum parametreleri incelendiğinde anlamlı bir korelasyon bulunamadı, ancak normal eşlenik doku ile serum parametrelerine incelendiğinde, serum VEGF ile anjiopöietin-2 arasında negatif yönde anlamlı korelasyon izlenirken ($r =-0,400$ $p= 0,019$) serum anjiopöietin-2 ile normal doku anjiopöietin-2 arasında da pozitif yönde anlamlı korelasyon belirlendi ($r= 0,397$ $p= 0,020$).

Tablo 17: Akciğer kanserinde serum ve dokuda incelenen parametreler arası korelasyon analizleri

	Serum VEGF	Serum ang-1	Serum ang-2	Tümör VEGF	Tümör ang-1	Tümör ang-2	Normal doku VEGF	Normal doku ang-1	Normal doku ang-2
Serum VEGF		r= 0,446 p= 0,000*	r=0,208 p= 0,094	r = 0,268 p = 0,138	r = -0,138 p = 0,438	r = 0,117 p =0,508	r = 0,029 p = 0,875	r = - 0,103 p = 0,560	r = -0,400 p = 0,019*
Serum ang-1			r = 0,053 p = 0,674	r = 0,320 p = 0,074	r = 0,093 p = 0,986	r = 0,063 p = 0,723	r = 0,011 p = 0,954	r = 0,036 p = 0,841	r = - 0,207 p = 0,241
Serum ang-2				r = 0,254 p = 0,161	r = - 0,185 p = 0,296	r = 0,139 p = 0,432	r = - 0,276 p = 0,126	r = -0,229 p = 0,193	r = 0,397 p = 0,020*
Tümör VEGF					r = 0,185 p = 0,311	r = 0,530 p = 0,112	r = - 0,254 p = 0,160	r = - 0,339 p = 0,058	r = 0,172 p = 0,346
Tümör ang-1						r = 0,299 p = 0,087	r = 0,237 p = 0,192	r = 0,108 p = 0,544	r = - 0,036 p = 0,839
Tümör ang-2							r = 0,056 p = 0,762	r = 0,119 p = 0,503	r = 0,050 p = 0,780
Normal doku VEGF								r = 0,607 p = 0,053	r = 0,320 p = 0,074
Normal doku ang-1									r = 0,335 p = 0,053
Normal doku ang-2									

*p < 0.05 ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri dünyada kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden birisidir (52). Hastaların geç tanı alması ve hastalığın yüksek oranda tekrarlaması nedeni ile toplam sağ kalım oranı yaklaşık %10'dur (53). Dünyada kanser olgularının % 12,8'i ve kanser nedenli ölümlerin %17,8' inden akciğer kanseri sorumludur (11).

Diğer malign solit tümörlerde olduğu gibi akciğer kanserlerinde de, tümörün primer odakta ve metastaz yaptığı uzak organlarda büyüebilmesi için oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılayacak yeni damar oluşumuna ihtiyacı vardır (54). Anjiogenez yeni kapiller damar gelişimi olup hücreler ile çözünür faktörler ve ekstraselüler matriks bileşenleri arasındaki etkileşim sonucu endotelial hücrelerin differansiyasyonu, migrasyonu ve proliferasyonu ile seyreden karmaşık bir süreçtir (3). Bir tümörün anjiyogenik aktivasyonunun anjiyogenezin pozitif ve negatif düzenleyicileri arasındaki net dengenin sonucu olduğu yaygın olarak kabul görmektedir (55, 56). Yapılan çalışmalarla tümör anjiyogenezini düzenleyen çok sayıda büyüme faktörü tanımlanmıştır. Tümör anjiyogenezinde kritik rolü olan en önemli anjiyogenik faktör VEGF proteindir (57, 58). Anjiogenezin düzenlenmesindeki önemli rolü nedeniyle, ilk antianjiogenik ajanlar VEGF ve VEGFR aile üyelerine karşı geliştirilmiştir. Bazı olgularda anti-VEGF-VEGFR tedavisine karşı direnç gelişmesi yeni tedavi modelleri arayışına neden olmuştur. Anjiopietin-1, Anjiopietin-2, Tie-1 ve Tie-2, VEGF tarafından ilk damar pleksusunun oluşumundan sonraki gelişim sırasında damar yeniden şekillenmesi ve olgunlaşması için gereklidir (9). Ang-1 Tie-2 reseptör agonisti gibi davranır, oysaki Ang-2 antagonisttir (42). Ang-2 düzeyinin artışı hem in vivo hem de in vitro Ang-1/Tie-2 sinyalizasyonu inhibe edebilir, ancak bazı çalışmalarda Ang-2 nin etkilerinin doz ve durum bağımlı olduğu belirtilmiştir (46). Antianjiogenik ve antilenfanjiogenik tedavi için VEGF-VEGFR yanı sıra yeni potansiyel hedef olarak anjiopietin büyüme faktörleri ve TIE reseptörleri belirlenmiş ve bu yönde araştırmalar sürmektedir (9). Ancak son 50 yılda akciğer kanser insidansının % 249, mortalitenin % 259 oranında artmış olması akciğer kanserinde anjiogenik-antianjiogenik faktörler ile ilgili aydınlatılması gereken birçok noktanın bulunduğunu ortaya koymaktadır (59).

