



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KOLOREKTAL KANSERDE NOSIP, MMP-2, MMP-9 VE
TIMP-2 GEN İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYGÜL CEMRE ŞAHİN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. SELDA KABADERE**

2018



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KOLOREKTAL KANSERDE NOSIP, MMP-2, MMP-9 VE
TIMP-2 GEN İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYGÜL CEMRE ŞAHİN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. SELDA KABADERE**

KABUL VE ONAY SAYFASI

Aygül Cemre ŞAHİN'in Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "KOLOREKTAL KANSERDE NOSIP, MMP-2, MMP-9 VE TIMP-2 GEN İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih
24/05/2018

Üye: Prof. Dr. Kubilay UZUNER

Üye: Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP

Üye: Prof. Dr. Selda KABADERE

Üye: Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI

Üye: Doç. Dr. Gökhan KUŞ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01/06/2018 tarih ve 197/... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

5799

Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü

Özet

Nitrik oksit (NO), hem fizyolojik hem de patolojik şartlarda birçok hücreden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından sentezlenen, gaz yapıda bir moleküldür. NO'nun, kanserli hücrelerin invazyon ve migrasyonuna katkı sağladığı bulunmuştur. Bu etkiyi meydana getirebilmek için NO, ekstrasellüler matriks (ECM) moleküllerinin yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerini uyarmaktadır. Birçok tümörün gelişiminin sebebi olarak bilinen MMP-2 ve MMP-9, NO tarafından tetiklenerek ECM moleküllerinin yıkımına yol açmaktadır. MMP-2 ve MMP-9 üzerinde baskılayıcı etki gösteren doku metalloproteinaz baskılayıcısı (TIMP)-2 ise NO tarafından uyarılan ve birçok kanser tipinde varlığı kanıtlanmış bir enzimdir. Kanser malignitesi ile doğrudan ilişkili olan bu parametrelerin, dokuda NO düzeyini azalttığı bilinen nitrik oksit sentaz ile etkileşen protein (NOSIP) ile arasındaki ilişki hala bilinmemektedir. NOSIP, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) enzimlerini inhibe eden bir proteindir. Bugüne kadar yapılan kısıtlı düzeydeki çalışmalar yüksek NO düzeyinin yıkıcı etkilerine karşı NOSIP'in eNOS ve nNOS üzerinde baskılayıcı etki meydana getirerek ve NO düzeyini düşürerek, dokuyu korumada rol oynadığını savunmaktadır. Bu çalışmada, bugüne kadar hiçbir kanserli dokuda varlığı kanıtlanmamış olan NOSIP'in kolorektal kanser (KRK) dokularındaki düzeyi ve kanserin gelişiminde önemli rol oynayan parametrelerle ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda KRK hastalarından ve sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinde NO ile NOSIP, MMP-2, MMP-9, TIMP-2 düzeylerinin karşılaştırılması, ayrıca kanserli hastalardan alınan tümör dokusu ve normal doku örneklerinde NOSIP, MMP-2, MMP-9, TIMP-2 ifadenme düzeylerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamız için KRK hastalarının tümörlü ve normal dokularından (tümörün 10 cm uzağındaki mukozal dokudan) örnekler alınmıştır. Ayrıca KRK hastalarından ve sağlıklı bireylerden kan örnekleri toplanmıştır. Toplanan kan örneklerinden elde edilen plazmalar ELISA ve renge dayalı nitrit/nitrat tayini deneylerinde kullanılmıştır. Cerrahi operasyon sırasında alınan doku örnekleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) çalışmaları için kullanılmıştır.

Kan örnekleriyle yapılan ELISA deneylerinden elde edilen sonuçlara göre NO düzeyinin tümörlü dokuda normal dokuya göre ciddi oranda yüksek olduğu saptanmıştır. ELISA ve RT-PCR sonuçları birbirine paralel olarak tümörlü dokudaki MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri normal dokuya kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Ancak tümörlü doku ve normal dokuda

TIMP-2 düzeyleri arasında anlamlı derecede fark gözlenmemiştir. NOSIP miktarı ELISA bulgularına göre kanserli hastaların plazmalarında normal bireylere kıyasla düşük bulunmuştur. RT-PCR sonuçlarına göre ise istatistiki açıdan anlamlı olmamakla birlikte NOSIP düzeyinin tümörlü dokuda azaldığı gözlenmiştir.

Deneylerimizden elde ettiğimiz bu sonuçlar KRK ile normal dokular arasındaki farklı NO düzeyine bağlı olarak MMP-2 ve MMP-9 düzeyinin değiştiğini, bununla birlikte NOSIP düzeyinde de bir farklılığın gözleendiğini açığa çıkarmıştır. Yapılan bu çalışma tümör malignitesi, NO ve NOSIP arasındaki ilişkinin açıklandığı ilk çalışma niteliğindedir. Ancak bu mekanizmaların anlaşılabilmesi için daha ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Kolorektal kanser, NO, NOSIP, Matriks metalloproteinazlar

Summary

Nitric oxide (NO) is a gaseous molecule synthesized by nitric oxide synthase (NOS) enzymes from many cell types in both physiological and pathological conditions. It is found that NO is involved in invasion and migration of tumour cells. NO stimulates the matrix metalloproteinase (MMP) enzymes, responsible for the degradation of extracellular matrix (ECM) molecules. MMP-2 and MMP-9, known as responsible for many tumour progression, are triggered by NO, lead to the degradation of ECM molecules. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2), which has inhibiting effects on MMP-2 and MMP-9, is an enzyme proved to be present in many types of cancer and TIMP-2 is stimulated by NO. The relationship between these parameters, which are directly related to cancer malignancy, and nitric oxide synthase interacting protein (NOSIP), known to reduce NO levels in the tissue, is still unknown. NOSIP is a protein that inhibits endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS). To date, limited studies have suggested that NOSIP plays a role in tissue preservation by exerting a suppressive effect on eNOS and nNOS and by reducing the level of NO; in this way NOSIP inhibits the destructive effects. In this study, it was aimed to determine the relationship between the levels of NOSIP which has not been proven to be present in any cancer tissue, and parameters that play important role in the development of cancer. We aimed to compare NO and NOSIP, MMP-2, MMP-9, TIMP-2 levels in blood samples, taken from patients with colorectal cancer (CRC) and healthy subjects. Additionally the expression levels of NOSIP, MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 in CRC tumour tissue and normal tissue samples taken from cancer patients.

In the present study, samples were obtained from the tumour and normal (mucosal tissue, 10 cm far away from the tumour) tissues in CRC patients. Blood samples were also collected from patients and healthy subjects. Collected plasma samples were used for ELISA and colorimetric nitrite/nitrate assays. Tissue samples obtained during the surgical operation were used for real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) studies.

According to the results of experiments, NO level was found to be significantly higher in tumour tissue than in normal tissue. The results of ELISA and RT-PCR experiments are found to be similar, the levels of MMP-2 and MMP-9 in tumour tissue are higher than normal tissue. However, no significant difference was observed between TIMP-2 levels in tumour tissue and normal tissue. NOSIP level was found to be low in plasma of

patients with cancer compared to normal individuals according to ELISA findings. According to the results of RT-PCR experiments, although it is not significant statistically, NOSIP level decreased in the tumor tissue.

These results suggest that MMP-2 and MMP-9 levels change due to different levels of NO between CRC and normal tissues. There is a difference between patients and normal individuals in NOSIP levels. This is the first study, describing the relationship between NO, NOSIP and tumour malignancy. However, further research is needed to understand these mechanisms.

Key words: Colorectal cancer, NO, NOSIP, Matrix metalloproteinases



İçindekiler

Özet	iii
Summary	v
Tablo Dizini	x
Şekil Dizini	xi
Simge ve Kısaltmalar Dizini	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kalın Bağırsak	3
2.1.1. Kalın bağırsağın anatomisi	3
2.1.2. Kolonun arterleri	4
2.1.3. Kolonun lenfatik drenajı	5
2.1.4. Kalın bağırsağın fonksiyonu	5
2.2. Kolorektal Kanserler	6
2.2.1. Epidemiyoloji	6
2.2.2. Risk faktörleri	6
2.2.2.1. Diyet	7
2.2.2.2. İltihabi bağırsak hastalıkları	7
2.2.2.3. Genetik faktörler	7
2.2.2.4. Diğer faktörler	8
2.2.3. Histopatoloji	8
2.2.4. Evrelendirme ve prognoz	9
2.2.5. KRK klinik bulguları	11
2.2.6. Tedavi yöntemleri	12
2.2.6.1. Cerrahi tedavi	12
2.2.6.2. Kemoterapi ve radyoterapi	12
2.3. KRK Gelişimi ve Yayılmasında Rol Oynayan Moleküller – Matriks Metalloproteinazlar	13
2.3.1. MMP alt grupları	15
2.3.1.1. Kollajenazlar	15
2.3.1.2. Jelatinazlar	16
2.3.1.3. Stromelisinler	16
2.3.1.4. Matrilisinler	16
2.3.1.5. Membran tip MMP'ler	17
2.3.1.6. Diğer MMP'ler	17
2.3.2. MMP'lerin üç boyutlu yapısı	17
2.3.3. proMMP'lerin aktivasyonu	19
2.3.4. MMP'lerin substrat özgüllükleri	20
2.3.5. MMP aktivitesinin biyolojik etkileri	20

2.3.6. MMP'lerin düzenlenmesi	20
2.4. TIMP'ler	22
2.4.1. TIMP'lerin alt grupları	22
2.4.1.1. TIMP-1	22
2.4.1.2. TIMP-2	22
2.4.1.3. TIMP-3	23
2.4.1.4. TIMP-4	23
2.4.2. TIMP'lerin biyolojik fonksiyonu	23
2.5. Kanserde MMP ve TIMP'in Rolü	24
2.6. Nitrik Oksit (NO)	25
2.6.1. Nitrik oksit sentazlar	28
2.6.1.1. Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS)	29
2.6.1.2. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)	30
2.6.1.3. Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS)	31
2.6.2. Kanserde NO'nun rolü	31
2.7. NOSIP (Nitrik Oksit Sentaz ile Etkileşen Protein)	32
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	34
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Solüsyonlar	34
3.1.1. Cihazlar	34
3.1.2. Kimyasal malzemeler	34
3.2. Deney Protokolü	35
3.3. Dokuların Toplanması	35
3.4. Kolorimetrik Nitrit/Nitrat Assay	36
3.4.1. Reaktiflerin hazırlanması	36
3.4.2. Assay protokolü	36
3.5. ELISA Yöntemi ile MMP-2, MMP-9, TIMP-2 ve NOSIP Tayini	38
3.5.1. Örneklerin hazırlanması	38
3.5.2. Reaktiflerin hazırlanması	38
3.5.3. Assay protokolü	39
3.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Tekniği ile MMP-2, MMP-9, TIMP-2 ve NOSIP Tayini	41
3.6.1. RNA izolasyonu	41
3.6.1.1. Çözeltilerin hazırlanması	41
3.6.1.2. İşlem basamakları	42
3.6.2. cDNA sentezi	42
3.6.3. RT-PCR	43
3.7. İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1. ELISA Bulguları	45
4.1.1. Total nitrit+nitrat tayini bulguları	45
4.1.2. NOSIP miktarı	45

4.1.3. MMP-2 miktarı	46
4.1.4. MMP-9 miktarı	46
4.1.5. TIMP-2 miktarı	47
4.2. RT-PCR Bulguları	47
4.2.1. NOSIP gen ifadenme düzeyi	48
4.2.2. MMP-2 gen ifadenme düzeyi	48
4.2.3. MMP-9 gen ifadenme düzeyi	49
4.2.4. TIMP-2 gen ifadenme düzeyi	49
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	56
8. ÖZGEÇMİŞ	64



Tablo Dizini

Tablo 2.1	:Tümörün evresine karşılık gelen TNM, Dukes ve Astler-Coller sınıflandırma sistemlerinin karşılaştırılması
Tablo 2.2	:MMP'lerin alt grupları, kromozom bölgeleri ve özgül substratları
Tablo 3.1	:Örneklerin plate düzeni
Tablo 3.2	:RT-PCR için karışım içeriği



Şekil Dizini

- Şekil 2.1** :Kalın bağırsağın vücuttaki yerleşimi ve kısımları
- Şekil 2.2** :Kalın bağırsak duvarının kesiti
- Şekil 2.3** :Kalın bağırsağın arterleri
- Şekil 2.4** :Kalın bağırsağın histolojik yapısı
- Şekil 2.5** :İnsanda tanımlanmış tüm MMP'lerin moleküler yapısı
- Şekil 2.6** :Bir tümör hücresinin damar duvarını aşması, göçü ve MMP'ler aracılığıyla ECM'nin yıkımı sonucu tümörün gelişmesi
- Şekil 2.7** :İki basamaklı bir reaksiyon sonucunda L-arjinin'den NO'nun sentezlenmesi
- Şekil 2.8** :NO'nun biyolojik sistemlerde kullandığı klasik ve klasik olmayan yolları
- Şekil 2.9** :NOS enziminin yapısı ve NO sentezinde elektron akış mekanizması
- Şekil 2.10** :nNOS, eNOS ve iNOS enzimlerinin moleküler yapısı
- Şekil 2.11** :Tümör hücrelerinde yüksek NO düzeyi (>500 nM) hücrede hasarı artırarak apoptoza yol açmaktadır. Orta düzeyde NO (100-500 nM) invazyon ve metastaza neden olmakta, apoptozu önleyerek tümör hücrelerinin malignitesini arttırmaktadır. Düşük NO düzeyinde (<100 nM) ise tümör hücrelerinin proliferasyonu artmakta ve anjiyogenezle birlikte tümör gelişimine katkı sağlamaktadır.
- Şekil 3.1** :Kolorimetrik Nitrit/Nitrat Assay prosedürü uygulandıktan sonra örneklerdeki renk değişiminin gözlenmesi
- Şekil 3.2** :Stok solüsyonun dilüsyonu
- Şekil 3.3** :ELISA metoduna göre; 1. Örneğin kuyucuklara yüklenmesi, 2. Örneğin plate tabanındaki antikora bağlanması, 3. Biotinin eklenmesi ve örneğe bağlanması, 4. HRP konjugat eklenmesi, 5. Renk değişiminin gözlendiğinde stop solüsyonuyla reaksiyonun durdurulması, 6. Sarı renk oluşumunun gözlenmesini göstermektedir.
- Şekil 3.4** :ELISA yöntemine göre stop solüsyonu eklendikten sonra platelerde görülen renk değişimi (A. NOSIP, B. MMP-9, C. MMP-2, D. TIMP-2).
- Şekil 4.1** :KRK hastaları ile kontrol grubu bireylerinin plazma total nitrit+nitrat düzeylerinin karşılaştırılması (p<0.01).

- Şekil 4.2** :Hasta ve sağlıklı bireylerin plazmalarında NOSIP miktarının ng/ml cinsinden karşılaştırılması ($p>0,05$).
- Şekil 4.3** :Hasta ve sağlıklı bireylerin plazmalarında MMP-2 miktarının ng/ml cinsinden karşılaştırılması ($p<0,005$).
- Şekil 4.4** :Hasta ve sağlıklı bireylerin plazmalarında MMP-9 miktarının pg/ml cinsinden karşılaştırılması ($p<0.005$).
- Şekil 4.5** :Hasta ve sağlıklı bireylerin plazmalarında TIMP2 miktarının ng/ml cinsinden karşılaştırılması ($p>0.05$).
- Şekil 4.6** :Tümörlü ve normal dokuda NOSIP gen ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması ($p>0,05$).
- Şekil 4.7** :Tümörlü ve normal dokuda MMP-2 gen ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,05$).
- Şekil 4.8** :Tümörlü ve normal dokuda MMP-9 gen ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,05$).
- Şekil 4.9** :Tümörlü ve normal dokuda TIMP2 gen ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması ($p>0,05$).

Simge ve Kısaltmalar Dizini

AICR	:Kanser Araştırma Amerikan Enstitüsü
AJCC	:American Joint Committee on Cancer
APC	:Adenomatöz polipozis geni
CaM	:Kalmodulin
CCRC	:Clear cell renal cancer
cGMP	:Döngüsel guanozin mono fosfat
CNG	:Döngüsel nükleotid kapılı kanal
COX	:Siklooksijenaz
ECM	:Ekstrasellüler matriks
EDRF	:Endotel türevli gevşetici faktör
EGRF	:Epidermal büyüme faktörü
eNOS	:Endotelyal nitrik oksit sentaz
FAD	:Flavin adenin dinükleotid
FAP	:Ailesel adenomatöz polipozis
FGF	:Fibroblast büyüme faktörü
FMN	:Flavin mononükleotid
GPI	:Glikozil fosfatidil inozitol
GSNO	:S-nitrozoglutasyon
GTP	:Guanozin trifosfat
HIF-1 α	:Hipoksi indüklenebilir faktör-1 α
HNPCC	:Hereditör non polipozis kolorektal kanserler
HPCC	:Hereditör polipozis kolorektal kanserler
Hsp	:Isı şok proteini
IGF-1	:İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL	:İnterlökin
iNOS	:İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KRK	:Kolorektal kanser
MMP	:Matriks metalloproteinaz
MT-MMP	:Membran tip matriks metalloproteinaz
NADPH	:Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF- κ B	:Nükleer faktör- κ B
NLS	:Nükleer lokalizasyon sekansı
NMDA	:N-metil D-aspartik asit
NMDAR	:N-metil D-aspartik asit reseptörü
nNOS	:Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	:Nitrik oksit
NOS	:Nitrik oksit sentaz
NOSIP	:Nitrik oksit sentaz ile etkileşen protein
PDGF	:Trombosit kökenli büyüme faktörü

PKG	:Protein kinaz G
PSD95	:Postsinaptik yoğun protein 95
RECK	:Kazal motifli sistein açısından zengin proteini tetikleyen reversiyon
RNS	:Radikal nitrojen türevi
ROS	:Radikal oksijen türevi
SDS	:Sodyum dodesil sülfat
sGC	:Çözülebilir guanil siklaz
SNP	:Tek nükleotid polimorfizmi
SNP	:Sodyum nitroprussid
STAT	:Sinyal iletme ve transkripsiyon aktivatörü
TGF	:Değiştirici büyüme faktörü
TIMP	:Doku metalloproteinaz baskılayıcısı
TNF- α	:Tümör nekroz faktör- α
TNM	:Tümör-Lenf nodu-Metastaz
VEGF	:Vasküler endotelial büyüme faktörü
5-FU	:5-fluorourasil

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanserler (KRK) dünya çapında en yaygın kanserler arasında yer almakta ve kötüleşen çevresel etmenler nedeniyle görülme sıklığı her yıl daha da artmaktadır. KRK vakalarının yalnızca %25'i kalıtsal olarak hastalığın aktarıldığı bireylerdir (Migliore, Migheli, Spisni & Coppede, 2011). Diğer vakaların kansere yakalanmaları diyet, abdominal yağlanma, çeşitli iltihabi bağırsak hastalıkları, sigara ve alkol kullanımı ile tetiklenmektedir (Labianca vd., 2010). KRK gelişim mekanizmalarının aydınlatılması uygun tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle KRK tümörünün gelişiminde rol oynayan moleküller ve mekanizmalarının anlaşılması, kanser araştırmalarının büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır.

KRK gelişiminde rol oynayan moleküllerden biri matriks metalloproteinaz (MMP)'lerdir. MMP'ler hücreler arası alanda kollajenler, proteoglikanlar, fibronektin ve laminin gibi ekstrasellüler matriks (ECM)'in protein bileşenlerinin yıkımında görev almaktadır. Bu etkileri sayesinde embriyonik gelişim, doğum, büyüme ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik olaylara aracılık etmektedirler (Bode vd., 1999). Yüksek MMP aktivitesi sonucu dokuda yıkıcı etkilerin meydana gelmesini önleyen moleküller doku metalloproteinaz baskılayıcısı (TIMP) olarak adlandırılmaktadır. Bu enzimler MMP'lerin fizyolojik dengesini sürdürmesine katkı sağlamaktadır (Visse & Nagase, 2003). MMP'ler tümör hücrelerinde invazyon ve göçü tetiklemektedir. MMP-TIMP ifadenin düzeyi tümör derecesi ve tipine bağlı olarak değişiklik gösterse de kanser tedavisinde TIMP kullanımının, tümör büyümesini ve bölgesel yayılımını baskıladığı bulunmuştur (Baker, Edwards & Murphy, 2002).