Yapılan kaynak araştırmasında, akciğer kanserinde anjiogenezde rol oynayan faktörlerle ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte, akciğer kanser hastalarının serumlarında anjiogenik ve antianjiogenik faktörleri birlikte inceleyen sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır (60-64).

Akciğer tümör dokusunda yapılan çalışmalarda ise semikantitatif immunohistokimya yöntemi kullanılarak VEGF, ang-1, ang-2 ekspresyonları değerlendirilmiş ya da RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) ile mRNA ekspresyonları analiz edilmiştir.(49, 60, 65-68). Bu faktörleri serumda ve tümör-eşlenik normal dokularında birlikte ve kantitatif olarak değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu düşüncelerin ışığı altında bir çalışma planlayarak, akciğer kanser hastalarının ve kontrol grubunun serumlarında; tümörlü ve normal eşlenik doku süpernatantlarında VEGF, anjiopietin-1 ve anjiopietin-2 düzeylerini birlikte, kantitatif olarak belirlemek istedik ayrıca sonuçlarımızın klinikopatolojik parametreler ile ilişkilerini inceledik.

Serum sonuçları açısından çalışmamızı değerlendirdiğimizde; Akciğer kanserli hasta grubunda anjiopietin-2 ortalamaları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,001$). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, VEGF ortalamaları da hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre yüksekti. Anjiopietin-1 ortalamaları açısından ise iki grup arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Bu sonuçlar özellikle anjiopietin-2 ve VEGF in akciğer kanseri ile ilişkisini ve seruma yansımalarını ortaya koymaktadır. Anjiopietin-2, reseptörüne bağlanarak damarlarda destabilizasyona neden olur. Diğer taraftan VEGF ile anjiogenezin uyarıldığı damarlarda anjiopietin-2'nin eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu da VEGF etkisinin olduğu damarlarda anjiopietin-2 düzeylerinin de arttığını göstermiştir. Bizim sonuçlarımız da bu bilgileri destekler niteliktedir (69).

Akciğer kanserinde serum VEGF düzeylerini inceleyen üç farklı çalışmanın sonuçları bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Çalışmamızda serum VEGF ortalamaları hasta grubunda ($446,92 \pm 225,88$ pg/mL), kontrol grubuna göre ($360,51 \pm 136,89$ pg/mL) yüksek fakat anlamlı değildir. Takigawa ve ark. (61), İlhan ve ark (70), Laack ve ark. (63), akciğer kanser hastası serumlarında VEGF ortalamalarını (sırasıyla 843 ± 699 , $449,48 \pm 175,54$, 633 pg/mL) sağlıklı kontrol grubuna göre (sırasıyla 264 ± 129 , $77,06 \pm 47,26$, 220 pg/mL) anlamlı yüksek olarak saptamışlardır. Çalışmamızdaki hasta serum VEGF düzeyleri İlhan ve ark. çalışma sonuçları ile çok benzerken, Takigawa ve Laack'in çalışmalarında VEGF düzeyleri bizim ölçüm değerlerimize göre daha yüksek düzeylerde bulunmuştur. Bizim çalışma grubumuz erken evre olgulardan oluşup, bu çalışmalardaki hastalar daha ileri evreye sahip olabilir; bu da bu düzey farklılıklarına yol açıyor olabilir. Yukarıda belirttiğimiz

çalışmalarda kontrol grubu serum VEGF düzeyleri bizim kontrol grubunun değerlerine göre daha düşüktür. Çalışmamızdaki kontrol grubunun yaş ortalaması daha büyük olup, aralarında bizim belirleyemediğimiz başka nedenlerle anjiogenezin uyarılmış olduğu kişiler bulunabilir, bu da bizim ortalamamızı yükseltmiş olabilir.

Park ve ark. (60)'nın 101 KHDAK hastasının serumlarında VEGF, anjiopietin-1, anjiopietin-2 düzeylerinin ölçüldüğü çalışmalarında, anjiopietin-1 ortalaması (32100 ± 9900 pg/mL) sağlıklı kontrol grubuna göre ($39,000 \pm 10800$ pg/ mL) anlamlı düşük iken, anjiopietin-2 ($1949,2 \pm 1099,4$ pg/mL) ve VEGF ortalamaları ($565,1 \pm 406,3$ pg/mL) sağlıklı kontrol grubuna göre (anjiopietin -2; $1498,6 \pm 650$ pg/mL, VEGF; $404,6 \pm 254,8$ pg/ mL) anlamlı yüksek bulunmuştur. Bir diğer çalışmalarında Park ve ark (62), 136 akciğer kanser hastasında serum anjiopietin-2 ($2,046 \pm 1,171$ pg/mL) ve serum VEGF düzeylerini ($542,9 \pm 445,8$ pg/ mL) kontrol grubu değerlerine göre (sırasıyla $1,269 \pm 494,1$ pg/ mL ve $364,7 \pm 185,9$ pg/mL) anlamlı yüksek bulmuşlardır. İki çalışmanın sonuçları VEGF ve anjiopietin-2 açısından bizim bulgularımızla paralellik gösterirken, anjiopietin- 1 değerleri açısından bizim çalışmamızdan farklıdır. Bu sonuçlar, kanserde anjiopietin-1'in rolünün anjiopietin-2'ye göre daha tartışmalı olduğunu bildiren görüşlerle örtüşmektedir (60).