İnsan kolon kanser hücre hattıyla yapılan bir çalışmada nitrik oksit (NO)'ün MMP-2 ve MMP-9'u uyararak tümör gelişimine katkı sağladığı kanıtlanmıştır (Damodharan, Ganesan & Radhakrishnan, 2011). NO, nitrik oksit sentaz (NOS)'lar tarafından L-arjininden sentezlenen gaz yapıda bir moleküldür (Ruiz, Cadenas & Lamas, 2011). Fizyolojik şartlarda NO hücre içinde döngüsel guanozin monofosfat (cGMP) sinyal yolağı üzerinden vazodilatasyon, trombosit agregasyonunun baskılanması, bilişsel fonksiyonlar gibi olaylara aracılık etmektedir (Francis, Busch & Corbin, 2010). Yüksek düzeyde üretilen NO, posttranslasyonel protein modifikasyonları yoluyla hücrede lipid peroksidasyonu, protein ve DNA denatürasyonu gibi yıkıcı etkilere yol açabilmektedir (Ruiz vd., 2011). Bir tümör dokusunda yüksek NO konsantrasyonu hücrede hasarı artırarak apoptoza yol açmaktadır. Orta düzeyde üretilen NO, tümör hücresinin invazyon ve migrasyonuna katkı sağlamakta, apoptozu önlemektedir.

Düşük konsantrasyonlarda NO, tümör hücrelerinin proliferasyonunu arttırarak tümör gelişimine katkı sağlamaktadır (Vahora, Khan, Alalami & Hussain, 2016).

NOS'ların enzim aktivitesinin düzenlenmesi NO'nun hücrel etkilerinin belirlenmesinde oldukça büyük önem taşımaktadır. Nitrik oksit sentaz ile etkileşen protein (NOSIP) nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimlerinin aktivitesini düzenleyebilmekte, ancak indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ile etkileşime girmemektedir. eNOS ve nNOS enzim aktivitesi hücre membranında meydana gelmektedir. NOSIP, bu enzimlerle protein-protein etkileşimine girerek NOS enzimlerinin hücrenin iç kısımlarına doğru hareket etmelerini sağlayarak aktivitelerini baskılamakta ve NO düzeyinin azalmasına neden olmaktadır (Dedio vd., 2001; Dreyer vd., 2004). Omurilik hasarı oluşturulan sıçan modelleriyle yapılan bir çalışmada doku hasarına neden olan yüksek NO düzeyine yanıt olarak NOSIP miktarının da arttığını ve NO düzeyini düşürerek dokuyu korumaya yönelik bir etkinlik gösterdiği düşünülmüştür (Yu, Zhong & Zhu, 2012).

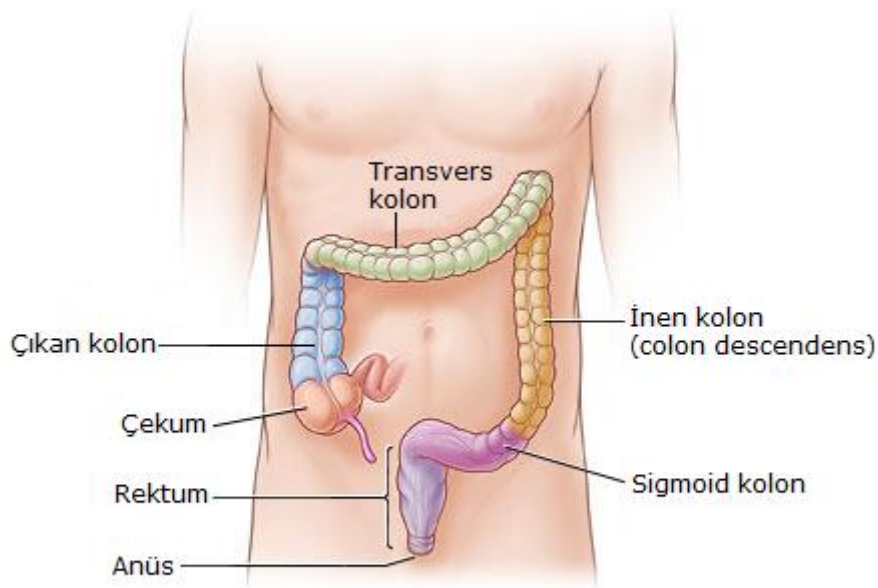
Daha önce hiçbir tümörlü dokuda varlığı ve ifadenme düzeyi kanıtlanmamış NOSIP'in NO düzeyi ile ilişkisinin belirlenmesi bu çalışmanın asıl amacıdır. KRK hastalarından ve sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinde NO miktarının ölçülmesi NOSIP ve NO arasındaki bağlantıyı kanıtlayacak nitelikte bir veri oluşturacaktır. Ayrıca kanserli dokuda maligniteyle orantılı olarak arttığı bilinen ve NO tarafından uyarılan MMP-2 ve MMP-9 enzimleri ile bu enzimler üzerinde inhibitör etki gösteren TIMP-2'nin ölçülmesi, malignite düzeyiyle NOSIP arasındaki ilişkinin belirlenmesinde önemli rol oynayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalın Bağırsak

2.1.1. Kalın bağırsağın anatomisi

Kalın bağırsak abdomen boşluğunda, ileumun bitiminden anüse kadar uzanan 130-150 cm uzunluğunda bir kanaldır ve çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ile rektumdan oluşmaktadır (Şekil 2.1) (Süzen, 2008; Buğra, 2004).

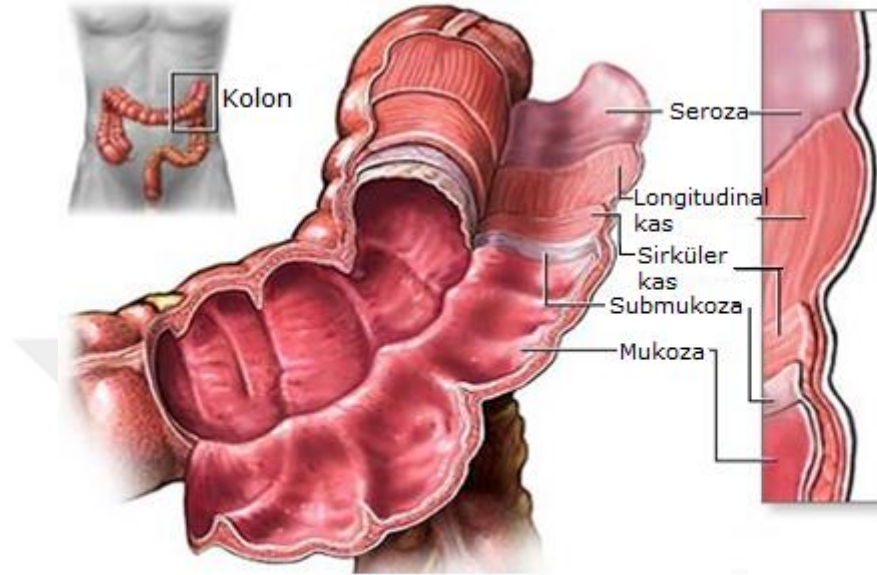


Şekil 2.1: Kalın bağırsağın vücuttaki yerleşimi ve kısımları (Staff, 2017).

Çekum kalın bağırsağın ilk kısmıdır ve uzunluğu 6-7 cm'dir. Çekumun arka yüzeyinde uzun, ince ve boru şeklinde appendiks vermiformis bulunmaktadır. Çıkan kolon (colon ascendens) çekumun devamında valva ileocaecalisin üst seviyesinden başlayan ve flexura coli dextraya kadar uzanan 15-20 cm uzunluğunda bir kanaldır. Transvers kolon ise flexura coli dextradan flexura coli sinistraya kadar uzanır ve uzunluğu yaklaşık 40-50 cm'dir. Transvers kolonun devamında 25-30 cm uzunluğunda, sol fossa iliaca kadar olan kısım ise inen kolon (colon descendens)'dur. Sol fossa iliacadan başlayıp 3. sakral vertebrada sonlanan kısım ise sigmoid kolondur. Rektum kalın bağırsağın son segmentidir. Üçüncü sakral vertebra ile anüs arasında bulunan 15-17 cm uzunluğunda bir kanaldır. Kadında rektum, uterus ve vagina ile erkekte ise önde bulbus penis,

ürogenital diyaframın arka kenarı, arkada ligamentum anakoksigeum ile komşudur (Süzen, 2008).

Kolon ve rektumun duvarı 5 ayrı katmandan oluşmaktadır (Şekil 2.2). Bunlar içten dışa doğru; mukoza, submukoza, iç sirküler kas, dış longitudinal kas ve serozadır (Brunicardi vd., 2010).



Şekil 2.2: Kalın bağırsak duvarının kesiti (Gersten, 2017).

İntraperitoneal kolon ve rektumun 1/3'lük kısmı olan proksimal rektum seroza ile örtülüdür. Orta ve alt rektumda seroza yoktur. Kas tabakasının en ince olduğu bölüm çekumdur (Brunicardi vd., 2010).

2.1.2. Kolonun arterleri

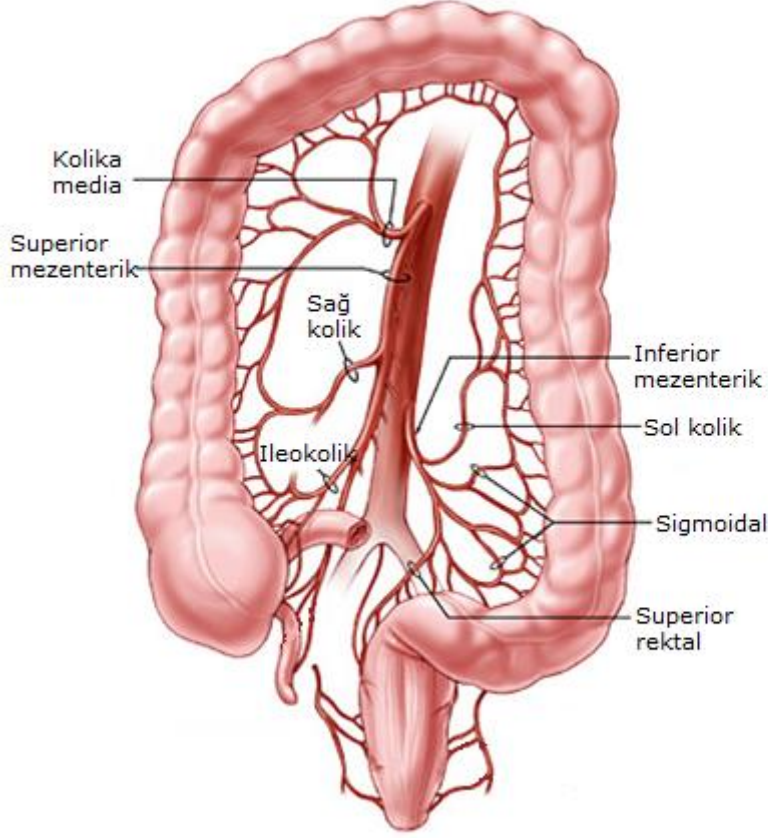
Kolonun kanlanmasını sağlayan iki ana arterden superior mezenterik arter dallanarak;

- Terminal ileum ve proksimal çıkan kolonu besleyen ileokolik arteri,
- Çıkan kolonu besleyen sağ kolik arteri,
- Transvers kolonu besleyen kolika media arterini vermektedir.

Diğer bir ana arter olan inferior mezenterik arter de dallanarak;

- İnen kolonu besleyen sol kolik arteri,
- Sigmoid kolonu besleyen sigmoidal arteri,

-Rektumun superiorunu besleyen superior rektal arteri vermektedir (Şekil 2.3)(Brunicardi vd., 2010).



Şekil 2.3: Kalın bağırsağın arterleri (Colorectal resection, 2011).

2.1.3. Kolonun lenfatik drenajı

Kolonun lenfatik drenajı muskularis mukoza içindeki lenfatik ağdan sağlanmaktadır. Lenf düğümleri bağırsak duvarında (epikolik), büyük mezenter arter etrafında (intermediate), superior ve inferior arterlerin kaynaklandığı yerlerde bulunmaktadır (Brunicardi vd., 2010).

2.1.4. Kalın bağırsağın fonksiyonu

Kalın bağırsak, sindirim sisteminin son 1/5'lik kısmını oluşturan bir kanaldır (Barret, Brooks, Boitano & Barman, 2010). Su, sodyum ve diğer minerallerin emilimini gerçekleştirmektedir. Aktif sodyum emilimi, elektriksel potansiyel oluşumunu sağlayarak klorun emilimini de sağlar. Yüksek düzeyde aldosteron sodyum emiliminin artmasına neden olmaktadır. Sodyum ve klor absorpsiyonu osmotik gradient oluşumuna yol açarak suyun da emilimine yol açar (Guyton & Hall, 2001). İleumdan gelen 1000-2000 ml'lik kimusun yaklaşık 200-250 ml'si katı feçes haline dönüşür (Barret vd., 2010). Kalın bağırsaktaki absorpsiyonun büyük çoğunluğu proksimal kolonda gerçekleşmektedir. Distal kolon feçesin depolanmasından sorumludur (Guyton & Hall, 2001).

2.2. Kolorektal Kanserler

2.2.1. Epidemiyoloji

Kolon ve rektum kanserleri dünya çapında en yaygın rastlanan kanserler arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Avrupa'da her yıl yaklaşık 250.000 yeni kolon kanseri vakası teşhis edilmekte ve bu tüm malignitelerin %9'unu oluşturmaktadır (Labianca vd., 2010; Migliore vd., 2011).

Kolon kanseri erken evrede teşhis edildiğinde iyi sonuçlar alınmasıyla karakterize olan bir kanser türüdür (Labianca vd., 2010). Elde edilen bilgilere göre bu kanser türünün 50 yaş ve sonrasında etkili olduğu, eğer kişi risk altında değilse 50 yaşından önce hastalığın teşhis edilemediği görülmüştür. Son yıllarda 50-75 yaş arası bireylerde kolonoskopi kullanımının yaygınlaşması, lezyonların daha erken saptanabilmesi ve böylece görülme sıklığının %4 oranında düşmesini sağlamıştır (Campos, 2017).

Dünyada KRK görülme sıklığı endüstriyelleşme ve şehirleşmeye bağlı olarak artmaktadır (Migliore vd., 2011). Yüksek gelir düzeyine sahip ülkelerde KRK görülme sıklığı çok yüksek olmakla birlikte, son zamanlarda orta ve düşük gelir düzeyine sahip ülkelerde de artmakta olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yine son zamanlarda yapılan araştırmalarda, görülme sıklığının sabit veya düşük olduğu ülkelerdeki genç bireylerde de hastalığın görülme sıklığının arttığı gözlenmiştir (Labianca vd., 2010). Amerikan Kanser Topluluğu'ndan alınan bilgilere göre tüm dünyada 1992-2005 yılları arasında 20-49 yaş arası erişkin bireylerde görülme sıklığının arttığı, bunun erkekler arasındaki oranı yılda %3,5 iken kadınlarda %2,9 olduğu görülmektedir (Campos, 2017).

Yapılan araştırmalardan elde edilen bilgilere göre artan endüstriyelleşme ve çeşitli çevresel faktörler sonucunda görülme sıklığının giderek artması, uygun tanı ve tedavi yöntemleri ile kanser taramalarının yaygınlaştırılmasına olan ihtiyacı arttırmaktadır. Kanser oluşum mekanizmalarının aydınlatılması, uygun tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, görülme sıklığının düşmesi için kritik öneme sahiptir.

2.2.2. Risk faktörleri

KRK dünya çapında en fazla sporadik olarak meydana gelmektedir. Hastaların yalnızca %25'i ailenin diğer bireylerinde hastalığın görüldüğü ve kalıtsal olarak aktarıldığı bireylerdir. KRK'ların %5-6'sı majör KRK genindeki kalıtsal mutasyonlardan kaynaklanırken, ailesel formların geri

kalanı büyük oranda gen-çevre etkileşiminden kaynaklanmaktadır (Migliore vd., 2011).

2.2.2.1. Diyet

Diyet KRK etiyojisinde şimdiye kadar tanımlanmış en önemli dış faktördür. Dünya Kanser Araştırma Fonu (World Cancer Research Fund International) ve Kanser Araştırma Amerikan Enstitüsü (AICR) KRK'nın diyetle en fazla önlenilebilen kanser türü olduğunu ileri sürmektedir (Labianca vd., 2010).

Kırmızı et ve aşırı et tüketimi, günde 30 gramdan fazla etanol içeren alkollü içecekler, yağlı vücut ve abdominal yağlanma, KRK'ya neden olan faktörler arasında sayılmaktadır. Lifli gıdalar, sarımsak, süt ve kalsiyumun ise kansere karşı koruyucu olduğu saptanmıştır. Ancak bunlar nişastasız sebze, meyve ve folat içeren yiyecekler ile balık, D vitamini içeren yiyecekler, selenyum ve selenyum içeren yiyeceklerle sınırlandırılmıştır. Demir içeren gıdalar, peynir, hayvansal yağ ve şeker içeren gıdaların ise kanser oluşumunu destekleyici yönde rol oynadığı ileri sürülmektedir (Labianca vd., 2010).

2.2.2.2. İltihabi bağırsak hastalıkları

Uzun süre iltihabi bağırsak hastalığı olanlarda kanser gelişme riski yüksektir. Kronik inflamasyonlarda mukozada malignant değişimlere yatkınlık geliştiği düşünülmektedir (Brunicardi vd., 2010). Yapılan çalışmalarda Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin kolon kanser riskini arttırdığı görülmüştür. Ayrıca ülseratif kolit ile KRK arasında pozitif bir ilişki olduğu bulunmuştur (Labianca vd., 2010). Kansere yakalanma riskinin kolitin süresi ve yaygınlığı ile orantılı olarak arttığı bilinmektedir (Brunicardi vd., 2010).

2.2.2.3. Genetik faktörler

KRK vakalarının yaklaşık yüzde %25'i aileden kalıtsal olarak aktarılmaktadır. Kalıtsal olarak aktarılan KRK'ya yatkınlık, polipozis ve non polipozise bağlı olarak gelişmektedir (Labianca vd., 2010).

Hereditör polipozis kolorektal kanserler (HPCC) polipozis zemininden gelişen kanserlerdir (American Cancer Society, 2008). Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) bir HPCC'dir. Otozomal dominant kalıtılmaktadır. Kolonda çok sayıda adenomatöz polipin gelişmesiyle karakterizedir. FAP, 5.

kromozomun q21 lokusunda bulunan APC (adenomatöz polipozis geni) genindeki mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir (Migliore vd., 2011).

Hereditör non polipozis kolorektal kanserler (HNPCC) Lynch sendromu olarak da bilinmektedir. Lynch sendromu DNA onarım genindeki mutasyonlar sonucu gelişen ve otozomal dominant kalıtılan bir hastalıktır. FAP'dan farklı olarak polipozis nadir olarak görülmektedir. Bir DNA onarım geni mutasyonu taşıyıcısının KRK'ya yakalanma olasılığı %80 olarak tahmin edilmektedir. HNPCC en fazla sağ tarafta gelişmesiyle karakterizedir ve bunlar genelde musinöz ya da taşlı yüzük hücresi (signet ring cell) morfolojisi göstermektedirler. Lynch sendromu hastaları ve onların akrabalarında KRK'ya ilaveten endometriyal adenokarsinoma, mide, over, safra, idrar yolları, ince bağırsak, beyin ve pankreatik kanserler gibi çeşitli kanser türlerine yakalanma riski artmaktadır (Migliore vd., 2011).

2.2.2.4. Diğer faktörler

Sigara KRK'nın öncülü olarak kabul edilmekte ve geniş kolorektal adenomlarla pozitif ilişki göstermektedir (Labianca vd., 2010). Özellikle 35 yıl ve üzeri sigara kullanımının kolon adenomu gelişimiyle paralellik gösterdiği bilinmektedir (Brunicardi vd., 2010). Bu nedenle tütüne maruziyet kolorektal karsinogenez başlangıcının bir nedeni olabilmektedir (Labianca vd., 2010). Metabolik sendrom, erkeklerde KRK görülme sıklığıyla pozitif olarak ilişkilendirilmiştir fakat kadınlarda böyle bir ilişki görülmemiştir (Ahmed, Schmitz, Anderson, Rosamond & Folsom, 2006). Postmenapozal östrojene ilaveten progesteron hormonu kullanımı kolorektal tümörün insidansını azaltmaktadır (Labianca vd., 2010). Dolaşımda büyüme hormonu ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) düzeylerinin yüksek olduğu akromegalide kansere yakalanma riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Brunicardi vd., 2010). Fiziksel aktivitenin rektum kanserinden ziyade kolon kanserinde daha fazla koruyuculuğunun olduğu bulunmuştur (Labianca vd., 2010).