Çalışmamızda hastaların cinsiyet, yaş, tümör differansiyasyonu, histolojik tip, N (lenf nodu), tümör invazyonunu (perinöral, arterial, venöz ve lenfatik) içeren klinikopatolojik ölçütlere göre oluşturulan alt gruplarının serum VEGF, anjiopietin-1 ve anjiopietin-2 değerleri açısından yapılan karşılaştırmalarında; serum VEGF ortancaları T3-T4 hasta grubunda T1-T2 grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p < 0,042$). Bu sonuç VEGF'in tümör boyutu ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır ve VEGF'in anjiogenez aracılı tümör büyümesi ile ilişkili en potent faktör olduğunu destekler yöndedir. Bu bulgu dışında klinikopatolojik parametreler ile herhangi bir ilişkinin olmaması olasılıkla alt grupların sayılarının yeterli olmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Literatürde akciğer kanserinde incelediğimiz parametrelerin klinikopatolojik parametreler ile ilişkisini değerlendiren sınırlı sayıdaki çalışmada çelişkili sonuçlar ortaya konmaktadır. Bulgularımızla benzer olarak, Laack ve ark. (63), tümör boyutu ile serum VEGF düzeyi arasında pozitif korelasyon olduğunu, fakat serum VEGF düzeylerinin farklı histolojik tip, yaş, cinsiyete göre anlamlı bir fark göstermediğini saptamışlardır. İlhan ve ark. (70), Takigawa ve ark. (61) serum VEGF düzeyleri ile evre, histolojik tip, cinsiyet, yaş arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulamamışlardır. Matsuyama ve ark. (71) serum VEGF düzeylerinin

skuamöz ($353,7 \pm 196,6$ pg /mL) ve adenokarsinom ($480,4 \pm 388,6$ pg/mL) arasında anlamlı fark olmadığını bildirmişler. Bu sonuçlar bizim sonuçlarımız ile uyumludur.

Park ve ark. (62) da KHDAK hastalarında serum VEGF ve anjiopietin-2 düzeylerinin histolojik tipe, nodal tutulumu ve tümör boyutuna göre anlamlı bir fark göstermediğini bildirmişlerdir. Ancak, ileri evrelerde serum anjiopietin-2 düzeylerinin arttığını ve uzak metastazı olan hastalarda metastazı olmayanlara göre daha yüksek düzeyde bulunduğunu, diğer yandan ileri evrelerde serum VEGF düzeyinde artış olmadığını sadece uzak metastazlı vakalarda yükselme eğilimi gösterdiğini saptamışlardır. Bu çalışmada serum anjiopietin-2 düzeylerinin KHDAK'de uzak metastazlı vakaları tespit için yararlı klinik markır olabileceği vurgulanmaktadır. Bizim olgularımızda saptanan metastazlar bulunmadığı için bu ilişkiyi incelemek mümkün olmamıştır.

Bu çalışma sonuçlarından farklı olarak, Shimanuki ve ark. (64), 63 KHDAK hastanında serum VEGF düzeylerinin cinsiyet, yaş, T faktörü, N faktörü açısından anlamlı bir fark göstermediğini bildirmişler. Serum VEGF düzeylerinin, skuamöz hücreli karsinomlarda (643 ± 138 pg/mL) adenokarsinoma (382 ± 74 pg/mL) göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu saptamışlar. İntratümöral VEGF ekspresyonu ile mikrodamar dansitesi arasında pozitif ilişki belirtilmiş olup buna karşı serum VEGF konsantrasyonu ile intratümöral VEGF ekspresyonu arasında korelasyon olmadığını vurgulamışlardır.

Çalışmamızda serumda ölçülen parametrelerin birbirleri ile ilişkileri incelendiğinde sadece serum VEGF ve anjiopietin-1 arasında pozitif yönde orta derecede anlamlı korelasyon ($r=0,446$ $p=0,000$) saptandı. VEGF ve anjiopietin-1'in her ikisinin de anjiogenik faktör oluşu bu korelasyonu desteklemektedir. Park ve ark. (72), da bizim bulgularımızla benzer yönde serum anjiopietin-1 ve anjiopietin-2'nin her birinin VEGF ile korele olduğunu; anjiopietin-1 ve anjiopietin-2 arasında ise korelasyon bulamadıklarını bildirmişlerdir. Biz çalışmamızda farklı olarak anjiopietin-2 ile VEGF arasında pozitif yönde anlamlı olmayan korelasyon saptadık ($r=0,208$ $p=0,094$). Park ve ark. (62), da çalışmalarında serum VEGF ile anjiopietin-2 düzeyleri arasında korelasyon bulunduğunu bildirmişlerdir .

Doku sonuçları açısından çalışmamızı değerlendirdiğimizde; Hastaların tümör dokusunda eşlenik normal akciğer dokusuna göre VEGF ortalamaları anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,001$). Tümörlerin büyümesi ve metastaz yapabilmesi için anjiogenez ile yeni damar gelişiminin uyarılması gereklidir (35). Tümörlerin gelişiminde malign hücrelerin kendilerine yakın damarlara olan mesafelerine göre oksijen yoksunluğu artar. Hipoksi VEGF

mRNA'nın transkripsiyon hızını arttırarak bu hücrelerde VEGF üretimini uyarır (30). Bulgularımız literatürdeki bilgileri destekler niteliktedir.

Anjiogenez sürecinde anjiopietin-1, reseptörü TIE-2'ye bağlanır ve endotel hücreleri ile çevresindeki ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimi uyararak damarları stabilize eder, anjiopietin-2 ise yarışmalı olarak TIE-2'ye bağlanır ve anjiopietin-1'in stabilize edici etkisini antagonize ederek damarlarda destabilizasyona yol açar (49). Bu çalışmada da antianjiogenik etkisi bilinen anjiopietin-2 düzeylerinin tümör dokusunda normal dokuya göre daha düşük düzeylerde bulunması, tümör dokusundaki antianjiogenik etkinin zayıfladığını ortaya koymaktadır. Diğer yandan anjiogenik etkili anjiopietin-1 düzeylerinin de tümör dokusunda normal akciğer dokusundaki düzeylerine göre anlamlı olarak düşük ($p < 0,001$) bulunması, operasyon sırasında normal dokunun tümörlü dokudan makroskobik olarak en az 5 cm uzağından alınmasına karşın, tümör dokusuna yakın normal dokuda da anjiogenezin başladığının bir göstergesi olabilir.

Literatürde kantitatif olarak VEGF, anjiopietin-1 ve anjiopietin-2 protein düzeylerini birlikte inceleyen bir doku çalışması bulunmamaktadır; dokuda yapılan çalışmalarda immunohistokimya ile semikantitatif olarak protein ya da RT-PCR ile mRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

Çalışmamızdaki doku anjiopietin-1 sonuçlarına paralel yönde, Park ve ark. (60) KHDAK'nın tümör dokusunda immunohistokimya ile, anjiopietin-1 ekspresyonunun düşük düzeyde ve heterojen olduğunu saptamışlar ve anjiopietin-1 ekspresyonunun tümör dokusundaki yeni damar oluşumu ile ters yönde bir ilişkisi olduğunu bildirmişlerdir. Yazarlar birçok kanser tipinde tümör dokusunda anjiopietin-1'in artmış ekspresyonunun gösterildiğini ancak akciğer kanserinin de dahil olduğu bazı kanser tiplerinde tümör dokusundaki immunohistokimyasal boyamada artmış mikrovasküler bölgelerde düşük anjiopietin-1 ekspresyonunun izlendiği ve anjiopietin-1 ekspresyon paterninin değişken olup klinik öneminin tartışmalı bir konu olduğunu vurgulamışlardır. Benzer şekilde Tait ve ark. (66) da akciğer kanser hastalarında tümör ve normal dokuda RT-PCR tekniği ile anjiopietin-1 ve TIE-2 reseptör mRNA düzeylerini incelemiş ve normal akciğer dokusunda mRNA düzeylerini yükseldiği gözlenirken bu düzeylerin tümör dokusunda azaldığı belirlenmiş. Wong ve ark. (68), 28 KHDAK hastasında tümör ve normal akciğer dokusunda RT-PCR ile VEGF, anjiopietin-1, anjiopietin-2 ekspresyonlarını değerlendirmişlerdir. Çalışmamız sonuçlarına

benzer şekilde, anjiopietin-1 ekspresyonunu normal akciğer dokusunda, VEGF ise tümör dokusunda yüksek düzeyde bulmuşlardır. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak anjiopietin-2 ekspresyon düzeyi açısından normal ve tümör dokusu arasında anlamlı fark olmadığını bildirmişlerdir. Anjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin ekspresyonlarındaki çelişkili sonuçların laboratuvar yöntemleri ve çalışma popülasyonları arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabileceği belirtilmektedir (60).

Çalışmamızda hastaların cinsiyet, yaş, tümör differansiyasyonu, histolojik tip, T (Tümör), N (lenf nodu), tümör invazyonunu (perinöral, arterial, venöz ve lenfatik) içeren klinikopatolojik ölçütlere göre oluşturulan alt gruplarının doku VEGF, anjiopietin-1 ve anjiopietin-2 değerleri açısından yapılan karşılaştırmalarında elde ettiğimiz önemli bir bulgu tümör doku anjiopietin-1 ortancalarının orta-az differansiye tümörlerde iyi differansiye tümörlere göre anlamlı yüksek bulunması idi ($p= 0,044$). Anjiopietin-1 anjiogenik etkisi nedeni ile tümör gelişmesi ve büyümesi açısından etkili bir faktördür. Daha agresif büyüyen orta-az differansiye tümörlerde daha yüksek düzeyde görülmeside bu etkisi ile örtüşmektedir. Ayrıca çalışmamızda tümör anjiopietin-1 düzeyi 65 yaş üstü grupta, 65 yaş altı gruba göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0,038$). Anlamlı olmamakla birlikte tümör doku VEGF ortancaları az diferansiye tümörlerde iyi diferansiye olanlara göre ve adenokarsinomda skuamöz hücreli karsinoma göre yüksek düzeylerde saptadık. Tümör dokusunda incelediğimiz parametrelerin diğer klinikopatolojik parametrelerle ile karşılaştırılmasında (cinsiyet, T faktörü, N faktörü, damar ve lenf invazyonu) alt gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı bu sonuç olasılıkla alt grupların sayılarının yeterli olmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Literatürde VEGF, anjiopietin-1, anjiopietin-2'nin klinikopatolojik parametreler ile ilişkisini toplu olarak araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalarda bu parametreler tek tek ya da ikili olarak incelenmiş sonuçlar tek bir çalışma dışında semikantitatif olarak verilmiştir.