2.2.3. Histopatoloji

Kolonda en sık rastlanan ve klinik açıdan en fazla önem taşıyan iki neoplastik oluşum kolon veya rektum mukozasından gelişen adenomatöz polipler ve adenokarsinomlardır. Ancak kolonda; anal karsinoma, lenfoma, leyomyosarkoma, malign karsinoid tümör ve kaposi sarkoması gibi başka tümörler de gelişebilmektedir. Prostat, over, uterus ve mide gibi komşu bölgelere ait tümörler de doğrudan yayılma yolu ile kolon

ve/veya rektumu tutabilir. KRK'in genel olarak makroskopik görüntüsü adenom veya yassı plak şeklindedir. Proksimal (sağ) kolondaki tümör görüntüsü polipoid ekzofitik kitle şeklinde olup, klinik olarak açıklanamayan demir eksikliği anemisi olarak ortaya çıkmaktadır. Distal (sol) kolondaki tümör görüntüsü lümeni çepeçevre saran tarzda olmaktadır (Beahrs & Sanfelippo, 1971). Sağ kolon ve sol kolon histolojik bulguları benzerdir.

2.2.4. Evrelendirme ve prognoz

KRK prognozu için evreleme ve tanı sistemi oldukça önemlidir. Bu nedenle ilk olarak patolog Dukes tarafından 1932'de bir tümör sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir. Bu sistem rektum kanseri için geliştirilmiş olsa da kolon kanseri için de kullanılmaktadır. Buna göre üç evre belirlenmiştir;

Evre A: Tümör bağırsak duvarında sınırlıdır

Evre B: Tümör bağırsak duvarını aşar

Evre C: Lenf nodu metastazı vardır (Akkoca vd., 2014)

Astler Coller, Dukes sistemine bir evre daha ekleyerek bir sistem geliştirmiştir (Walther, Johnstone & Swanton, 2009). Buna göre:

A: Mukozada sınırlı tümör

B1: Lenf nodu metastazı yok, muskularis propriaya kadar tümör tutulumu

B2: Lenf nodu metastazı yok, bağırsak duvarını aşan tümör tutulumu

C1: Lenf nodu metastazı var, bağırsak duvarını aşmayan tümör tutulumu

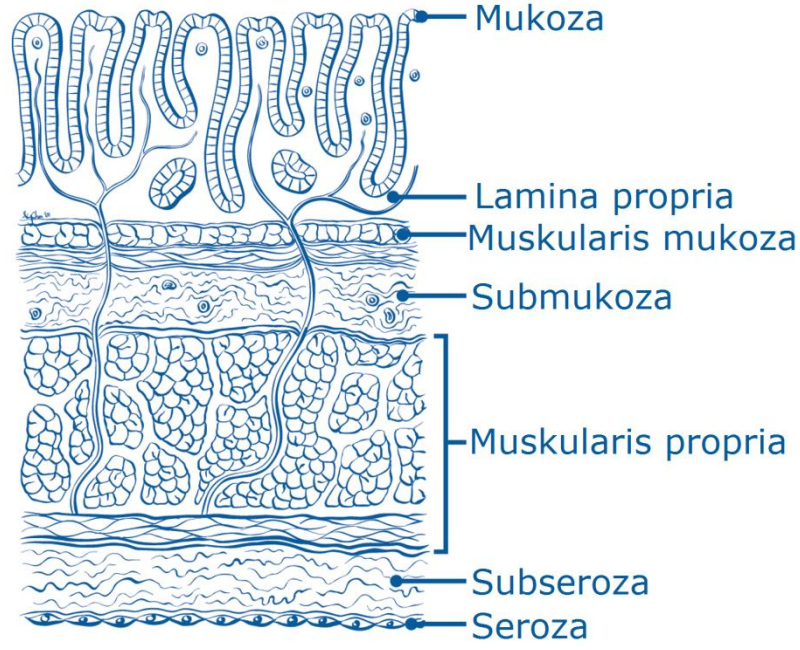
C2: Lenf nodu metastazı var, bağırsak duvarını aşan tümör tutulumu (Akkoca vd., 2014)

Günümüzde ise AJCC (American Joint Committee on Cancer) tarafından 1987'de geliştirilen bir sistem olan TNM (Tümör-Lenf nodu-Metastaz) sınıflandırma sistemi kullanılmaktadır. Bu sisteme göre Şekil 2.4'deki histolojik kesit göz önüne alınarak;

T: İnvazyon derinliği

N: Bölgesel lenf nodu dağılımı

M: Uzak organ metastazını ifade etmektedir.



Şekil 2.4: Kalın bağırsağın histolojik yapısı (American Joint Committee on Cancer, 2009).

TX: Primer tümör değerlendirilemiyor

T0: Primer tümör yok

Tis: Tümör intraepitelyal ya da lamina propria invazyonu

T1: Submukoza tutulumu

T2: Muskularis propriya tutulumu

T3: Tümör subserozaya veya peritonla kaplı olmayan perikolik veya perirektal dokulara geçmiş

T4a: Tümör visseral peritonun yüzeyine tutunmuş

T4b: Tümör doğrudan istila eder ya da diğer organ veya yapılara komşu

NX: Bölgesel lenf nodu değerlendirilemiyor

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: 1 -3 bölgesel lenf nodunda metastaz

N1a: Bir bölgesel lenf nodunda metastaz

N1b: 2-3 bölgesel lenf nodunda metastaz

N1c: Bölgesel lenf nodu metastazı olmayan, subseroza, mezenter ya da non peritoneal perikolik veya perirektal dokuda tümör

N2: 4 veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz

N2a: 4-6 bölgesel lenf nodunda metastaz

N2b: 7 veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz

MX: Uzak metastazın varlığı değerlendirilemiyor

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

M1a: Metastaz bir organ veya bölgede tanımlı

M1b: Birden fazla organ/bölge veya peritonda metastaz (American Joint Committee on Cancer, 2009).

Bugüne kadar yapılan sınıflandırma sistemleri ve bunlara göre tümörün evresinin karşılaştırılması Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Tümörün evresine karşılık gelen TNM, Dukes ve Astler-Coller sınıflandırma sistemlerinin karşılaştırılması (American Joint Committee on Cancer, 2009).

Evre	T	N	M	Dukes	Astler-Coller
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	T yok	N yok	M1a	-	-
IVB	T yok	N yok	M1b	-	-

2.2.5. KRK klinik bulguları

KRK tümörleri yavaş büyüyen neoplazmlardır ve bu nedenle erken teşhis edilmeleri zordur. Özellikle çekum ve sağ kolonda bulunan tümörlerin belirti vermesi uzun zaman almaktadır. Bu bölgedeki kanserlerin ilk bulgusu demir eksikliği anemisidir. Böyle durumlarda çabuk yorulma, halsizlik, çarpıntı, baş dönmesi ve angina pectoris gibi şikayetlerle kliniğe başvuran bir hastaya ilk önce anemi tedavisi uygulanmakta ve kanser tedavisi gecikmektedir. Hastalığın başlangıcında belirtiler asemptomatik ve aralıktır. Sol kolon tümörlerinde genellikle dışkılama alışkanlığında değişiklikler, kabızlık, bulantı, karında şişlik hissi, ağrı ve rektal kanama görülmektedir. Kolon kanserinin ileri evrelerinde halsizlik, kilo kaybı, iştahsızlık ve ateş şikayetleri ortaya çıkmaktadır. Kolon kanserlerinde sıkça görülen karaciğer metastazlarında sağ üst

kadranda ağrı ve sarılık görülürken akciğer metastazında öksürük ve nefes darlığı ortaya çıkmaktadır (Harford, 2006).

2.2.6. Tedavi yöntemleri

2.2.6.1. Cerrahi tedavi

KRK'da primer tedavi yöntemi cerrahi girişimlerdir. Hastaların %65'inde cerrahi operasyon uygulanmakta, %10'unda lokal yayılım nedeniyle tümör çıkarılamamaktadır. Hastaların %20'sinde ise cerrahi sırasında uzak metastaz saptanmaktadır. İleri derecede yaşlı olan hastalara cerrahi tedavi uygulanmamaktadır. Cerrahi tedaviye karar verilmesinde hastalığın doğru şekilde evrelendirilmesi önemli rol oynadığından ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme ve pozitron emisyon tomografisi görüntüleme sistemleri sıklıkla kullanılmaktadır (Bresailer, 2003).

Cerrahi girişimlerde tümörün alt ve üst sınırından en az 5 cm uzunluğunda bir bağırsak segmenti tümörle birlikte çıkarılmaktadır. Operasyon sırasında hastaların %10-25'inde karaciğer metastazı saptanmakta ve karaciğer cerrahi olarak uzaklaştırılmaktadır. Kolon kanserinde teşhis ve uygun tedavi sonrası 5 yıl yaşama oranı hastalığın evresine bağlı olmak üzere ortalama %50 civarındadır. Erken teşhis ve cerrahi bu oranı %80'e kadar yükseltebilmektedir (Bresailer, 2003).

2.2.6.2. Kemoterapi ve radyoterapi

Hastalarda neoadjuvan, adjuvan ve ileri evreler için uygulanan kemoterapi olmak üzere üç farklı şekilde kemoterapi uygulanmaktadır. Neoadjuvan kemoterapi radyoterapi ile birlikte uygulanmakta ve tümör boyutunu küçültmek için tercih edilmektedir. Adjuvan kemoterapi, cerrahi sonrasında ve lenf nodu tutulumu olan hastalara uygulanmaktadır. Adjuvan kemoterapi için 5-fluorourasil (5-FU) ve levamisol kombinasyonu kullanılmaktadır. Bu kombine tedavi Dukes C (Evre III) hastalarda %40 oranında hastalığın yeniden nüksetmesini, %33 oranında mortaliteyi azaltmaktadır. Dukes B (Evre II) hastalara adjuvan kemoterapi önerilmemektedir. İleri evre için uygulanan kemoterapide 5-FU ile 5-FU+Leucovorin (tetrahidrofolat)+ Oxaplatin kombinasyonları kullanılmaktadır. Ayrıca topoizomeraz inhibitörleri (irinotecan, camptotecin) de kullanılabilir. Son yıllarda VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) ve EGRF (epidermal büyüme faktörü)

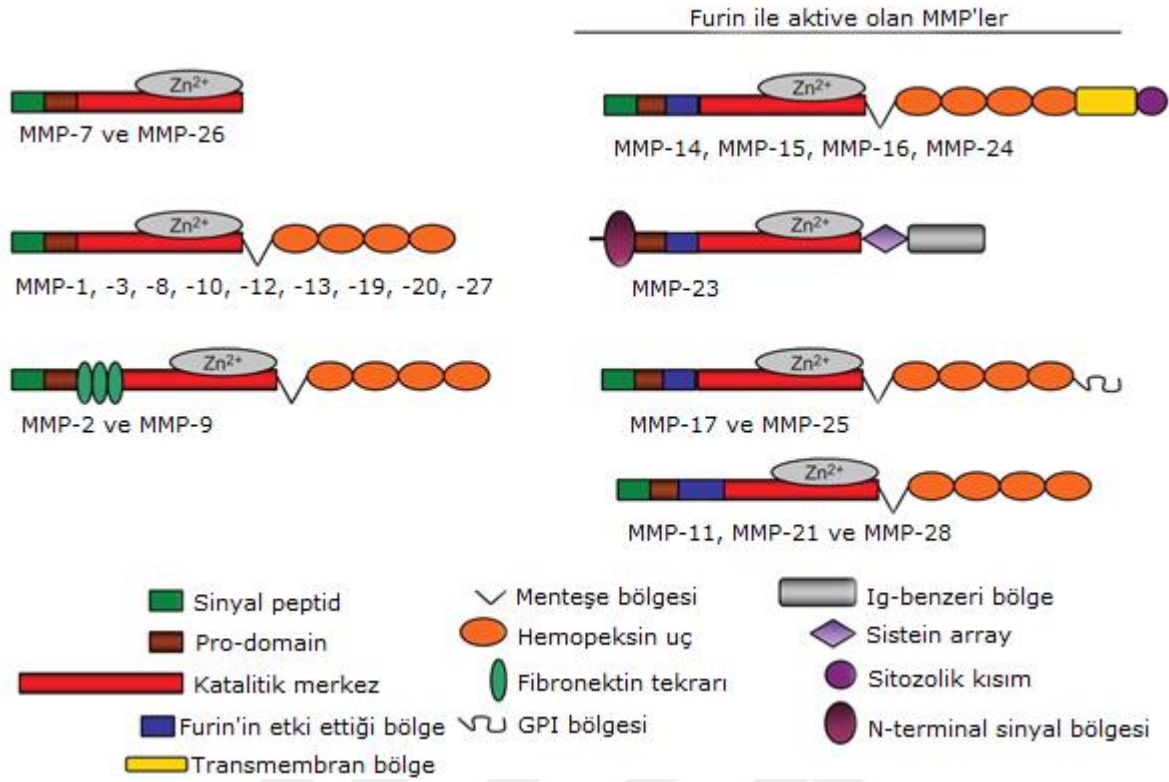
reseptörlerine karşı geliştirilmiş Bevacizumab ve Cetuximab monoklonal antikoları da kullanılmaktadır (Dobrucalı, 2003).

Radyoterapi özellikle rektum tümörlerinin tedavisinde tercih edilmektedir. Rektum tümöründe adjuvan kemoterapi ile birlikte postoperatif radyoterapi uygulaması II ve III. evre hastalarda kansere bağlı mortaliteyi %35 oranında azaltmaktadır (Dobrucalı, 2003).

2.3. KRK Gelişimi ve Yayılmasında Rol Oynayan Moleküller - Matriks Metalloproteinazlar

MMP'ler 1962 yılında keşfedilmişlerdir (Peng vd., 2012). ECM molekülleri, gelişim ve morfogenez sırasında gerekli hücrel çevreyi oluşturmak için önem teşkil etmektedir. MMP'ler (matrixin adı da verilmektedir) in vitro ve in vivo şartlarda intersitisyel ve bazal membran kollajenleri, proteoglikanlar, fibronektin ve laminin gibi ECM protein bileşenlerinin yıkımında görev alan proteinazlardır. Böylece embriyonik gelişim, doğum, büyüme ve yara iyileşmesi gibi bağ doku yenilenmesi süreçlerinde önemli rol oynarlar (Visse & Nagase, 2003, Bode vd., 1999). MMP'ler ile bunların inhibitörleri arasındaki dengenin bozulması inflamasyon, fibrozis, artrit, pulmoner hastalıklar ve kanser gibi çok sayıda patolojik olayla sonuçlanmaktadır (Peng vd., 2012; Bode vd., 1999).

MMP'ler kalsiyumla aktive olan ve çinko bağlayan endopeptidaz ailesinin bir üyesidir (Damodharan vd., 2011; Peng vd., 2012). Bunlar proteazların geniş bir ailesidir ve yapı, düzenlenme, fonksiyonları protezlara benzerdir. Tüm MMP enzimleri terminal hidrofobik sinyal dizilimi, prodomain bölgesi ve katalitik bölge olmak üzere 3 temel parçadan meydana gelmektedir (Peng vd., 2012). MMP proteinazlarında kollajenaz-1 (MMP-1) ile homoloji gösteren propeptiddeki sistein anahtar motifi PRCGXPD ile katalitik bölgede yer alan HEXGHXXGXXH çinko bağlama motifi ortak bir özelliktir. MMP-23'de sistein anahtar motifi bulunmaz fakat katalitik bölgenin aminoasit dizilimi MMP-1 ile benzerlik göstermektedir (Şekil 2.5) (Visse & Nagase, 2003).



Şekil 2.5: İnsanda tanımlanmış tüm MMP'lerin moleküler yapısı (Löffek, Schilling & Franzke, 2001).

Şimdiye kadar omurgalılarda 24, insanlarda 23 farklı MMP tanımlanmıştır (Visse & Nagase, 2003). Bunlar yapı ve substrat özgüllüklerine göre Tablo 2.2'deki gibi 6 büyük alt gruba ayrılmışlardır (Peng vd., 2012; Visse & Nagase, 2003):

1. Kollajenazlar
2. Jelatinazlar
3. Stromelisinler
4. Matrilisinler
5. Membran tip MMP'ler
6. Diğer MMP'ler (Peng vd., 2012; Visse & Nagase, 2003).

Tablo 2.2: MMP'lerin alt grupları, kromozom bölgeleri ve özgül substratları (Peng vd., 2012).

Alt grup	MMP	Kromozom bölgesi	Substratı
Kollajenazlar	MMP-1	11q22.3	Kollajen I, II, III, VII, VIII, X, Proteoglikanlar
	MMP-8	11q21	Kollajen I, II, III
	MMP-13	11q22.3	Kollajen I, II, III
	MMP-18	...	Kollajen I, II, III ve bazı büyüme faktörleri
Jelatinazlar	MMP-2	16q21	Jelatin, Kollajen IV,

Stromelisinler	MMP-9	20q11.2-13.1	V, VII, X, XI, Elastin, Fibronektin Jelatin, Kollajen IV, V, Elastin, Proteoglikan
	MMP-3	11q22.3	Laminin, Fibronektin, Elastin, Proteoglikanlar, Kollajen III, IV, V, VII, IX, X
	MMP-10	11q22.3	Fibronektin, Elastin, Jelatin, Kollajenler III, IV, V, IX, X
	MMP-11	22q11.2	Jelatin, Fibronektin, Proteoglikanlar
Matrilisinler	MMP-7	11q21-q22	Laminin, Fibronektin, Elastin, Kollajen IV, X
	MMP-26	11q21-q22	Laminin, Fibronektin, Elastin, Kollajen IV, X
	MMP-14	14q11-q12	Laminin, Fibronektin, Kollajen I, III, IV
Membran Tip MMP'ler	MMP-15	16q13-q21	Laminin, Fibronektin, Kollajen I, II, IV
	MMP-16	8q21-q22.1	Jelatin, Fibronektin, Kollajen III, IV
	MMP-24	12q24.33	Jelatin, Kollajen III, IV
	MMP-17	20q11.2	Bilinmiyor
Diğer MMP'ler	MMP-25	...	Bilinmiyor
	MMP-12	11q22.2-22.3	Laminin, Fibronektin, Elastin, Vitronektin, Kollajen IV
	MMP-19	12q14	Fibronektin, Jelatin, Kollajen IV
	MMP-20	11q22	Amelogenin
	MMP-21	1p36	Bilinmiyor
	MMP-22	1p36	Bilinmiyor
	MMP-23	1p36	Jelatin
	MMP-27	...	Bilinmiyor
MMP-28	...	Kazein	

2.3.1. MMP alt grupları

2.3.1.1. Kollajenazlar

Bu grupta MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18 (*Xenopus*'da) bulunmaktadır. En belirleyici özellikleri hücreler arası kollajenaz I, II ve III'ün N-terminal bölgelerini parçalama yeteneklerine sahip olmalarıdır.

Kollajenazlar aktivitelerine göre ECM ve non-ECM molekülleri olarak birbirlerinden ayrılabilirler (Visse & Nagase, 2003).

2.3.1.2. Jelatinazlar

Jelatinaz A (MMP-2) ve jelatinaz B (MMP-9) bu grupta yer alan enzimlerdir. Jelatinazlar, denatüre kollajen ve jelatinleri kolayca parçalamaktadırlar. Enzimlerin yapısı katalitik uca yerleşmiş tip II fibronektin bölgesinin üç kez tekrarlanmasıyla oluşmuştur. Bu yapısı sayesinde jelatin, kollajen ve laminine bağlanmaktadır. MMP-9 tip I, II ve III kollajenazı parçalamakta iken MMP-2'nin böyle bir fonksiyonu yoktur. İnsanda MMP-2 mutasyonu sonucu aktif enzimin kaybı, multisentrik osteolizisin otozomal çekinik formuna neden olmaktadır. Bu hastalık kemiklerin yıkımına neden olan, nadir rastlanan genetik bir bozukluktur. Yapılan çalışmalardan MMP-2'nin osteogenezde önemli rol oynadığı anlaşılmaktadır (Visse & Nagase, 2003).

2.3.1.3. Stromelisinler

Stromelisin 1 (MMP-3) ve stromelisin 2 (MMP-10) aynı substrat özgülüğüne sahiptir ancak MMP-3'ün proteolitik etkisi MMP-10'dan yüksektir. ECM bileşenlerinin sindirilmesinin yanı sıra MMP-3, pro-MMP'leri aktive etmektedir. MMP-3'ün bu aktivitesi proMMP-1'in tamamen aktif MMP-1'e dönüşmesi için oldukça kritik öneme sahiptir (Visse & Nagase, 2003). Bu özellikleri nedeniyle kollajenaz aktive edici protein de denmektedir (Woessner, 2002).

MMP-11, stromelisin 3 olarak adlandırılmaktadır ancak dizilim ve substrat özgülüğü MMP-3'den farklılık gösterdiğinden, diğer MMP'ler grubunda değerlendirilmiştir (Visse & Nagase, 2003).

2.3.1.4. Matrilisinler

Matrilisinler, hemopeksin bölgelerinin olmamasıyla karakterizedirler. Bu grupta endometaz olarak da adlandırılan matrilisin 1 (MMP-7) ve matrilisin 2 (MMP-26) bulunmaktadır. ECM bileşenlerinin yanı sıra MMP-7 pro- α -defensin, Fas-ligand, tümör nekroz faktör (TNF)- α ve E-kaderin gibi hücre yüzey moleküllerinde de etkinliğini göstermektedir. Matrilisin 2 ise çok sayıda ECM moleküllerinin sindiriminde görev almaktadır (Visse & Nagase, 2003).

2.3.1.5. Membran Tip MMP'ler

Membran tip MMP (MT-MMP)'ler 6 adettir, bunların dördü tip I transmembran proteinler (MMP-14, MMP-15, MMP-16 ve MMP-24), ikisi membrana tutunmuş glikozil fosfatidil inozitol (GPI) proteinler (MMP-17 ve MMP-25)'dir. MMP-24 hariç diğer tüm MT-MMP'ler, pro-MMP-2'yi aktive etme yeteneğine sahiptirler. Bu enzimler çok sayıda ECM molekülünü parçalayabilirler. MT1-MMP (MMP-14) tip I, II ve III kollajen üzerinde yıkıcı etki göstermekte ve anjiyogenezde önemli rol oynamaktadır. MT5-MMP (MMP-17) beyne özeldir ve serebellumdan ifadelenmektedir. MT6-MMP (MMP-25) neredeyse yalnızca periferel kan lökositlerinden, astrositomalardan ve glioblastomalardan ifadelenmekte, ancak meningiomalardan ifadelenmemektedir (Visse & Nagase, 2003).

2.3.1.6. Diğer MMP'ler

Yapılan sınıflandırmalarda 7 adet MMP (MMP-11, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-23, MMP-28) hiçbir sınıfa dahil edilememiş ve bu grup altında incelenmiştir (Hansen vd., 1993).

MMP-11 mRNA'sının meme tümörü hücreleri tarafından ifadelendiği bilinmektedir (Hansen vd., 1993). MMP-12 makrofajlardan salınır ve elastin gibi proteinlerin yıkımından sorumludur. MMP-19 karaciğerden klonlanmış cDNA ve romatoid artritli hastalarda T hücre türevli otoantijen olarak tanımlanmıştır. MMP-20 diş enamelinin içinde bulunmaktadır ve amelogenini sindirmektedir. İlk kez tavuk fibroblastlarında klonlanan MMP-22, insanlardaki formuyla homoloji göstermektedir ancak fonksiyonu bilinmemektedir. MMP-23 (sistein array MMP) üreme dokularından ifadelenmektedir. Propeptidde bulunan furin tanıma motifinin golgide enzimin bölünmesini ve hücre dışına aktif olarak salınmasını sağladığı bilinmektedir. MMP ailesine en son eklenen üye episilin (MMP-28)'dir. Bu enzim keratinositlerden ifadelenmektedir. Doku hemostazında ve yara iyileşmesinde görevli olabileceği düşünülmüştür (Visse & Nagase, 2003).

2.3.2. MMP'lerin üç boyutlu yapısı

1994 yılından beri X-ray kristallografi ve nükleer manyetik rezonans teknikleri kullanılarak bir çok MMP'nin üç boyutlu yapısı araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda MMP'lerin yapısal olarak benzer temel iskelete sahip oldukları görülmüştür. Tüm MMP'ler yaklaşık 20 aminoasitlik bir sinyal peptidi olarak sentezlenmekte ve latent pro-form olarak salınmaktadır. Bu pro-proteinazlar 80 aminoasitlik N-terminal pro-domain ve bunu takip

eden 170 aminoasitlik katalitik uçtan meydana gelmektedir. Katalitik uç, 10-70 aminoasitlik bağlayıcıyla C-terminal hemopeksin benzeri 195 aminoasitlik uca bağlanmaktadır (Bode vd., 1999).

MMP-2, MMP-3 ve MMP-9'un predomain yapısı 3 α -heliks ve bir bağlantı halkasından meydana gelmektedir. Heliks 1 ve 2 arasındaki halka proteaza duyarlı bir bölgedir. Heliks 3'den sonra uzayan peptid bölgesi katalitik bölgenin substrat bağlama alanında bulunmaktadır (Visse & Nagase, 2003).

Katalitik bölgeyi oluşturan zincir beş parçalı iplikçik, 3 α -heliks ve bağlayıcı bir halkadan meydana gelmiştir. Proteinaz aktivitesi gösteren bu bölge bir katalitik çinko, bir yapısal çinko ve genelde 3 kalsiyum iyonu içermektedir. Substrat bağlama bölgesi IV. iplikçik bölgesi, β heliks ve bunun devamında genişlemiş bir halka bölgesinden meydana gelmektedir. Histidinler aktif çinko bölgesini koordine etmektedir. İlk histidin komşuluğunda bulunan glutamik asit katalitik aktivite için gereklidir. Katalitik bölgede N- ve C- terminal alanlara göre soldan sağa doğru substrat bağlanmakta ve peptid bağındaki karbonil grubu ile aktif çinko bölgesi koordine hale gelmektedir. Böylece katalitik çinkonun ligandı olan su uzaklaştırılmaktadır. Yer değiştiren su molekülünden 1 proton koparmak için bir temel oluşması sebebiyle glutamatın karboksi grubu peptid hidrolizini desteklemektedir. Böylece peptid bağındaki karbonil karbonundaki suya nükleofilik atak kolaylaşmış olur (Visse & Nagase, 2003).

Aktif çinko bölgesinin sağında S1 cebi veya özgüllük cebi olarak adlandırılan cep, bölünmeden sonra yeni N-terminal bölgenin oluşmasını sağlayan substrat kalıntısının yan zincirini barındırmaktadır. S1 cebinin boyutu MMP'nin türüne göre değişiklik göstermektedir ve substrat özgüllüğünün birincil belirleyici faktörü olarak kabul edilmektedir (Visse & Nagase, 2003).

MMP-2 ve MMP-9'un fibronektin tip II'nin üç kez ard arda eklenmesiyle oluşan bölgesi, beşinci β -ipliği ile katalitik bölge heliksi arasında bulunmaktadır. Her bir fibronektin bölgesi iki antiparalel β iplikçiğinden oluşmakta ve α -heliks ile bağlanarak, iki disülfid bağıyla stabilize olmaktadır. Nükleer manyetik rezonans çalışmaları 2 ve 3. bölgelerin esnek bir yapıda olduğunu ve ECM'de birçok bölge ile etkileşime girebileceğini göstermiştir (Visse & Nagase, 2003). Bu bölgenin, enzimin aktiflik kazanmasını düzenleyen bir görevi olduğu bilinmektedir (Peng vd., 2012).

Hemopeksin bölgesi I ile IV kanatları arasında stabilize edici tek disülfid bağıyla 4 parçalı bir yapıya sahiptir. MMP-9'un hemopeksin bölgesi TIMP-1'in C-terminaline bağlanmaktadır. TIMP-2, proMMP-2'nin

hemopeksin bölgesine bağlanmakta ve hemopeksinin III ve IV. kanatları ile TIMP-2'nin C terminali arasında oluşan etkileşimle kristal yapıda bir kompleks oluşturmaktadır. TIMP-2'nin N-terminali diğer MMP'ler ile etkileşime girmek üzere serbest halde bulunmaktadır (Visse & Nagase, 2003).

Çok sayıda parçadan meydana gelen β -bölgesi heteromerik G proteinleri, klatriin, integrinlerin α -alt üniteleri gibi diğer proteinlerde de bulunmaktadır. Bu bölge protein-protein etkileşimine sıkça aracılık etmektedir (Visse & Nagase, 2003). MMP-7 ve MMP-22 hariç diğer MMP'lere spesifik olarak hemopeksin benzeri bölge substrat özgüllüğünde önem taşımaktadır (Peng vd., 2012). Ayrıca pro-MMP-2'nin aktivasyonu ve MT1-MMP ile MMP-9'un dimerizasyonu için de gereklidir (Visse & Nagase, 2003).

2.3.3. *proMMP'lerin aktivasyonu*

MMP'ler proteinazlar veya tiyol-modifiye edici ajanlar, oksidize glutasyon, SDS (sodyum dodesil sülfat), kaotropik ajanlar, reaktif oksijenler gibi kimyasallar tarafından in vitro olarak aktive edilebilmektedirler. Düşük pH ve sıcaklık uygulamaları da aktivasyona neden olabilmektedir. Bu ajanlar çoğunlukla sistein anahtar motifinin sistein-çinko etkileşimini bozarak etkinliklerini göstermektedirler (Visse & Nagase, 2003).

Latent pro-MMP'lerin proteolitik aktivasyonu farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleşebilmektedir. Bu aktivasyon plazmin, furin gibi araçlarla veya daha önce aktif hale gelmiş bir MMP'nin başka bir proMMP aktivasyonuna katkı sağlamasıyla gerçekleşebilmektedir (Wang, Juttermann & Soloway, 2000).

Plazminojen ile aktivasyon membranda lokalize proMMP aktivasyonunu gerçekleştirmektedir. proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 ve proMMP-13 plazmin ile aktive olan enzimlerdendir (Visse & Nagase, 2003).

Furin ile aktivasyon mekanizması hücre içi bölgede gerçekleşmektedir (Visse & Nagase, 2003). Pei ve Weiss ilk kez proMMP-11'in furin tarafından hücre içi alanda aktive edildiğini göstermişlerdir (Pei & Weiss, 1995).

proMMP-2'nin aktivasyonu hücre yüzeyinde ve MT-MMP'lerin aracılığıyla gerçekleşmektedir (Visse & Nagase, 2003). MT1-MMP'nin proMMP-2 aktivasyonuna TIMP-2 de aracılık etmektedir (Wang vd., 2000).

2.3.4. MMP'lerin substrat özgüllükleri

MMP'ler genelde lösin, izolösin, metiyonin, fenilalanin veya tirozin gibi hidrofobik yan zincirli bir kalıntıdan önceki peptid bağınyı yıkmaktadırlar. Hidrofobik kalıntılar S1 özgüllük cebine uygunluk göstermektedir. S1 cebi MMP'ler arasında şekil ve büyüklük açısından önemli ölçüde farklılık göstermektedir. S1 cebine ilaveten diğler substrat bağlanma alt üniteleri de enzimin substrat özgüllüğünde görev almaktadır (Visse & Nagase, 2003).

Bazı durumlarda non-katalitik uçlar, özellikle ECM'nin geniş, uzatılmış makromoleküllerine karşı enzimin aktivitesini etkilemektedir. Örneğin; MMP-2 ve MMP-9'un fibronektin uçları tip IV kollajen, jelatin ve elastindeki enzim aktiviteleri için önem taşımaktadır (Visse & Nagase, 2003).

2.3.5. MMP aktivitesinin biyolojik etkileri

MMP'ler, matriksin yıkılması ve yeniden oluşması süreçlerini içeren normal ve patolojik koşullarla ilişkilidir. Örneğin; MMP'ler mensturasyon sırasında endometriyumda, meme, uterus ve prostat gibi üreme dokularında yüksek oranda ifadelenmektedirler. Kemik ve kıkırdak hasarında bağ doku gelişimine katkı sağlamaktadırlar. Birçok MMP yara iyileşmesinde ifade edilmektedir. Periodontit, romatoid artrit, makuler dejenerasyon ve tümör hücre invazyonu gibi doku yıkımının görüldüğü patolojik durumlara MMP ailesinin üyeleri aracılık etmektedir (McCawley & Matrisian, 2001).

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki her bir MMP ailesi üyesinin biyolojik sistemdeki rolü farklılık göstermektedir ve bu faaliyetler oldukça karmaşıktır. Ayrıca MMP aktivitesinin patolojik koşullara da yol açması fonksiyonlarının anlaşılmasını zorlaştırmaktadır.

2.3.6. MMP'lerin düzenlenmesi

MMP'lerin düzenlenmesi gen transkripsiyonu, zimojenlerin posttranslasyonel aktivasyonu ve endojen inhibisyonu gibi çeşitli aşamalarda meydana gelmektedir (Peng vd., 2012).

İnterlökinler (IL) ve TNF gibi sitokinler, değıştirici büyüme faktörü (TGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve EGRF gibi büyüme faktörleri, hormonlar, steroidler, onkojenik hücresel transformasyonlar gibi birçok düzenleyici faktör MMP'lerin gen ifadelenmesinde, transkripsiyon düzeyinde işe karışmaktadır. IL-1, IL-12, EGRF, PDGF ve TNF; MMP'lerin ifadelenmesini artırırken, TGF, hormonlar ve steroidler

azaltabilmektedirler. MMP'lerin düzenlenme mekanizmaları hücre tipine ve MMP'nin çeşidine göre çeşitli yollarla uyarılmaktadır. Ayrıca gen düzenleyici DNA elementlerinde SNP (tek nükleotid polimorfizmi)'ler de MMP'lerin transkripsiyonunu etkileyebilir (Peng vd., 2012).

Tüm MMP'ler latent zimojenler olarak inaktif formda sentezlenmekte ve salınmaktadır. Daha sonra 10 kDa'luk bir propeptidin hücre dışı ya da hücre membranında kaybedilmesiyle aktive olmaktadır. Bunun yanı sıra yüksek oranda korunan propeptid ucundaki sistein kalıntısı katalitik uçtaki çinko atomuna bağlanabilmekte ve böylece enzim inaktif hale dönüşebilmektedir (Peng vd., 2012).

MMP'lerin aktivasyonu; endojen inhibitörlerle yapısal olarak ilişkili bir grup olan TIMP'ler tarafından da düzenlenmektedir. TIMP'ler ekstrasellüler alanda MMP'lerin aktif formuna 1:1 oranında non-kovalent bağlanarak MMP'lerin aktivitesini inhibe etmektedir (Visse & Nagase, 2003). Aktif MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki dinamik eşitlik proliferasyon, migrasyon, adezyon ve apoptoz gibi farklı hücresel süreçler için önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra TIMP'ler fizyolojik süreçte ECM birikimi ile yıkımı arasındaki dengenin sürdürülmesinde kritik öneme sahiptir. Aktiviteleri PDGF ve TGF β tarafından arttırılmaktadır. Bunun yanı sıra farklı IL düzeyleri TIMP aktivitesini arttırabilmekte veya azaltabilmektedir (Peng vd., 2012). TIMP ifadenmesi gelişim ve doku yeniden şekillenmesi sırasında düzenlenmektedir. Değişen MMP aktivitesiyle ilişkili patolojik koşullar altında TIMP düzeyi de değişebilmektedir, çünkü TIMP, MMP aktivitesini doğrudan etkilemektedir (Visse & Nagase, 2003).

MMP'lerin inhibisyonundan sorumlu başka endojen proteinler de tanımlanmıştır. α 2-makroglobulin, 772 kDa moleküler ağırlığa sahip bir plazma proteazdır. Esas olarak karaciğerde hepatositlerden salınmaktadır ancak makrofajlar gibi diğer hücre tiplerinin de α 2-makroglobulini ürettiği bilinmektedir. Bazı TIMP'ler plazmada bulunsa da MMP'lerin ana plazma inhibitörleri α 2-makroglobulinlerdir (Baker vd., 2002).

Kazal motifli sistein açısından zengin proteini tetikleyen reversiyon (RECK), 110 kDa moleküler ağırlığa sahip bir glikoproteindir. Glikoprotein-serin-proteaz inhibitör benzeri bir bölge içerir ve GPI aracılığıyla hücre membranıyla bağlantılıdır. RECK yaygın olarak insan dokularından ifadenmektedir. Bazı hücre hatlarında aşırı ifadenmesi posttranslasyonel düzeyde MMP-9'un azalmasına neden olmaktadır. RECK MMP-2, MMP-9 ve MT1-MMP'nin çözülebilir formunun zayıf inhibitörüdür (Baker vd., 2002).

2.4. TIMP'ler

Memelilerde TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 olmak üzere 4 tane TIMP tanımlanmıştır. Bunlar birçok temel benzerliğe sahip olmakla birlikte yapısal ve biyokimyasal özellikleri ile ifadenme kalıpları birbirlerinden farklılık göstermektedir. Her bir TIMP'in in vivo şartlarda özel göreve sahip olduğu düşünülmektedir (Baker vd., 2002). Bunlar 21-29 kDa moleküler ağırlığa sahip değişken şekilde glikozillenmiş proteinlerdir. 6 disülfid bağ ve 125 aminoasitlik N-terminal bölge ile 65 aminoasitlik C-alt bölgeden oluşmaktadırlar. C-alt bölgesi MMP'ler ile etkileşimde rol oynasa da biyolojik fonksiyonların çoğu N-terminal bölgesi ile gerçekleşmektedir (Baker vd., 2002; Visse & Nagase, 2003).

TIMP'ler hücre dışı alana salınan proteinler olsa da membrana bağlı proteinler ile ilişkili olarak hücre yüzeyinde de bulunabilmektedirler. Örneğin; TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4, MMP-14'e bağlanabilmektedir. TIMP-3 heparin sülfat içeren proteoglikanlara ve kondroitin sülfat içeren proteoglikanlara bağlanarak ECM'ye tutunmaktadır. TIMP'lerin tamamı aktif MMP'leri inhibe etmekte ve bağlanmaları pikomolar düzeyde meydana gelmektedir (Baker vd., 2002).

2.4.1 TIMP'lerin alt grupları

2.4.1.1. TIMP-1

28,5 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. Yapılan çalışmalar, TIMP-1 ile transfekte edilen malignant hücrelerde in vitro şartlarda invazyon ve migrasyonun baskılanabileceğini göstermiştir. Deneysel sistemlerde TIMP-1'in tümörün uyardığı anjiyojenezi inhibe ettiği ve anjiyojenik faktörlere, fibroblast büyüme faktörü (FGF)'ne ve adipositlerin kullandığı besiyerine karşı endotelial hücre yanıtını baskıladığı gösterilmiştir. Bu etkiler TIMP-1'in in vivo şartlarda endotelial hücre göçünü inhibe ettiğini göstermektedir (Praga, Dickson & Hawkins, 1997).

2.4.1.2. TIMP-2

TIMP-1 ile neredeyse %40 benzerlik göstermektedir ancak TIMP-2 glikozillenmemiş bir proteindir. Moleküler ağırlığı yaklaşık 21 kDa'dur. Özellikle MMP-1, MMP-2 ve MMP-9 aktivitesini azaltmaktadır. Genetik müdahale yoluyla MMP ve TIMP-2 dengesinin değiştirilmesi sadece ECM proteolizini değil, aynı zamanda hücrenin ECM'ye tutunmasını ve matriks

bileşenleri vasıtasıyla hücrenin hareketini de düzenlemektedir (Praga vd., 1997).

2.4.1.3. TIMP-3

TIMP-3, TIMP-1 ve TIMP-2 ile benzer aminoasit dizilimine sahiptir. TIMP-3 kültür ortamındaki birçok insan hücresi ECM'sinde bulunmaktadır. Moleküler ağırlığı yaklaşık 24-25 kDa'dur. TIMP-3 sağlıklı böbrek, akciğer, beyin dokusunda bol miktarda bulunmakta, ancak kemik dokusunda düşük düzeyde ifade edilmektedir. Buna göre TIMP-3'ün yeniden şekillenme uyarılarına yanıt olarak dokuya özgü bir şekilde işlev gördüğü anlaşılmaktadır (Praga vd., 1997).

2.4.1.4. TIMP-4

İnsanlarda bulunan TIMP-4 glikozillenmemiş, 195 aminoasit uzunluğunda bir polipeptiddir. TIMP-4 ve TIMP-2 aminoasit düzeyinde %51 oranında benzerlik göstermektedir. 3 boyutlu yapısı belirlenmemiş olsa da diğer TIMP'ler ile sekans benzerliğine sahip olduğu bilinmektedir. MMP ailesinin üyelerinden MMP-26'ya ilgisi yüksek olmasına rağmen MT1-MMP inhibitörü ve MMP-2 aktivitesinin düzenleyicisidir. Trombositlerde majör MMP inhibitörüdür (Zajgla, Pozo, Cabellos & Maldonado, 2008).