Iwasaki ve ark. (73), 71 KHDAK hastasında yaptıkları retrospektif çalışmalarında, sadece adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinoma olgularını çalışmaya almışlar, frozen tümör dokularını homojenize edip ELISA ile supernatanlarından VEGF düzeylerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada VEGF düzeyleri ile yaş, cinsiyet, T faktörü, N faktörü, evre ile aralarında anlamlı ilişki bulamamışlar, sadece adeno karsinomda ($26,8 \pm 34$

ng/100 mg protein) skuamöz hücreli karsinoma ($12,2 \pm 13,8$ ng /100 mg protein) göre anlamlı yüksek doku VEGF düzeyleri saptamışlardır. Bu durumun adeno karsinomların mikrodamarlar ile kolayca metastaz yaparken skuamöz hücreli karsinomların lokal olarak genişlemesi ile açıklanabileceği vurgulanmıştır. Bu çalışmayla benzer şekilde bizim çalışmamızda da anlamlı olmamakla birlikte adenokarsinomda (1071,90 pg/mg protein) skuamöz hücreli karsinoma (736,16 pg/mg protein) göre VEGF düzeyleri yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda histolojik alt gruplarda sayıların göreceli düşüklüğü (adeno karsinom n=9, skuamöz hücreli karsinom n=18) nedeniyle sonuçlar anlamlı çıkmamış olabilir. Bizim çalışmamız sonuçlarını destekleyen, 108 KHDAK hastasında yapılan bir başka çalışmada VEGF ekspresyonu değerlendirilmiş, adenokarsinomda ekspresyonun diğer histolojik tiplere göre anlamlı yüksek olduğu tespit edilmiş ancak yaş, cinsiyet, differansiyasyon, damar invazyonu ile anlamlı ilişki bulunamadığı bildirilmiştir (65).

Stefanou ve ark. (67) 88 KHDAK ve 39 KHAK hastasında yaptıkları çalışmalarında immunohistokimya ile belirledikleri doku VEGF ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, histolojik tip ve damar invazyonu arasında anlamlı korelasyon bulunmadığını belirtmişlerdir. Buna karşın, VEGF ekspresyonu az differansiye tümörlerde, iyi differansiye tümörlere göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). Bizim çalışmamızda da orta-az differansiye tümörlerde VEGF düzeyleri (1023,60 pg/mL) iyi differansiye tümörlerdeki düzeylerinden (695,78pg/ml) yüksek fakat anlamlı değildi. Sonuçlarımız bu çalışmanın sonuçları ile uyumludur.

236 KHDAK hastanın, tümör doku anjiopietin-1 ve anjiopietin-2 ekspresyonlarını IHC ile araştıran bir diğer çalışmada araştırmacılar 101 hastada (% 42,9) pozitif anjiopietin-1 ekspresyonu ve 40 hastada (% 16,9) pozitif anjiopietin-2 ekspresyonu saptamışlardır. Anjiopietin-1 ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, histolojik tip, differansiyasyon arasında anlamlı korelasyon bulamazken, anjiopietin-2 yukarıda belirtilen parametreler ile korelasyon göstermezken farklı olarak iyi differansiye tümörlerde anlamlı düşük ekspresyon düzeylerini göstermişlerdir (49). Bizim çalışmamızda bu çalışmalardan farklı olarak tümör doku supernatan anjiopietin-1 ortancaları >65 yaş grubunda, <65 yaş grubuna göre anlamlı yüksek olup ($p = 0,038$) ve orta-az differansiye tümörlerde, iyi differansiye olanlara göre anlamlı yüksek bulundu ($p = 0,044$).

Çalışmamızın en önemli bulgularından birisi normal doku anjiopietin-2 ile serum anjiopietin-2 ortalamaları arasında saptanan pozitif yöndeki anlamlı korelasyondur ($r = 0,397$;

p= 0,020). Ang-2 düzeyinin artışı hem in vivo hem de in vitro Ang-1/Tie-2 sinyalizasyonunu inhibe eder (46). Ang-2 yarışmalı olarak TIE-2'ye bağlanır ve ang-1'in stabilize edici etkisini antagonize ederek damarlarda destabilizasyona yol açar (49). Çalışmamızda anjiopietin-2 düzeyleri normal akciğer dokusunda tümör dokusuna göre anlamlı yüksek olup serum düzeylerine yansımıştır. Tümör dokusunda antianjiogenik faktörlerin normal dokuya göre daha düşük olması ve sonuç olarak antianjiogenik faktörlerin yeterli etki gösterememesi nedeni ile tümör dokusu gelişmekte ve büyümektedir.

Literatürde akciğer kanserinde tümör ve eşlenik normal dokuda ang-2 düzeylerini bir arada kantitatif olarak belirleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yönüyle çalışmamız literatürdeki ilk çalışmadır.