2.4.2. TIMP'lerin biyolojik fonksiyonu

MMP inhibisyonunun yanı sıra TIMP'ler başka biyolojik fonksiyonlara da sahiptir. TIMP-1 ve TIMP-2 eritroid güçlendirici etkiye sahiptir ve hücre büyümesini teşvik eden etkiler göstermektedir. Zhao ve ark. fibroblast nükleusunda TIMP-1 bulmuşlar (Zhao vd., 1998); Ritter ve ark. ise TIMP-1'in MCF-7 meme karsinoma hücrelerinin yüzeyine bağlandığını ve sonra nükleusa taşındığını göstermişlerdir (Ritter, Garfield & Thorgeirsson, 1999). Nefron morfogenezi sırasında TIMP-2 metanefrik mezenşimal büyümede ve üreter morfogenezinde rol oynamaktadır ve bu MMP inhibisyonundan bağımsız olarak gerçekleşmektedir. TIMP-1, TIMP-2 ve TIMP-3'ün aşırı ifadelenmesi tümör büyümesini azaltmaktadır. TIMP-2, FGF'yi uyararak endotel hücre büyümesini inhibe etmektedir. Bu TIMP fonksiyonları da MMP inhibisyonundan bağımsız olarak gerçekleşmekte ancak etki mekanizmaları hala araştırılmaktadır (Visse & Nagase, 2003).

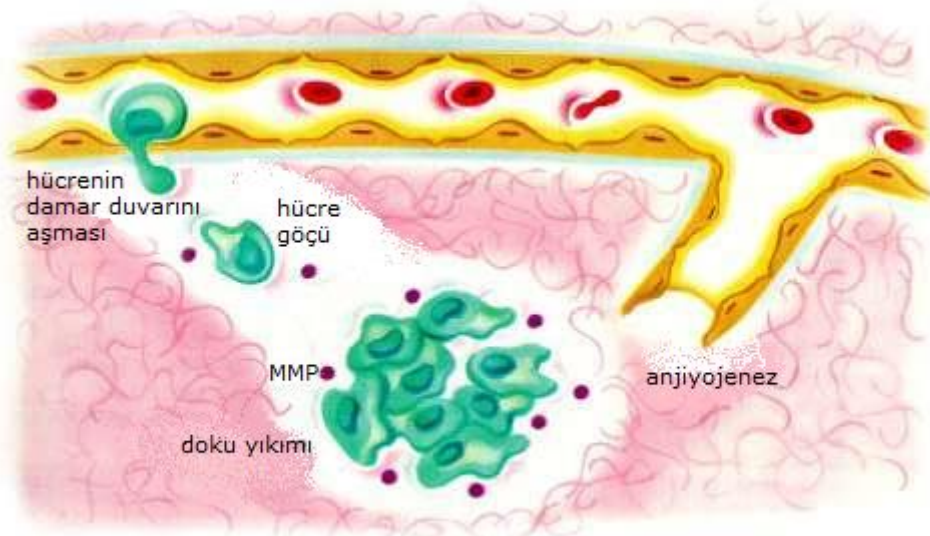
TIMP-3 bazı tümör hücrelerinde proapoptotik etkiye sahipken TIMP-1 ve TIMP-2 antiapoptotik aktivite göstermektedir (Visse & Nagase, 2003). TIMP-4 meme, ovaryum, servikal, prostat, beyin, kolon, endometriyum ve

papillar renal tümörlerde yüksek; pankreas ve CCRC (clear cell renal cancer) gibi tümörlerde düşük düzeyde bulunmaktadır (Zajgla vd., 2008).

2.5. Kanserde MMP ve TIMP'in Rolü

Tümörün migrasyon ve invazyonunda önemli rol oynadığı bilinen MMP'ler anjiyojenez ve metastaz sırasında çok basamaklı bir süreçte katılırlar. Anjiyojenez mikrovasküler endotelyum, subendotelyal bazal membran ve perivasküler stroma arasındaki etkileşim kaskadıyla meydana gelmektedir. Tümör hücrelerinden büyüme faktörünün salınımı, endotelyal yanıtı tetiklemekte ve tümör gelişimindeki neoanjiyojenezi uyarmaktadır. Göç eden endotelyal hücreler MMP üretmektedir. Üretilen bu MMP'ler ECM'nin ve bazal membranın yıkımına neden olmaktadır (Praga vd., 1997).

Metastazda primer tümörden ayrılan tümör hücrelerinin kan damarı içine girmesi, dolaşımında kalabilmesi, doğru mikroçevreyi yakalayabilmesi ve kapiller endoteline adezyonu gerekmektedir. Tümör hücrelerinin ECM bariyerine invazyonu için öncelikle subendotelyal matrikse bağlanmaları gerekmektedir. Matrikste MMP'ler aracılığıyla proteolitik bozuklukların oluşması ve hücrelerin bu defekt boyunca göçü ile metastaz gerçekleşmektedir. Hedef bölgeye ulaşan hücreler burada hızlıca bölünebilmekte, anjiyojenik ve immün-baskılayıcı faktörler üreterek ECM'in sindirilmesini sağlamaktadır (Şekil 2.6) (Praga vd., 1997). Yapılan çalışmalar, özellikle jelatinazların (MMP-2 ve MMP-9) kolon karsinoma metastazı sürecinde ECM yıkımına neden olan proteolitik kaskada rol oynadığını göstermiştir (Sang-Oh, Soo-Jin, Chang-Hyun & An-Sik, 2003).



Şekil 2.6: Bir tümör hücrelerinin damar duvarını aşması, göçü ve MMP'ler aracılığıyla ECM'nin yıkımı sonucu tümörün gelişmesi (Opdenakker & Damme, 1992).

Birçok çalışma, MMP-TIMP ifadenme düzeyinin tümör derecesi ve tipiyle bağlantılı olduğunu vurgulamaktadır. Farklı kanser türleri için bu ilişki çeşitlilik gösterse de kanser tedavisinde MMP inhibisyonunun potansiyel iyileştirici rolü birçok çalışmaya konu olmuş ve TIMP tarafından MMP inhibisyonunun hem tümör büyümesini hem de lokal invazyonu baskıladığı görülmüştür (Baker vd., 2002). MMP ve TIMP düzeyinin araştırılmasını amaçlayan kanser çalışmalarında, NO'nun MMP ile bağlantılı olduğu bulunmuştur.

NO, tümör kan akımını düzenleyerek ve tümörü çevreleyen damarların vazodilate tonusunu koruyarak tümör büyümesine katkı sağlamakta, ayrıca anjiyojenezi de uyarmaktadır. NO vasküler geçirgenliği arttırarak ve MMP'leri uyararak metastaza imkan sağlamaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinden salınan NO'nun, tümör hücrelerinin metastazını ve immün sistemden kaçmalarını kolaylaştırarak bağışıklık yanıtını bozduğu kanıtlanmıştır (Ziche & Morbidelli, 2009).

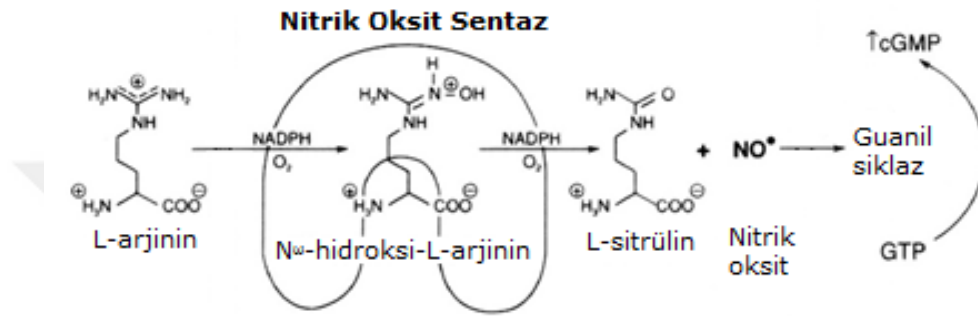
İnsan kolon kanser hücresiyle yapılan bir araştırmada NO'nun MMP-2 ve MMP-9'u arttırarak tümör gelişimine katkı sağladığı bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada NO ile MMP-2, MMP-9 artışını baskılayan bir ajan olan emodin kullanılmış ve sonuçta NO'nun uyardığı tümör gelişiminin önüne geçilebilmiştir (Damodharan vd., 2011).

2.6. Nitrik Oksit (NO)

NO'nun keşfi ile ilgili ilk bilgiler 1847 yılında nitrogliserini keşfeden İtalyan bilim adamı Ascanio Sobrero'nun çalışmaları ile ortaya çıkmıştır. 19. yy'da Avrupa'nın kimyacıları ve farmakologları nitrogliserinin vazodilatör özelliğini keşfetmişler ve anjina pektorisin etkilerini hafifletmek için kullanmışlardır. 1970'lerin ortalarında yapılan çalışmalar nitrogliserinin ve NO'nun çözülebilir guanil siklaz (sGC)'i aktive edebildiğini ve cGMP üretimine katıldıklarını göstermişlerdir. Bu dönemde NO ve endotel türevli gevşetici faktör (EDRF) arasında bir bağlantı kurulamamıştır. Ancak 1980'lerin sonuna doğru EDRF'nin aslında NO olduğu ve vasküler dokuda L-arjinin-NO-cGMP yolağı üzerinden etkinlik gösterdiği bulunmuştur (Ruiz vd., 2011). Robert Furchgott, Louis Ignarro ve Ferid Murad 1998 yılında kardiyovasküler sistemde bir sinyal molekül olarak NO ile ilgili keşifleri sayesinde Nobel Tıp ödülüne layık görülmüşlerdir. Böylece NO ve buna bağlı mekanizmalarla ilgili yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Francis vd., 2010).

NO, bir nitrojen ve bir oksijen atomundan oluşan küçük, gaz yapıda bir moleküldür. Yarılanma ömrü birkaç saniye olmasına rağmen birçok biyolojik fonksiyona sahiptir (Francis vd., 2010). NOS'lar L-arjinden

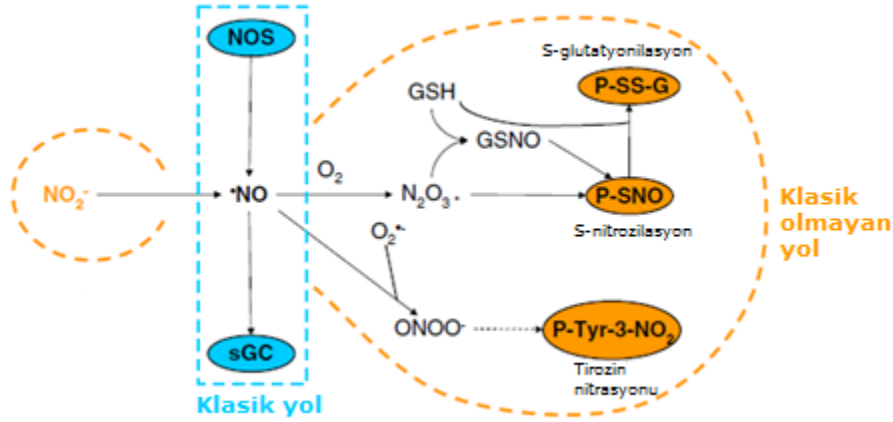
nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve moleküler oksijen varlığında L-sitrülin ve NO üretirler. Üretim aşaması, L-arjinin'in hidroksillenmesi ile N^ω-hidroksi-L-arjinin ara ürünü oluşmasını ve bunun da okside olarak NO ve L-sitrülin'e dönüşmesini içeren iki basamaklı bir reaksiyondur. Bu monooksijenasyon reaksiyonu için gerekli olan elektronlar NADPH'dan karşılanmaktadır (Şekil 2.7). İkinci basamağın kofaktörü olan tetrahidrobiopterin, reaksiyonu hızlandırmaktadır. Üretilen NO, hücre içinde bazı etkiler meydana getirebilmek için cGMP bağımlı veya cGMP bağımsız yolağı kullanmaktadır (Şekil 2.8) (Ruiz vd., 2011).



Şekil 2.7: İki basamaklı bir reaksiyon sonucunda L-arjininden NO'nun sentezlenmesi (Natanson, Hoffman, Suffredini, Eichacker & Danner, 1994).

Guanozin trifosfat (GTP)'tan cGMP üretimine aracılık eden sGC, NO için en duyarlı reseptördür. Bu proteinin α_1 , α_2 ve β_1 alt üniteleri tanımlanmıştır. Fonksiyonel bir reseptör, bir α ve bir β alt ünitesinden oluşmaktadır. sGC reseptöründe hemoglobindeki O₂'yi bağlayan hem grubu bulunur ancak NO'ya on bin kat fazla ilgi ile bağlanmaktadır. NO, sGC'a bağlandığında enzim yapısal değişikliğe uğrayarak GTP'den cGMP üretilmesini sağlamaktadır. Oluşan cGMP iki farklı yol üzerinden etki göstermektedir. Birinci yol, cGMP ile aktive olan protein kinazlar (PKG) üzerinden ilerlemektedir. Böylece dolaylı olarak efektör proteinlerin fosforilasyon düzeyleri değiştirilmektedir. İkinci yolda cGMP dögüsel nükleotid kapılı kanala (CNG) veya hiperpolarizasyonla aktive olan, nükleotidle modüle olan kanala bağlanarak etkinlik göstermektedir (Hardingham, Dacthler & Fox, 2013). cGMP'nin aracılık ettiği NO fonksiyonlarına örnek olarak; vasküler ve gastrointestinal düz kas gevşemesi, trombosit agregasyonunun baskılanması, kardiyak hipertrofinin azaltılması, kalbi iskemi/reperfüzyon hasarından koruma ve bilişsel fonksiyonlar verilebilir (Francis vd., 2010). İkinci yol ise cGMP'den bağımsız olan yoldur ve posttranslasyonel protein modifikasyonu reaksiyonlarını içermektedir. Bu yol birçok yayında klasik olmayan yolak

olarak da adlandırılmaktadır. NO'nun uyardığı posttranslasyonel modifikasyonlar S-nitrozilasyon, S-glutatyonyonilasyon ve tirozin nitrasyonudur (Ruiz vd., 2011).



Şekil 2.8: NO'nun biyolojik sistemlerde kullandığı klasik ve klasik olmayan yolları (Ruiz vd., 2011).

S-nitrozilasyon klasik olmayan NO sinyal mekanizmasının ana reaksiyonudur. Bir sistein kalıntısında nitrozotiyol (R-S-N=O) oluşumu meydana gelmekte ve bu da birçok proteinin fonksiyonunda değişime yol açmaktadır (Martinez-Ruiz vd., 2013). İyon kanallarında, reseptörlerde, enzimlerde, transkripsiyon faktörlerinde ve G proteinlerinde S-nitrozilasyona olanak sağlayan motif bulunmaktadır (Stamler & Meissner, 2001). S-nitrozilasyon, geri dönüşümlü bir reaksiyondur. cGMP-bağımlı yolağa göre daha kısa sürede etkisini göstermektedir. Yüksek NO konsantrasyonlarında bu reaksiyon gerçekleşmektedir (Ruiz vd., 2011).

S-glutatyonyonilasyon, düşük moleküler ağırlığa sahip bir tiyol ile sistein kalıntısı arasında karışık disülfid bağının oluşumu yoluyla bir proteine tiyolün eklenmesini ifade eden redoks sinyal mekanizmasıdır. Bu mekanizma NO ve/veya radikal nitrojen türevi (RNS) tarafından uyarılmaktadır. Bu nedenle NO'nun hücre içi sinyal yolları içinde değerlendirilmektedir. RNS birikimi ve S-glutatyonyonilasyon arasındaki ilişkiyi açıklayan iki mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, bazı proteinlerdeki glutatyonyonilasyonun peroksinitrit oluşumu tarafından uyarılmasıdır. İkincisi ise bir nitrozotiyol ile serbest tiyolün reaksiyonundan karışık disülfid bağının oluşumudur. Nitrozillenmiş protein sisteini glutatyon ile reaksiyona girebilmekte veya S-nitrozoglutatyon (GSNO) oluşturabilmektedir. GSNO'nun sistein tiyol ile reaksiyonu S-glutatyonyonilasyon oluşumuna yol açmaktadır (Ruiz vd., 2011).

Tirozin nitrasyonu peroksinitrit (ONOO⁻) ve nitrojen dioksit (NO₂) oluşumuyla ilişkilidir (Martinez-Ruiz vd., 2013). Ayrıca peroksinitrit, CO₂

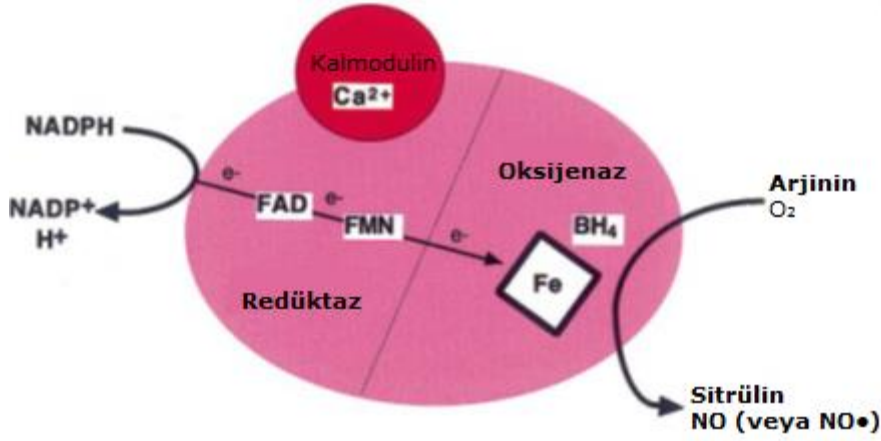
ile reaksiyona da girebilmektedir. Tirozin nitasyon mekanizması hücre membranında (hidrofobik alanda) gerçekleştiğinde peroksinitröz asit (ONOOH), •OH ve •NO₂ radikallerine parçalanmaktadır. Bu moleküller lipid peoksidasyonu, lipid ve protein nitasyonu gibi etkilere yol açmaktadır. Peroksinitrit hücre içinde veya hücre dışı alanda (aköz fazda) doğrudan metalloproteinler, metal bileşikler ve proteinlerin tiyol grubuyla reaksiyona girebilmekte veya CO₂ ile reaksiyona girerek karbonat (•CO₃⁻) ve nitrojen dioksit (•NO₂) radikallerine dönüşmektedir. Bunlar da radikal reaksiyonlarla proteinlerin ve nükleik asitlerin nitasyonuna ve oksidasyonuna neden olmaktadır (Ruiz vd., 2011).

NO'nun çeşitli sinyal mekanizmaları üzerinden meydana getirdiği etkiler NO düzeyine bağlı olarak değişmektedir. NO düşük konsantrasyonlarda bulunuyorsa genellikle cGMP yolağı üzerinden etkinlik göstermektedir. NO'nun yüksek konsantrasyonu RNS oluşumuna yol açmakta ve posttranslasyonel protein modifikasyonları görülmektedir (Ruiz vd., 2011).

2.6.1. Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'lar

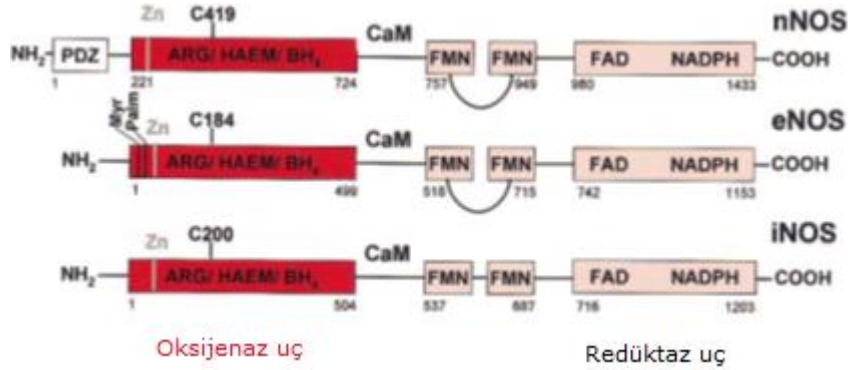
NOS'lar ilk kez 1989'da tanımlanmış ve izoformları 1991-1994 yılları arasında klonlanıp saflaştırıldıktan sonra NOS yapısı ve fonksiyonu hakkında yapılan çalışmalar ciddi oranda hız kazanmıştır.

NOS enzimlerinin aktif formları "dimerik" olarak değerlendirilmekte ve izoformlar yapısal olarak birbirlerine çok benzemektedirler. Yapılarında sıkı bağlı kofaktör (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterin (BH₄), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve demir protoporfirin IX (hem) bulunmaktadır. N-terminal oksijenaz ucu hem, BH₄ ve L-arjinin için bağlanma bölgeleri içermektedir. Kalmodulin (CaM) tanıma bölgesi, N-terminal uçla C-terminal redüktaz ucu birbirine bağlanmaktadır. C-terminal redüktaz ucu FAD, FMN ve NADPH için bağlanma bölgeleri içermektedir (Şekil 2.9) (Alderton, Cooper & Knowles, 2001).



Şekil 2.9: NOS enziminin yapısı ve NO sentezinde elektron akış mekanizması (Alderton vd., 2001).

İnsanlarda tanımlanan NOS izformlarının (Şekil 2.10) aktivitesi CaM ve BH₄'ün bağlanmasıyla birlikte homodimer yapının oluşmasını gerektirmektedir. CaM bağlanması hücre içi serbest kalsiyumun yükselmesiyle tetiklenmektedir. eNOS ve nNOS, Ca²⁺/CaM yokluğunda FMN'den hem'e elektron transferini inhibe ederek çalışmasını durdurmaktadır. Ancak iNOS için böyle bir durum söz konusu değildir, Ca²⁺'dan bağımsız aktive olmaktadır (Kone, Kuncewicz, Zhang & Yu, 2003). nNOS ve eNOS nanomolar düzeyde NO üretmekte ve etkisi kısa sürmektedir. iNOS ise mikromolar düzeyde ve etkisi saatler, hatta günler boyunca süren NO üretmektedir (Burke, Sullivan, Giles & Glynn, 2013).



Şekil 2.10: nNOS, eNOS ve iNOS enzimlerinin moleküler yapısı (Alderton vd., 2001).

2.6.1.1. Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS)

nNOS çoğunlukla beyinde, özel nöronlar tarafından ifadenmektedir. Ayrıca omurilik, sempatik ganglionlar, adrenal bezler, periferik nitrerjik sinirler, çok sayıda iç organın epitel hücreleri, böbrekte makula densa hücreleri, pankreatik islet hücreleri ve damar düz kasında da tanımlanmıştır (Förstermann & Sessa, 2012). nNOS'un enzim aktivitesi Ca²⁺-CaM'e bağlı olarak değişmektedir. Hücre içinde Ca²⁺ oranındaki artış

nNOS aktivitesini arttırmaktadır. Örneğin; nöronlarda sinyal iletimi sırasında, nNOS'un yapısında bulunan PDZ ucu PSD95 (postsinaptik yoğun protein 95) aracılığıyla postsinaptik nöronun N-metil D-aspartik asit (NMDA) reseptörüne bağlanmaktadır. Bu etkileşim sayesinde NMDA reseptörü (NMDAR) aracılığıyla hücreye giren Ca^{2+} oranında bir artış meydana geldiğinde, nNOS aktive olmakta ve postsinaptik alanda NO miktarı artmaktadır. Üretilen bu NO, diffüzyonla presinaptik nörona geçerek cGMP üzerinden etkinliğini gösterebilmektedir (Mungrue & Bredt, 2004).

nNOS öğrenme, hafıza ve nörojenez gibi fizyolojik fonksiyonları düzenlemektedir. Merkezi sinir sisteminde nNOS kaynaklı NO, merkezi düzeyde kan basıncının düzenlenmesine de katkı sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda medulla ve hipotalamusta nNOS'un blokajı sistemik hipertansiyona yol açmıştır. Nitroerjik sinirlerde üretilen NO kan damarlarını da içeren çeşitli düz kasların tonusunu azaltmaktadır (Förstermann & Sessa, 2012). Küçük miktarlarda üretilen NO fizyolojik etkilere aracılık ederken, aşırı miktarlarda salındığında nörotoksositeye sebep olmaktadır (Mungrue & Bredt, 2004). nNOS kaynaklı anormal NO sinyali multiple skleroz, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara yol açmaktadır. Ayrıca nNOS'un hiperaktivasyonu ile aşırı düzeyde NO üretilmesi glikolizi ve mitokondri solunumunu inhibe ederek enerjinin tükenmesine neden olmaktadır (Förstermann & Sessa, 2012).

2.6.1.2. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)

Bakteriyel lipopolisakaritler, sitokinler ve buna benzer ajanlar iNOS'un ifadenmesini uyarabilmektedir. Bu nedenle iNOS hücre içi Ca^{2+} düzeyinden bağımsız olarak aktive olmaktadır. Makrofajlarda iNOS uyarıldığında yüksek miktarda NO üretilir ve bu da hücrelerdeki sitotoksik etkinin ana sebebidir. Üretilen NO hedef hücrenin DNA ipliklerini parçalamakta ve fragmentasyona neden olmaktadır. Bağışıklık hücresi olmayan hücrelerin sitokinler tarafından uyarılarak komşu hücreleri etkileyebilecek kadar NO ürettiği görülmüştür. Örneğin, sitokinle aktive olan endotel hücreleri tümör hücrelerini öldürebilmektedir. Uyarılan hepatositler de malaria sporozitlerini öldürmek için NO kullanmaktadır. Tüm bu etkiler iNOS kaynaklı NO tarafından meydana gelmektedir. Ayrıca iNOS kaynaklı yüksek konsantrasyonlarda üretilen NO, $\bullet O_2^-$ ile birleşerek peroksinitrit oluşumuna yol açmakta ve oluşan peroksinitrit de hücrede yıkıcı etkiler meydana getirmektedir (Förstermann & Sessa, 2012).

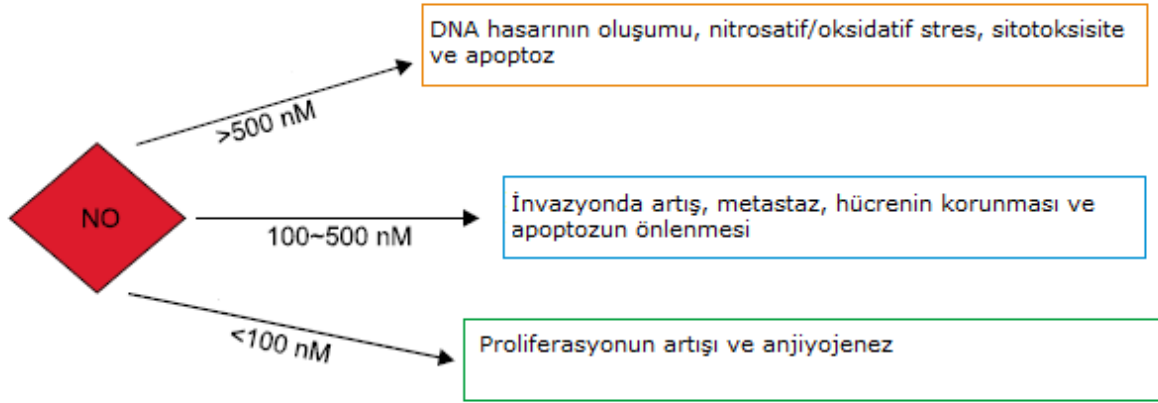
2.6.1.3. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS)

eNOS çoğunlukla endotel hücrelerinden ifade edilmekle birlikte kalp miyositlerinde, trombositlerde, beyindeki nöronlarda, plasentada sınırsız hücrelerde bulunmaktadır. eNOS da nNOS gibi hücre içi Ca^{2+} oranındaki artışla aktive olmaktadır. eNOS kaynaklı NO önemli kardiyovasküler fonksiyonların düzenlenmesine aracılık etmektedir. Kan damarlarının düz kas hücrelerinde sGC'yi uyararak, cGMP yolağı üzerinden vazodilatasyonu gerçekleştirmektedir. eNOS genindeki bazı hatalar kan basıncının yükselmesine neden olmaktadır. Endotelden damar lümenine salınan NO trombosit agregasyonunu ve vasküler duvara adezyonu inhibe etmektedir. Bu özelliği, aterosklerotik plaklara karşı NO'nun koruyucu bir rolü olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan anjiyojenik faktörlerin sinyal mekanizmasına aracılık ederek postnatal anjiyogenezde de önemli rol oynamaktadır (Förstermann & Sessa, 2012; Förstermann, Boissel & Kleinert, 1998).

2.6.2. Kanserde NO'nun rolü

NO, Şekil 2.11'de gösterildiği gibi kanser hücreleri üzerinde birbirine zıt roller üstlenebilmektedir. Yapılan araştırmalara göre düşük konsantrasyonlarda NO, anjiyogenez katkı sunarak kan akımının artması ve tümör gelişimine katkı sağlanmasında görev alır (Vahora vd., 2016). Ancak yüksek konsantrasyonlarda patojenlere ve tümörlere karşı bir sitotoksik etki meydana getirmektedir (Burke vd., 2013). Bu etki peroksinitritler aracılığıyla sağlanmakta, peroksinitrit apoptozu da uyarmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar peroksinitritin de tümör hücreleri üzerinde ikili etkiye yol açtığını ve inflamasyonla ilişkili karsinogenezi de uyardığını göstermiştir (Vahora vd., 2016).

Tümör hücreleri üzerinde NO'nun hangi yönde etki edeceği NO akımı, kimyasal redox ve NO'ya maruziyet süresine bağlıdır. RNS ve GSNO oluşumu NO'nun sitoprotektif veya sitotoksik etkisinin önemli belirleyicilerindedir (Burke vd., 2013).



Şekil 2.11: Tümör hücrelerinde yüksek NO düzeyi (>500 nM) hücrede hasarı arttırarak apoptoza yol açmaktadır. Orta düzeyde NO (100-500 nM) invazyon ve metastaza neden olmakta, apoptozu önleyerek tümör hücrelerinin malignitesini arttırmaktadır. Düşük NO düzeyinde (<100 nM) ise tümör hücrelerinin proliferasyonu artmakta ve anjiyojenezle birlikte tümör gelişimine katkı sağlamaktadır (Vahora vd., 2016).

NO ve iNOS akciğer, kolon, meme, melanoma ve pankreatik kanserler gibi çok sayıda tümör tipiyle ilişkilidir. Bir inflamasyon sırasında aktive olan bağışıklık hücrelerinden radikal oksijen türevi (ROS) ve RNS salınmakta, komşu epitelyal ve stromal hücrelere saldırmakta ve oksidatif/nitrosatif strese yol açmaktadır (Burke vd., 2013). iNOS, hipoksi indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α), sinyal ileme ve transkripsiyon aktivatörü (STAT), nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ve TNF α gibi transkripsiyon faktörleri ile uyarılmakta ve inflamasyonla ilişkili karsinogenez tetiklenmektedir (Vahora vd., 2016).

Anjiyojenez tümör gelişiminde önemli olaylardan biridir ve pro-anjiyojenik araçlar arasında NO da yer almaktadır. NO, EGRF sinyal yolağını uyarmaktadır. Ayrıca VEGF gibi proliferatif ve anjiyojenik büyüme faktörleri de NO sinyalini etkilemekte ve anjiyojenezi arttırmaktadır. Çeşitli kanser tiplerinde VEGF ekspresyonunun eNOS ve iNOS'u uyardığı gösterilmiştir. NO ve VEGF arasında karşılıklı bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Vahora vd., 2016).

2.7. NOSIP (Nitrik Oksit Sentaz ile Etkileşen Protein)

NOSIP, 34 kDa moleküler ağırlığa sahip, protein yapıda bir moleküldür (König vd., 2005). Şimdiye kadar yapılan kısıtlı çalışmalar NOSIP'in hücre tipine bağlı olarak sitoplazmik alanda veya çekirdekte bulunduğunu göstermektedir (Schleicher, Brundin, Gross, Esterl & Oess, 2005). NOSIP ile ilgili yapılan ilk çalışmalar eNOS ile arasındaki etkileşimi

ortaya koymuştur. Kaveola bölgesinde enzimatik aktiviteye sahip olan eNOS, oksijenaz ucunun karboksilaz bölgesine NOSIP'in bağlanmasıyla hücre içine, çekirdeğe doğru hareket etmekte ve aktivitesini kaybetmektedir (Dedio vd., 2001). Schleicher ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışma NOSIP'in hücre döngüsünün G₂ fazında eNOS'u baskılayarak enzim aktivitesinde azalmaya yol açtığını göstermiştir (Schleicher vd., 2005). eNOS ile NOSIP etkileşimi insanda akciğer, kalp, beyin ve iskelet kasında kanıtlanmıştır (Dedio vd., 2001). Sinir sisteminde yapılan çalışmalarda nNOS ve NOSIP'in birlikte ifadelendiği ve aynı bölgede yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. nNOS ile NOSIP'in birlikte yerleşimi sinaptik plastisitede ve nöral fonksiyonda önemli rol oynamaktadır. NOSIP, nNOS aktivitesini iki şekilde baskılamaktadır. Birincisi elektron akışını bozarak nNOS aktivitesini engellemesi, ikincisi ise eNOS'a benzer şekilde nNOS'u hücre membranının aktif bölgelerinden hücre içi bölgelere iletilmesini sağlayarak enzim aktivitesinin azalmasına yol açmasıdır (Dreyer vd., 2004). Omurilik hasarı oluşturulan sıçanlarda nNOS kaynaklı NO ve NOSIP miktarı ölçülmüş ve yüksek NO aracılığıyla oluşan hasara yanıt olarak NOSIP düzeyinin de arttığı saptanmıştır. Bu çalışma NOSIP'in NO aracılığıyla oluşan zararlı etkilerini azaltmakla görevli olduğunu düşündürmektedir (Yu vd., 2012). Dreyer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada periferik inflamasyon sonrasında nosiseptif C ve Aδ liflerinde NOSIP artışı gözlenmiştir. Bu artışın nöronlarda aşırı NO üretimine karşı dokuyu koruyucu veya dengeleyici bir mekanizma olarak değerlendirilebileceğini öne sürmüşlerdir (Dreyer vd., 2004). Tomuschat ve arkadaşları da megakolon vakalarıyla yaptıkları bir çalışmada gangliyonik ve gangliyonik olmayan bölgelerden alınan dokularda western blot ve qPCR yöntemiyle eNOS, nNOS ve NOSIP ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre gangliyonik ve gangliyonik olmayan bölgedeki NOSIP ifadenme düzeyi kontrol grubuna kıyasla ciddi oranda yüksek bulunmuştur. Ayrıca yapılan bu çalışmada yüksek NOSIP düzeyinin hastalarda enterokolit gelişimini tetiklediği görülmüş ancak megakolona bağlı gelişen enterokolitte NOSIP düzeyinde bir fark bulunamamıştır (Tomuschat vd., 2017).

NOSIP'in etkisi son yıllarda anlaşılmaya başlandığından yapılan çalışmalar çok kısıtlıdır. Bu nedenle etki mekanizmasının anlaşılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmaların hiçbiri kanserli hastalar ile yapılmamış olup kanser hücresinde veya tümör dokusunda NOSIP miktarı ve değişimi hakkında hiçbir bilgi bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Solüsyonlar

3.1.1. Cihazlar

ELISA okuyucu-yıkayıcı (Chemwell 2910, Awareness Thecnology, USA)

İnkübatör (Nüve FN500, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Tic. A.Ş., Türkiye)

Real-time PCR cihazı (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

Mikrosantrifüj (Hermle, Wehingen, Germany)

Thermal cycler (Corbett Palm Cycler, Mortlake, Australia)

Vorteks (Heidolph, Germany)

Doku homojenizatörü (Tissue-Lyser II-Qiagen VX350 Series 2 WPS 3601C12, Hilden, Germany)

Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA)

LightCycler Nano Software (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

Pipet uçları (10'lük, 100'lük ve 1000'lik)

-80°C Dondurucu (Telstar Life Science Solutions, Spain)

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Mikro pipet takımı

3.1.2. Kimyasal malzemeler

Lizis Buffer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)

β -merkaptotanol (Biorad, California, USA)

Proteinaz K (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)

TE Buffer (Invitrogen, California, USA)

Wash Buffer 1 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)

Wash Buffer 2 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)

%70'lik etanol

Nükleaz Free Water (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)

RNase Free Water (Qiagen, Hilden, Germany)

RNA Later (Invitrogen, California, USA)

Buffer 5X (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

dNTP Miks (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

DTT (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

Random Primer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

Oligo-dT Primer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

Protector RNAase inhibitör (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
Omniscript Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
Reconstituted primer /probe miks (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
2X qPCR Mastermiks (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
Reference Standard (Elabscience, Houston, Texas)
Concentrated Biotinylated Detection Ab (100x) (Elabscience, Houston, Texas)
Concentrated HRP Conjugate (100x) (Elabscience, Houston, Texas)
Reference Standard & Sample Diluent (Elabscience, Houston, Texas)
Biotinylated Detection Ab Diluent (Elabscience, Houston, Texas)
HRP Conjugate Diluent (Elabscience, Houston, Texas)
Concentrated Wash Buffer (25x) (Elabscience, Houston, Texas)
Substrate Reagent (Elabscience, Houston, Texas)
Stop Solution (Elabscience, Houston, Texas)
Nitrit/nitrat Assay Buffer (Cayman Chemical, Michigan, USA)
Nitrat Redüktaz Enzim Preparation (Cayman Chemical, Michigan, USA)
Nitrat Redüktaz Kofaktör Preparation (Cayman Chemical, Michigan, USA)
Nitrat Standart (Cayman Chemical, Michigan, USA)
Nitrit Standart (Cayman Chemical, Michigan, USA)
Griess Reaktif (Cayman Chemical, Michigan, USA)
Distile su

3.2. Deney Protokolü

Bu deneysel çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Moleküler Araştırmalar laboratuvarında ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında, 11.08.2017 tarihli 80558721/216 sayılı etik kurul kararıyla yapılmıştır.

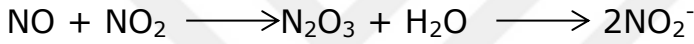
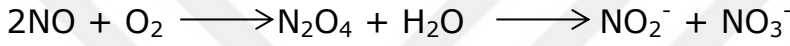
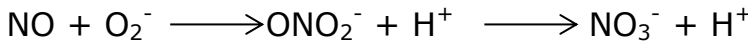
3.3. Dokuların Toplanması

11.08.2017 tarihli 80558721/216 sayılı etik kurul kararıyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda KRK tanısıyla cerrahi operasyona alınan 17 hastadan doku örneği alınmıştır. Bu dokular tümörlü alandan ve kanserli dokunun kontrolü olarak tümörün 10 cm uzaklığındaki normal bölgeden seçilmiştir. Normal bölgeden alınan

örnekler kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Cerrahi operasyon sırasında alınan örnekler RNA Later solüsyonu bulunan eppendorf tüpler içine alınmış, -80 °C'de saklanmıştır. Ayrıca ELISA deneyleri için aynı hastalardan cerrahi operasyon öncesi kan örnekleri toplanmış ve 17 sağlıklı bireyden alınan kan örnekleriyle birlikte, plazmaları elde edilerek -20 °C'de saklanmıştır.

3.4. Kolorimetrik Nitrit/Nitrat Assay

NO, biyolojik sıvılarda çeşitli moleküllerle bir seri reaksiyona girmekte ve sonucunda nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) ürünlerine dönüşmektedir.



Bu nedenle total nitrit ve nitrat miktarı, NO miktarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Kolorimetrik nitrit/nitrat assay iki basamaklı bir reaksiyon ile total nitrit/nitrat miktarını ölçmektedir. İlk basamakta nitrat, nitrat redüktaz enzimi aracılığıyla nitrite dönüşür. İkinci basamakta nitrit griess reaktifleri ile azo- ürünlere dönüşür ve bu da nitrit konsantrasyonunu belirlemektedir.

3.4.1. Reaktiflerin hazırlanması

- Assay Buffer 100 ml ultra saf suyla dilüe edildi.
- 1,2 ml Assay Buffer ile nitrat redüktaz enzimi sulandırıldı.
- 1,2 ml Assay Buffer ile nitrat redüktaz kofaktörü sulandırıldı.
- Nitrat standardı 1 ml Assay Buffer ile sulandırılarak vortekslendi.
- Nitrit standardı 1 ml Assay Buffer ile sulandırılarak vortekslendi.

3.4.2. Assay protokolü

Plazma örneklerinin plate'e yerleştirilmesi sırasında en az iki kuyucuk kör olarak değerlendirileceğinden, 200 µl Assay Buffer veya su eklenmek üzere ayrılmıştır. Standart eğri için kuyucuklar Tablo 3.1'de gösterildiği gibi A1-H2 kuyucukları arasına sıralanmıştır. Örneklerin nitrit+nitrat konsantrasyonunu ölçmek için, kit prosedürüne göre nitrat standart eğrisi oluşturulmuştur.