Sonuç olarak bulgularımızın, akciğer kanserinde anjiopietik ve antianjiopietik faktörler, özellikle ang-2 açısından araştırarak daha sonraki çalışmalar için temel oluşturacağı düşüncesindeyiz. Normal akciğer dokusunda artmış anjiopietin-2 düzeylerinin seruma yansımalarının hastaların izlenmesi ve değerlendirilmesi açısından, ayrıca tedavi stratejilerinin belirlenmesinde ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

6. ÖNERİLER

Çalışmamıza dahil edilen hasta sayısı toplamda yeterli olsa da histolojik alt tiplerin sayısı arttırılarak çalışma sonuçları güçlendirilebilir. Doku çalışmalarında sıklıkla kullanılan İHK değerlendirme kriterlerinin standardize edilememiş olması ve değerlendirmedeki subjektiviteden kaynaklanabilecek sonuçlar tam olarak doğruyu yansıtmıyabilir. Bu nedenle doku ekspresyonları ile serum düzeyleri arasında ilişki tam olarak değerlendirilemiyebilir. Oysaki bizim çalışmamızda olduğu gibi sonuçların kantitatif olarak elde edildiği çalışmalarda bu kısıtlılıklar en aza indirgenebilir.

7. KAYNAKLAR ve EKLER

7.1. KAYNAKLAR

1. MacKinnon AC, Kopatz J, Sethi T. The molecular and cellular biology of lung cancer: identifying novel therapeutic strategies. *Br Med Bull* 2010;95:47-61.
2. Dong J, Kislinger T, Jurisica I, Wigle DA. Lung cancer: developmental networks gone awry? *Cancer Biol Ther* 2009;8:312-8.
3. Nie D, Tang K, Diglio C, Honn KV. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. *Blood* 2000;95:2304-11.
4. Cox G, Jones JL, Walker RA, Steward WP, ark. Angiogenesis and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2000;27:81-100.
5. Bono P, Teerenhovi L, Joensuu H. Elevated serum endostatin is associated with poor outcome in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 2003;97:2767-75.
6. Yilmaz A, Ernam D, Unsal E, Demirag F, ark. Vascular endothelial growth factor immunostaining correlates with postoperative relapse and survival in non-small cell lung cancer. *Arch Med Res* 2007;38:764-8.
7. Naumnik W, Chyczewska E, Ossolinska M. Serum levels of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and their receptor tie-2 in patients with nonsmall cell lung cancer during chemotherapy. *Cancer Invest* 2009;27:741-6.
8. Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, Wirkkala R, ark. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol* 2008;10:527-37.
9. Saharinen P, Eklund L, Pulkki K, Bono P, ark. VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. *Trends Mol Med* 2011;17:347-62.
10. Kumar V. Robbins Basic Pathology, 2008:528-34pp.
11. Akciğer Kanserlerinde Epidemiyoloji. *Toraks Dergisi* 2006;<http://www.toraks.org.tr/journal/pdf/pdf-Toraksder-494.pdf>:2.
12. Bunn PA, Jr. Molecular biology and early diagnosis in lung cancer. *Lung Cancer* 2002;38:S5-8.
13. Sauter W, Rosenberger A, Beckmann L, Kropp S, ark. Matrix metalloproteinase 1 (MMP1) is associated with early-onset lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:1127-35.
14. Amos CI, Xu W, Spitz MR. Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? *Recent Results Cancer Res* 1999;151:3-12.
15. Spiro SG, Porter JC. Lung cancer--where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1166-96.
16. Mutlu N. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Olgularında İmmunohistokimyasal Boyama ile Kemik İliğinde ve Mediastinoskopi ile N0 Olan Lenf Nodlarında Mikrometastaz Araştırılması ve Sağkalıma Olan Etkisi. İstanbul: Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesi, 2005:9-12pp.
17. Yurdakul A. Akciğer Kanserinin Histolojik Tiplerinin Dağılımı (2216 olgunun analizi). *Toraks Dergisi* 2002;3(1):59-65.
18. Fu JB, Kau TY, Severson RK, Kalemkerian GP. Lung cancer in women: analysis of the national Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Chest* 2005;127:768-77.
19. Akkoçlu. Akciğer Kanserlerinde Tanı, Evreleme ve Tedavi Öncesi Değerlendirme. 2004;65.

20. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2007;75:56-63.
21. Yılmaz U. Akciğer Kanseri Evreleme 2009. *Türk Akciğer Kanseri Derneği* 2009:5.
22. Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev*;29:405-34.
23. Korpanty G, Smyth E, Sullivan LA, Brekken RA, ark. Antiangiogenic therapy in lung cancer: focus on vascular endothelial growth factor pathway. *Exp Biol Med (Maywood)*;235:3-9.
24. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
25. Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch KW, ark. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbecks Arch Surg* 2007;392:371-9.
26. Dijkgraaf I, Boerman OC. Radionuclide imaging of tumor angiogenesis. *Cancer Biother Radiopharm* 2009;24:637-47.
27. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 2004;9 Suppl 1:2-10.
28. Bilgi PT. Romatoid Artritli Hastalarda Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Düzeylerinin Değerlendirilmesi. İstanbul: İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2008:14pp.
29. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res* 2010;31:158-75.
30. Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006;51:143-58.
31. Fayette J, Soria JC, Armand JP. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer* 2005;41:1109-16.
32. Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem* 2007;102:1358-67.
33. Roskoski R, Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;62:179-213.
34. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005;65:550-63.
35. Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther* 2005;4:315-21.
36. Papaioannou AI, Kostikas K, Kollia P, Gourgoulialis KI. Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe? *Respir Res* 2006;7:128.
37. Murukesh N, Dive C, Jayson GC. Biomarkers of angiogenesis and their role in the development of VEGF inhibitors. *Br J Cancer* 2010;102:8-18.
38. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, ark. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004;56:549-80.
39. Harper J, Moses MA. Molecular regulation of tumor angiogenesis: mechanisms and therapeutic implications. *EXS* 2006:223-68.
40. Serra JM, Gutierrez A, Alemany R, Navarro M, ark. Inhibition of c-Myc down-regulation by sustained extracellular signal-regulated kinase activation prevents the antimetabolite methotrexate- and gemcitabine-induced differentiation in non-small-cell lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 2008;73:1679-87.
41. Stutfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life* 2009;61:915-22.