Temiz bir tüpe 0,9 ml Assay Buffer koyuldu, üzerine 0,1 ml nitrat standardı eklenerek vortekslendi. Bu stok standardın konsantrasyonu 200 μM 'dir.

Tablo 3.1: Örneklerin plate düzeni

Kuyucuk	Nitrat Standardı (μM)	Assay Buffer (μl)	Final Nitrat Konsantrasyonu (μM)
A1, A2	0	80	0
B1, B2	5	75	5
C1, C2	10	70	10
D1, D2	15	65	15
E1, E2	20	60	20
F1, F2	25	55	25
G1, G2	30	50	30
H1, H2	35	45	35

Belirtilen nitrat standart eğrilerinin hazırlanması için stok standart (200 μM) kullanılmıştır. Örneklerin absorbansı 0,5 ile 1,2 absorbans değerleri arasındadır. Yüksek absorbans değeri, yüksek nitrat düzeyini ifade etmektedir. Nitrit assayin en yüksek değeri 1 μM 'dir.

- Kör olarak değerlendirilecek kuyucuklara 200 μl su ya da Assay Buffer eklendi. Bu kuyucuklara başka bir reaktif eklenmemiştir.
- 40 μl örnek + 40 μl assay Buffer'dan oluşan karışım sırayla her kuyucuğa eklendi.
- Üzerine 10 μl enzim kofaktör karışımı eklendi.
- Son olarak her kuyucuğa 10 μl nitrat redüktaz karışımı eklendi ve plate kaplayıcı ile kuyucukların üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Her kuyucuğa 50 μl Griess Reaktifi eklendi.
- Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilerek Şekil 3.1'deki renk değişimi gözlemlendi.
- Absorbans değerleri 540-550 nm arasında plate okuyucu kullanılarak okundu.



Şekil 3.1: Kolorimetrik Nitrit/Nitrat Assay prosedürü uygulandıktan sonra örneklerdeki renk değişiminin gözlenmesi.

3.5. ELISA Yöntemi ile MMP-2, MMP-9, TIMP-2 ve NOSIP Tayini

Bu deney için kullanılan ELISA kiti, sandviç-ELISA metodunu kullanmaktadır. Kitin içinde bulunan mikroELISA plate, spesifik antikor ile önceden kaplanmıştır. Sonuçların analizi 450 ± 2 nm dalga boyu arasındaki bir değere göre yapılmaktadır. Standart eğri ile yüklenen örneklerin değeri birbiriyle karşılaştırılarak protein miktarı tespit edilmiştir.

3.5.1. Örneklerin hazırlanması

Antikoagülanlı tüpe alınan kan örnekleri 15 dakika, 1000 g, 2-8°C'de santrifüj edildikten sonra assay için süpernatant toplandı. Örnekler -20°C'de saklandı.

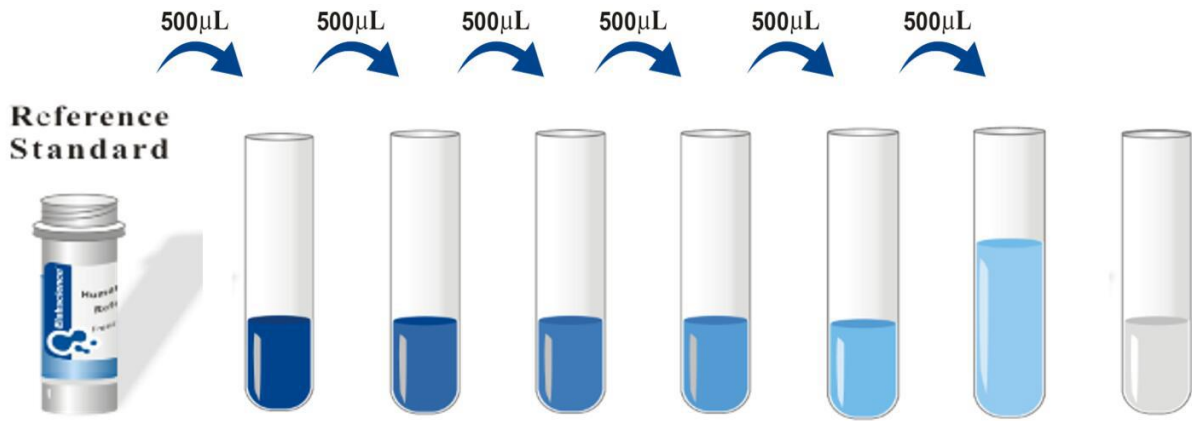
3.5.2. Reaktiflerin hazırlanması

•Deneye başlanmadan önce bütün reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Dalgaboyu ölçümünden 15 dakika önce mikroplate okuyucu ısıtıldı.

•30 ml'lik konsantre Wash Buffer, distile suyla dilüe edilerek 750 ml Wash Buffer elde edildi.

•Standart solüsyon 10,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Üzerine 1 ml Reference Standard & Sample Diluent eklenerek birkaç kez alt üst

edildikten sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Tamamen çözüldükten sonra pipetle iyice karıştırıldı. Elde edilen stok solüsyona ihtiyaç duyulan seri dilüsyon işlemi uygulandı. Bunun için 7 tüp kullanıldı. Her tüpe 500 µl Reference Standard & Sample Diluent eklendi. Stok solüsyondan 500 µl alınarak ilk tüpe aktarıldı ve böylece referans standardın konsantrasyonunun yarısı kadar dilüsyon yapılmış oldu. Bu işlem Şekil 3.2'deki gibi bir önceki tüpten 500 µl alınıp bir sonraki tüpe aynı oranda ekleme yapılarak seri dilüsyon şeklinde yapıldı. Son tüp kör olarak değerlendirileceğinden bir önceki tüpten solüsyon eklenmedi.

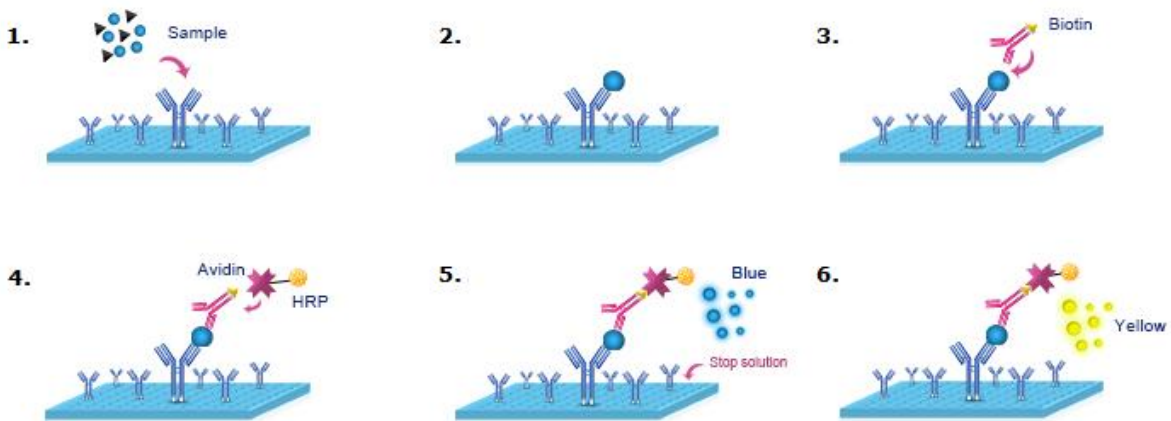


Şekil 3.2: Stok solüsyonun dilüsyonu.

- Her kuyucuğa 100 µl Biotinylated Detection Ab gerektiğinden örnek sayısına göre gerekli olan çözelti miktarı hesaplanarak konsantre Biotinylated Detection Ab (100x) solüsyonu Biotinylated Detection Ab Diluent ile dilüe edildi.

- Her kuyucuk için 100 µl HRP konjugat gerektiğinden aynı hesaplama yapılarak HRP Conjugate Diluent ile dilüsyon yapıldı.

3.5.3. Assay protokolü



Şekil 3.3: ELISA metoduna göre; 1. Örneğin kuyucuklara yüklenmesi, 2. Örneğin plate tabanındaki antikora bağlanması, 3. Biotininin eklenmesi ve örneğe bağlanması, 4. HRP konjugat eklenmesi, 5. Renk değişiminin gözleendiğinde stop solüsyonuyla reaksiyonun durdurulması, 6. Sarı renk oluşumunun gözlenmesini göstermektedir.

1. Mikroplate'de ilk sütundan başlamak üzere standart çözeltinin farklı konsantrasyonları kuyucuklara eklendi. Diğer kuyucuklara 100 µl örnekler sırasıyla eklendi. Plate kaplayıcıyla kapatılarak 37°C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı.

2. Kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 µl Biotinylated Detection Ab çözeltisi eklendi. Plate kaplayıcıyla kapatılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.

3. Kuyucuklardaki çözelti uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 350 µl Wash Buffer eklenerek 1-2 dakika beklendikten sonra çözelti uzaklaştırıldı. Bu işlem arka arkaya 3 kez tekrarlandı.

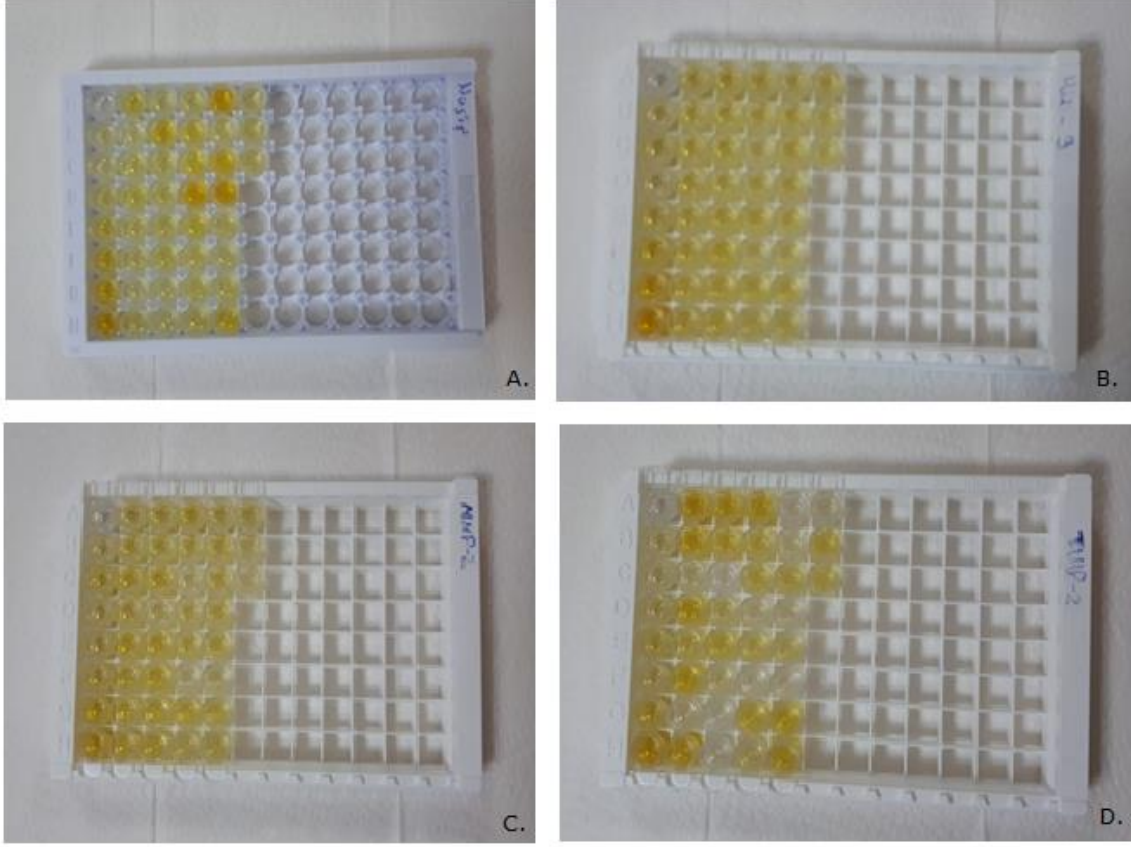
4. Her kuyucuğa 100 µl HRP konjugat eklendi. Plate kaplayıcı ile kapatılarak 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı.

5. Kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak Wash Buffer ile 3. basamakta yapılan yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.

6. Her kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklenerek yeni bir plate kaplayıcı ile plate kapatıldı. Karanlıkta 15 dakika ve 37 °C'de inkübe edildi. Şekil 3.3'de belirtildiği gibi renk değişimi gözlenmeye başladığında reaksiyon durduruldu.

7. Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi.

8. Şekil 3.4'deki renk değişimi gözlendikten sonra 450 nm'de mikroplate okuyucu ile her kuyucuktaki OD (optik yoğunluk) ölçüldü.



Şekil 3.4: ELISA yöntemine göre stop solüsyonu eklendikten sonra platelerde görülen renk değişimi (A. NOSIP, B. MMP-9, C. MMP-2, D. TIMP-2)

3.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Tekniği ile MMP-2, MMP-9, TIMP-2 ve NOSIP Tayini

3.6.1. RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için GeneJet RNA Purification Kit kullanılmıştır.

3.6.1.1. Çözeltilerin hazırlanması

- 1 ml Lizis Buffer içine 20 µl β-merkaptoetanol eklendi ve vortekslendi.
- 590 µl TE Buffer'a 10 µl Proteinaz K eklendi ve vortekslendi.

3.6.1.2. İşlem basamakları

1. Doku örnekleri, içinde metal boncuk bulunan eppendorflara alındı. Üzerine 300 µl Lizis Buffer eklendi. 30 frekansta 4 dakika homojenize edildi.
2. Homojenizasyondan sonra boncuklar alındı ve örnek başka bir tüpe aktarılarak üzerine 600 µl Proteinaz K eklendi. Vorteksledikten sonra 15-25 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. 12.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.
4. Süpernatantın üzerine 450 µl etanol eklenerek pipetle karıştırıldı.
5. Bu sıvının 700 µl'si GeneJet RNA Purification kolonuna aktarıldı ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüjden sonra kolonun altındaki toplama tüpüne biriken sıvı uzaklaştırılarak, kolona 700 µl daha sıvı eklendi ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Toplama tüpü atılarak kolon 2 ml'lik tüpe yerleştirildi.
8. Kolona 700 µl Wash Buffer 1 eklenerek 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 600 µl Wash Buffer 2 eklendi ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı, 250 µl Wash Buffer 2 eklenerek 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
11. Kolon 1,5 ml'lik eppendorfa aktarılarak üzerine 100 µl nükleaz free water eklendi ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Tüpte biriken sıvıdaki RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek için 1,5 µl RNA, 260 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçülerek hesaplama yapıldı.

3.6.2. cDNA sentezi

1. Total RNA (500 ng) + ddH₂O= 9.4 µl olacak şekilde karıştırıldı.
2. Üzerine 1 µl random primer, 1 µl oligo-dt primer eklendi.

Total hacim: 11.4 µl

3. 65 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

Komponentin hazırlanması:

Buffer 5x	: 4 µl
Reverse transkriptaz	: 1,1 µl
Protector RNAase inhibitör	: 0,5 µl
Deoxinükleotit mix	: 2 µl
DTT	: 1 µl

Total hacim: 8.6 µl

4. 11,4'lük total hacim üzerine 8,6 µl komponent dağıtıldı ve vortekslendi.

5.

29 °C'de 10 dk	} cDNA sentezi için PCR şartları
48 °C'de 60 dk	
85 °C'de 5 dk	

(Çıkan örnekler (+2) – (+8) °C'de 1-2 saat; -15 ile -25 °C'de daha uzun süre saklanabilmektedir.)

3.6.3. RT-PCR

MMP-2, MMP-9, TIMP-2, NOSIP ve β-aktin (referans gen) mRNA düzeyleri, Dual Label (Taqman prob) kullanılarak ölçüldü. RT-PCR için Tablo 3.2'deki karışım hazırlanarak reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.2: RT-PCR için karışım içeriği

Karışım	Miktar (µl)
Reconstituted primer /probe miks (MMP-2, MMP-9, TIMP-2, NOSIP veya β-aktin)	1
2X qPCR Mastermiks	10
PCR-Grade water	4
cDNA	5
Toplam hacim	20

Toplam 20 µl RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95° C'de	10 dk	} 50 döngü
95° C'de	20 sn	
55° C'de	30 sn	
72° C'de	20 sn	

Çalışmanın sonuçları LightCycler® Nano Software ile analiz edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

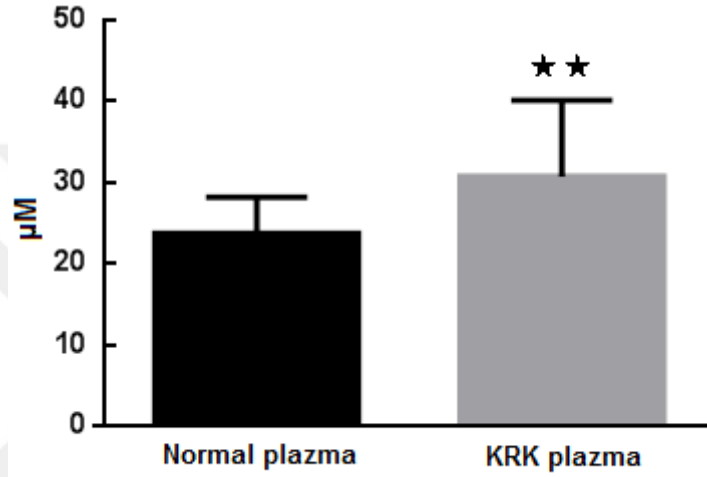
İstatistiksel değerlendirme için GraphPad Prism6 programı kullanılmıştır. Öncelikle gruplar Shapiro-Wilk Normality Test kullanılarak normal dağılım gösterip göstermediğine göre analiz edilmiştir. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklar Tukey testi ile analiz edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen veriler ise Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklılıklar Dunn testi ile analiz edilmiştir. p değeri 0.05'den küçük olanlar anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. ELISA Bulguları

4.1.1. *Total nitrit+nitrat tayini bulguları*

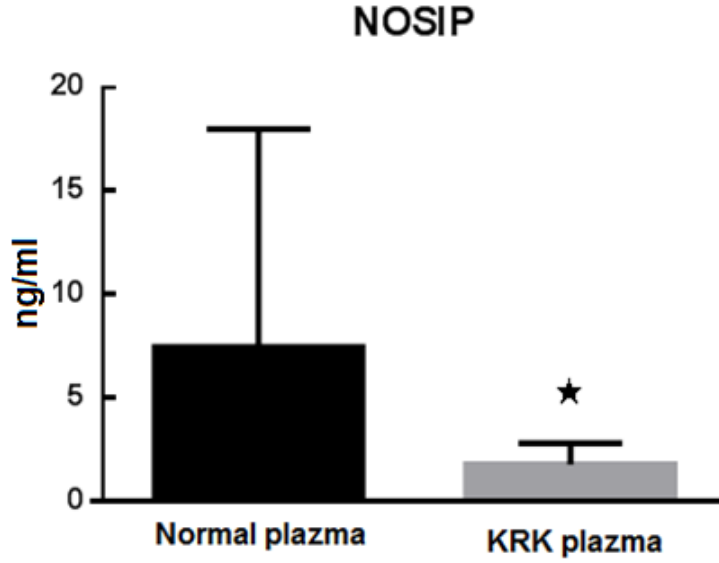
Hasta ve sağlıklı bireylerin plazmalarından kolorimetrik nitrik oksit assay kiti ile yapılan analizlerde; KRK hastalarının total nitrit+nitrat miktarı, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede bir artış göstermektedir ($p<0,01$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: KRK hastaları ile kontrol grubu bireylerinin plazma total nitrit+nitrat düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0.01$).