42. Thomas M, Augustin HG. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 2009;12:125-37.
43. Shim WS, Ho IA, Wong PE. Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res* 2007;5:655-65.
44. Tavakkoli. Kararlı Koroner Arter Hastalarında Plazma Angiopoietin-1,Angiopoietin-2 ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktör Düzeyleri. Ankara: Hacettepe Üniversitesi 2008:17pp.
45. Bach F, Uddin FJ, Burke D. Angiopoietins in malignancy. *Eur J Surg Oncol* 2007;33:7-15.
46. Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol* 2009;29:2011-22.
47. Harfouche R, Hussain SN. Signaling and regulation of endothelial cell survival by angiopoietin-2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H1635-45.
48. Hu B, Cheng SY. Angiopoietin-2: development of inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol Rep* 2009;11:111-6.
49. Tanaka F, Ishikawa S, Yanagihara K, Miyahara R, ark. Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2002;62:7124-9.
50. Ramsauer M, D'Amore PA. Getting Tie(2)d up in angiogenesis. *J Clin Invest* 2002;110:1615-7.
51. Qiagen. TissueLyser LT Handbook. 2009:25.
52. Ballas MS, Chachoua A. Rationale for targeting VEGF, FGF, and PDGF for the treatment of NSCLC. *Onco Targets Ther* 2011;4:43-58.
53. MacKinnon AC, Kopatz J, Sethi T. The molecular and cellular biology of lung cancer: identifying novel therapeutic strategies. *Br Med Bull*;95:47-61.
54. Yano S, Nishioka Y, Goto H, Sone S. Molecular mechanisms of angiogenesis in non-small cell lung cancer, and therapeutics targeting related molecules. *Cancer Sci* 2003;94:479-85.
55. Zhao J, Yan F, Ju H, Tang J, ark. Correlation between serum vascular endothelial growth factor and endostatin levels in patients with breast cancer. *Cancer Lett* 2004;204:87-95.
56. Hyder SM. Sex-steroid regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:667-87.
57. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011-27.
58. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002;20:4368-80.
59. Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, ark. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet* 2004;75:460-74.
60. Park JH, Choi H, Kim YB, Kim YS, ark. Serum angiopoietin-1 as a prognostic marker in resected early stage lung cancer. *Lung Cancer* 2009;66:359-64.
61. Takigawa N, Segawa Y, Fujimoto N, Hotta K, ark. Elevated vascular endothelial growth factor levels in sera of patients with lung cancer. *Anticancer Res* 1998;18:1251-4.
62. Park JH, Park KJ, Kim YS, Sheen SS, ark. Serum angiopoietin-2 as a clinical marker for lung cancer. *Chest* 2007;132:200-6.
63. Laack E, Kohler A, Kugler C, Dierlamm T, ark. Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2002;13:1550-7.

64. Shimanuki Y, Takahashi K, Cui R, Hori S, ark. Role of serum vascular endothelial growth factor in the prediction of angiogenesis and prognosis for non-small cell lung cancer. *Lung* 2005;183:29-42.
65. Yano T, Tanikawa S, Fujie T, Masutani M, ark. Vascular endothelial growth factor expression and neovascularisation in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2000;36:601-9.
66. Tait CR, Jones PF. Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *J Pathol* 2004;204:1-10.
67. Stefanou D, Batistatou A, Arkoumani E, Ntzani E, ark. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and non-small-cell lung carcinomas. *Histol Histopathol* 2004;19:37-42.
68. Wong MP, Chan SY, Fu KH, Leung SY, ark. The angiopoietins, tie2 and vascular endothelial growth factor are differentially expressed in the transformation of normal lung to non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 2000;29:11-22.
69. Hashizume H, Falcon BL, Kuroda T, Baluk P, ark. Complementary actions of inhibitors of angiopoietin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res* 2010;70:2213-23.
70. Ilhan N, Deveci F. Functional significance of vascular endothelial growth factor and its receptor (receptor-1) in various lung cancer types. *Clin Biochem* 2004;37:840-5.
71. Matsuyama W, Hashiguchi T, Mizoguchi A, Iwami F, ark. Serum levels of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer. *Chest* 2000;118:948-51.
72. Park SK, Kim HI, Yang YI. Roles of vascular endothelial growth factor, Angiopoietin 1, and Angiopoietin 2 in nasal polyp. *Laryngoscope* 2009;119:409-13.
73. Iwasaki A, Kuwahara M, Yoshinaga Y, Shirakusa T. Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels, as prognostic indicators in NSCLC. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;25:443-8.

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Akciğer kanseri 20. yüzyılın başlarında nadir görülmesine rağmen günümüzde sıklığı giderek artan önemli bir sağlık problemidir. Bu hastalığın teşhis ve tedavisinin takibinde yol gösterecek maddelerin belirlenmesi için çalışmalar sürdürülmektedir.

Bu çalışmada, toplam 34 akciğer kanser hastasının kanlarında ve tümör dokularında bazı protein yapısındaki maddelerin incelenmesi amaçlanmaktadır. Böyle yararlı maddeler belirlendiği takdirde hastalığın teşhis ve tedavi takibinde şu anda uygulanan mevcut inceleme yöntemlerine katkıda bulunacaktır. Çalışmamızda tüm hastalardan ameliyat öncesinde kol damarından diğer incelemeler için kan alınırken ilave olarak 5 cc kan alınacaktır. Kan alma sırasında, kan alınan bölgede hematoma (cilt altı kanama) görülebilir. Bunu önlemek için pamukla bası yapılacaktır. Ayrıca ameliyatta çıkarılan tümörden ve normal eşlenik dokudan patoloji uzmanının uygun gördüğü bölgeden alınacak 200 mg kadar doku inceleme için ayrılacaktır. Kendilerine hastalıklarının takibi için gerekli olan işlemler dışında farklı bir uygulama yapılmayacaktır. Bu çalışmanın katılan kişilere doğrudan ve kısa vadede tıbbi bir yararı olmayacaktır, ancak bu çalışma hastalığın teşhis ve tedavi takibinde şu anki uygulanan mevcut inceleme yöntemlerine uzun vade de katkıda bulunacaktır.

Çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın:

Adı:

Soyadı:

Adres:

Telefon:

Tarih :

İmza :

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin

Adı:

Soyadı:

Tarih :

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı: Dr. Nurhilal

Soyadı: YUSUFOĞLU

Telefon Numarası: 05058610369

Tarih :

İmza :

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU (Sağlık Gönüllü)

Akciğer kanseri 20. yüzyılın başlarında nadir görülmesine rağmen günümüzde sıklığı giderek artan önemli bir sağlık problemidir. Bu hastalığın teşhis ve tedavisinin takibinde yol gösterecek maddelerin belirlenmesi için çalışmalar sürdürülmektedir.

Bu çalışmada, toplam 34 akciğer kanser hastasının kanlarında ve tümör dokularında bazı protein yapısındaki maddelerin incelenmesi amaçlanmaktadır. Böyle yararlı maddeler belirlendiği takdirde hastalığın teşhis ve tedavi takibinde şu anda uygulanan mevcut inceleme yöntemlerine katkıda bulunacaktır. Çalışmamızda tüm hastalardan ameliyat öncesinde kol damarından diğer incelemeler için kan alınırken ilave olarak 5 cc kan alınacaktır. Ayrıca ameliyatta çıkarılan dokudan patoloji uzmanının uygun gördüğü bölgeden alınacak 200 mg kadar doku inceleme için ayrılacaktır. Kendilerine hastalıklarının takibi için gerekli olan işlemler dışında farklı bir uygulama yapılmayacak. Bu çalışmanın katılan kişilere doğrudan ve kısa vadede tıbbi bir yararı olmayacaktır, ancak bu çalışma hastalığın teşhis ve tedavi takibinde şu anki uygulanan mevcut inceleme yöntemlerine uzun vade de katkıda bulunacaktır.

Kontrol grubu olarak da hasta grubuna benzer yaş ve cinste olan sağlıklı 32 kişi çalışmaya alınacaktır. Bu araştırma kapsamında kan alımı dışında başka bir girişim yapılmayacaktır. Bu araştırmaya yardımcı olmak üzere, alınacak olan kanı (1/2 tüp; 5 ml) kullanabilmek için müsaadenizi istiyoruz. Bu çalışma için kan sadece bir kez alınacaktır. Bu işlem sağlıklı gönüllülerin ortalama 10 dakikasını alacaktır. Kan alma sırasında, kan alınan bölgede hematoma (cilt altı kanama) görülebilir. Bunu önlemek için pamukla bası yapılacaktır. Bunun haricinde bir problem görüldüğünde aşağıda verilen telefon numarasından sorumlu hekim Nurhilal YUSUFOĞLU'na ulaşılabilecektir.

Çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isim kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Tel:

Adres:

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin;

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Adres:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı: Nurhilal

Soyadı: YUSUFOĞLU

Tarih:

Tel: 0 505 8610369

Adres: Onur mah. Mandalin sok. No:9/13 Balçova /İZMİR

İmza:

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Etik Kurul Üyeleri

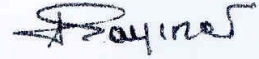
Prof.Dr.A.Arzu SAYINER
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Doç.Dr.Servet AKAR
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 30 Temmuz 2009 tarih ve 01/18/2009 no.lu toplantısının 197/2009 Protokol numaralı Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerince Prof.Dr.Hüseyin İŞLEKEL'in proje yöneticisi Dr. Nurihal YUSUFOĞLU'nu sorumlusu olduğu, "Akciğer kanserinde serum ve dokuda protein belirteçlerini incelenmesi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



**Prof. Dr.A.Arzu SAYINER
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı**

**Etik Kurul Sekreteri
Hatice İÇCİ**