4.1.2. *NOSIP miktarı*

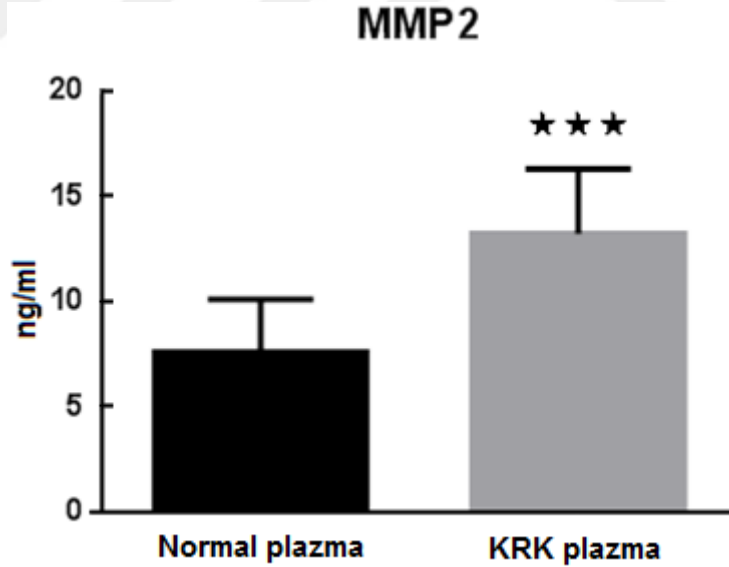
Hasta ve sağlıklı bireylerden toplanan kan örneklerinden elde edilen plazmalarda NOSIP miktarı ELISA metoduyla ölçülmüş ve normal dokuya kıyasla tümörlü dokuda NOSIP düzeyinin daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: KRK hastalarının ve sağlıklı bireylerin plazmalarında NOSIP miktarının ng/ml cinsinden karşılaştırılması ($p < 0,05$).

4.1.3. MMP-2 miktarı

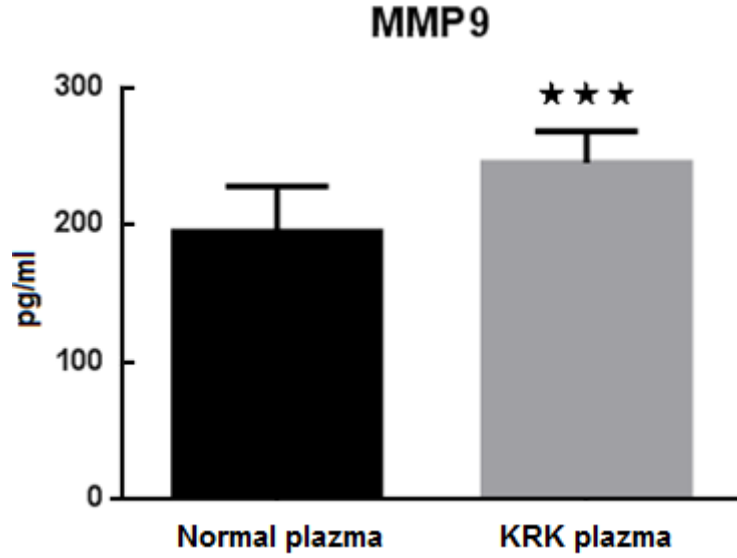
Hasta ve sağlıklı bireylerin plazmalarıyla yapılan ELISA analizlerinde, hasta bireylerde MMP-2 düzeyi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0,005$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: : Kanserli hastaların ve sağlıklı bireylerin plazmalarında MMP-2 miktarının ng/ml cinsinden karşılaştırılması ($p < 0,005$).

4.1.4. MMP-9 miktarı

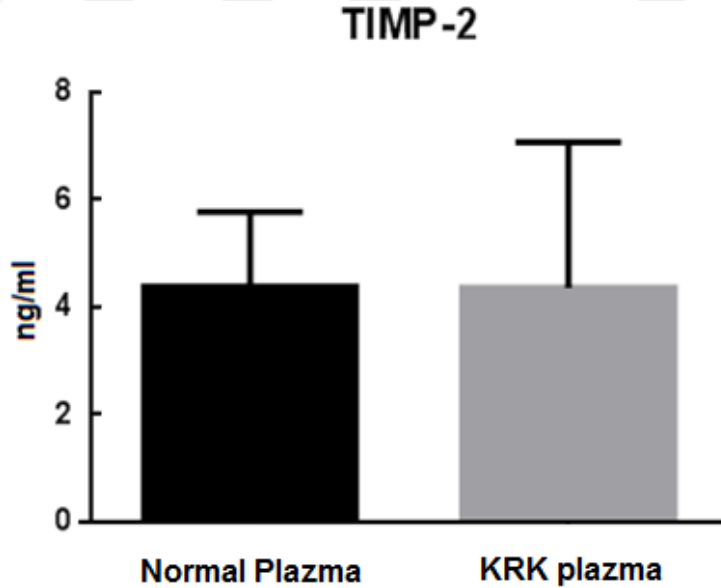
KRK'lı bireylerden elde edilen plazmalarda sağlıklı bireylere kıyasla MMP-9 düzeyinin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p < 0,005$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Hasta ve sağlıklı bireylerin plazmalarında MMP-9 miktarının pg/ml cinsinden karşılaştırılması ($p < 0.005$).

4.1.5. TIMP2 miktarı

Yapılan analizlerde hasta ve sağlıklı bireylerin plazmalarındaki TIMP2 miktarı arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 4.5).



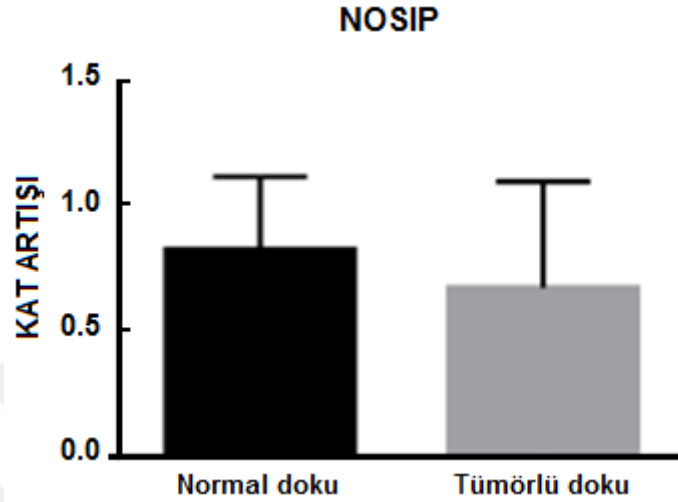
Şekil 4.5: Hasta ve sağlıklı bireylerin plazmalarında TIMP2 miktarının ng/ml cinsinden karşılaştırılması ($p > 0.05$).

4.2. RT-PCR Bulguları

RT-PCR sonuçlarımız, ELISA yöntemi ile elde ettiğimiz verileri doğrular niteliktedir.

4.2.1. NOSIP gen ifadenme düzeyi

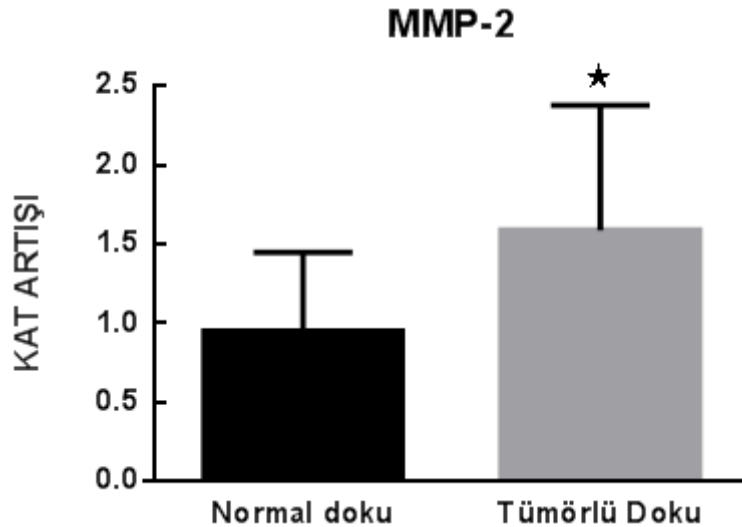
RT-PCR ile yapılan analizlere göre; normal dokuya kıyasla, tümörlü dokuda, anlamlı olmamakla birlikte NOSIP gen ifadenme düzeyinin düşük olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Tümörlü ve normal dokuda NOSIP gen ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması ($p>0,05$).

4.2.2. MMP-2 gen ifadenme düzeyi

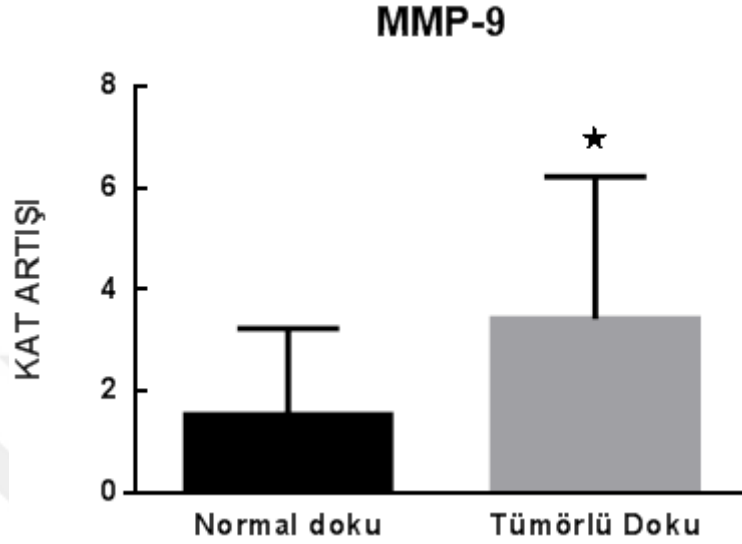
Yapılan analizlerde normal dokuya kıyasla, tümörlü dokuda; MMP-2 gen ifadenmesinin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Tümörlü ve normal dokuda MMP-2 gen ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,05$).

4.2.3. MMP-9 gen ifadenme düzeyi

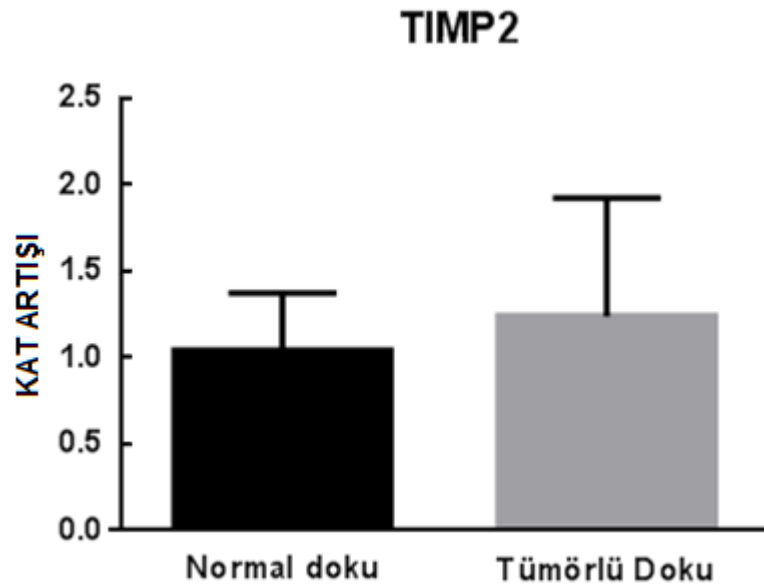
KRK'lı bireylerden alınan dokularda normal dokuya kıyasla, MMP-9 gen ifadenmesinin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Tümörlü ve normal dokuda MMP-9 gen ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması ($p < 0,05$).

4.2.4. TIMP2 gen ifadenme düzeyi

Tümörlü ve normal dokuda TIMP2 gen ifadenme düzeyleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Tümörlü ve normal dokuda TIMP2 gen ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması ($p > 0,05$).

5. TARTIŞMA

İleri derecede bir KRK tümörünün gelişimi aşamasında MMP-2 ve MMP-9 moleküllerinin önemli rolü olduğu bilinmektedir. NO bu enzimleri tetikleyerek tümör gelişimine katkı sağlamaktadır (Ziche & Morbidelli, 2009). Ayrıca tümör dokusuna kan akışını arttırarak ve anjiyogenezi tetikleyerek de tümörün gelişimini uyarabilmektedir. İleri derecede tümörlerde yüksek NO düzeyinin hücrede harap edici etkilere neden olduğu bilinmektedir. Hem fizyolojik şartlarda hem de bir tümör dokusunda NO sentezlenme düzeyi NOS'ların ifadenme düzeyine ve enzim aktivitesine bağlı olarak değişmektedir (Burke vd., 2013; Vahora vd., 2016). eNOS ve nNOS enzimleri üzerinde inhibitör etki gösteren NOSIP molekülü, NO üretimini baskılamakta ve düzeyini düşürmektedir (Dedio vd., 2001; Dreyer vd., 2004). Bu nedenle NOSIP'in, NO'nun hücreye zarar verecek etkilerine karşı bir koruma mekanizması geliştirebileceği düşünülmüştür (Yu vd., 2012). Patolojik şartlarda kanserli dokudaki ifadenme düzeyi ve dolaşımdaki miktarı ilk kez bu çalışmada belirlenen NOSIP ve buna bağlı olarak düzeyi değişen NO, kanser gelişim mekanizmalarının aydınlatılmasında büyük öneme sahiptir. Bu nedenle çalışmamızı, tümürlü ve normal dokuda NO ile NOSIP düzeyinin belirlenmesi ve aralarındaki ilişkinin ortaya konması amacıyla planladık. Buna ilaveten birçok solid tümörde yüksek miktarda ifadenme düzeyine sahip olduğu bilinen MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin kanserli ve normal bireylerin dolaşımındaki miktarını ve RT-PCR yöntemiyle dokudaki ifadenme düzeylerini belirleyerek tümör malignitesi ve NO arasındaki bağlantıyı ortaya koymayı amaçladık. Bu parametrelerle birlikte TIMP-2 miktarındaki değişimin tümörün büyüme mekanizmasının anlaşılmasında önemli rol oynayabileceğini düşündüğümüzden, bu enzimin aynı yöntemlerle normal ve tümürlü dokudaki düzeyinin araştırılmasını amaçladık.

KRK hastalarından cerrahi operasyon öncesi alınan kan örnekleri ve normal bireylerden alınan kan örnekleri ile total nitrit/nitrat miktarı ölçülmüş ve KRK hastalarının plazmalarında NO düzeyi, sağlıklı bireylerin plazmalarındaki NO düzeyine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Literatürlerden elde edilen bilgilere göre tümör dokusunda NO'nun proliferasyonu ve tümör büyümesini tetiklediği, ancak diğer taraftan doğrudan ve dolaylı mekanizmalarla tümör öldürücü etkiye de sahip olduğu bilinmektedir. iNOS enzimi uyarıldığında, diğer NOS enzimlerine kıyasla daha uzun süre ve yüksek miktarlarda NO üretmektedir. iNOS'un bu aktivitesinin en önemli düzenleyicisi tümör baskılayıcı p53 genidir. p53, hücreSEL NO artışına duyarlıdır ve NO'nun miktarı arttığında iNOS üzerinde

negatif geri besleme mekanizmasıyla inhibisyona yol açmaktadır. Ancak iNOS kaynaklı NO, p53 genindeki mutasyonları doğrudan uyarabilmektedir. Bu mekanizmanın kanser için oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca NO, kaspaz aktivitesini baskılayarak apoptozu engelleyebilmektedir. NO'nun diğer antiapoptotik etkileri cGMP yolağı aracılığıyla sitokrom C inhibisyonu, Bcl-2 ifadenmesinde artış, ısı şok proteinleri (Hsp)-70 ve -32'nin uyarılması, seramid oluşumunun baskılanması ve siklooksijenaz (COX)-2'nin aktivasyonu ile meydana gelmektedir (Choudhari, Chaudhry, Bagde, Gadbail & Joshi, 2013; Choi, Pae, Jang, Kim & Chung, 2002). NO anjiyojenezin düzenlenmesiyle de tümör gelişimine katkı sağlayabilmektedir. Arteriolar dilatasyona neden olarak tümörün kan akışını arttırmaktadır. Neovasküler büyümenin desteklenmesinde VEGF, NO/cGMP yolağını kullanmaktadır. Ayrıca COX-2 aktivasyonu da anjiyojenezi tetiklemektedir. NO tarafından uyarılan MMP-2 ve MMP-9 invazyona katkı sağlayarak tümörün büyümesine neden olmaktadır. NO'nun TIMP-2'yi azaltıcı yönde etki gösterdiği ve böylece MMP enzimlerinin baskılanmasının önüne geçilerek invazyona dolaylı olarak da katkı sağladığı bildirilmiştir (Choudhari vd., 2013). Yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır ki NO tümör hücrelerinin invazyonunu uyararak, tümörün kanlanması arttırarak ve anjiyojenezi tetikleyerek, tümör savunma sistemini bozarak tümör gelişimine katkı sağlamaktadır (Lala & Orucevic, 1998). NO'nun bu proapoptotik etkisi cGMP'den bağımsız yollar üzerinden meydana gelmektedir. NO'nun apoptotik etkileri DNA lezyonlarının oluşumu, DNA tamir mekanizmalarının baskılanması ve doğrudan DNA mutasyonları aracılığıyla gerçekleşmektedir. RNS oluşumu DNA ipliklerinin kırılmasına ve mutasyonlara neden olabilmektedir. Ayrıca peroksinitrit oluşumu karbonhidratları bozmakta, lipid peroksidasyonunu başlatmakta ve DNA yıkımına neden olmaktadır (Choudhari vd., 2013). DNA hasarı tümör baskılayıcı p53 proteininin birikimiyle sonuçlanmaktadır. p53, p21'i uyararak hücre döngüsünü bozmakta ve apoptoza yol açmaktadır. Apoptozun uyarılması için yüksek oranda dış NO vericisine ihtiyaç duyulmaktadır. Kısa süreli yüksek doz NO'ya maruziyet doğal koruma yollarını harekete geçirmekte ve apoptotik sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır (Kim, Bombeck & Biliar, 1999).

Yapılan birçok çalışma NO'nun kanserde ikili rol oynadığı ve bunun NO'nun dozuna ve maruziyet süresine bağlı olduğunu kanıtlamıştır. Ancak NO'nun doğrudan veya dolaylı mekanizmalarla tümör öldürücü etkiye neden olmasının kanser hastalarında kanıtlanmadığı yönünde bilgiler bulunmaktadır (Choudhari vd., 2013). Yapılan çalışmalarda dış NO kaynakları ile NO'nun pro-apoptotik etkisi sağlanmış ve tedavi amaçlı kullanılabileceğini göstermiştir. Deneylerimizden elde ettiğimiz sonuçlara

göre normal dokuya kıyasla tümörlü dokuda yüksek oranda NO bulunması, NO'nun pro-apoptotik yolları uyarmadığını, aksine MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinde artışa yol açarak tümör gelişimine katkı sağladığını düşündürmektedir. İnsan kolon kanseri hücre hattıyla yapılan bir çalışmada NO donörü olarak bilinen SNP (sodyum nitroprusid)'nin uygulanması sonucu, NO'ün MMP-2 ve MMP-9 miktarı ve ifadeleneğinde artışa neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada NO ile uyarılan MMP-2 ve MMP-9 artışını baskılamak için emodin kullanılmış ve sonuçta NO'nun uyardığı tümör gelişimi durdurulmuştur (Damodharan vd., 2011).

Biz de yaptığımız çalışmalarda hasta ve sağlıklı bireylerin plazmalarında ELISA yöntemiyle MMP-2 ve MMP-9 düzeylerini karşılaştırdık ve elde ettiğimiz sonuçlar, bu enzimlerin kanserli bireylerde anlamlı derecede yüksek olduğunu gösterdi. RT-PCR yöntemiyle tümörlü doku ve normal dokuda enzimlerin ifadelene düzeyleri karşılaştırıldı ve ELISA sonuçlarına benzer olarak tümörlü dokuda daha yüksek oranda ifadelendiği saptandı. Literatürlerden elde edilen bilgilerle deney sonuçlarımızı karşılaştırdığımızda benzer sonuçların bulunması, deneylerimizde kullandığımız tümörlü dokunun yüksek maligniteye sahip olduğunu göstermektedir.

Meme (Li, Qiu, Li & Wang, 2017), prostat (Oguic vd., 2014), mide (Marvan, Po-Yin, Grzegorz & Mietek, 2009) gibi yapılan birçok kanser araştırmasında MMP-2 ve MMP-9'un yüksek düzeylerde olduğu görülmüştür. Sier ve arkadaşları mide karsinoma dokusu ile komşu mukozal dokuda kantitatif zimografi yöntemiyle MMP-2 ve MMP-9 düzeylerini ölçmüşlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre her iki MMP düzeyi de gastrik karsinoma dokusunda, komşu mukozal dokuya göre önemli oranda yüksek bulunmuştur (Sier vd., 1996). Liabakk ve arkadaşları 192 kolorektal karsinoma biyopsi materyalinde MMP-2 ile MMP-9 miktarını ölçmüşler, adenom ve normal dokuya kıyasla karsinoma dokusunda yüksek oranda ifadelendiğini bulmuşlardır (Liabakk, Talbot, Smith, Wilkinson & Balkwill, 1996). Yapılan bir başka çalışmada da özellikle jelatinazların (MMP-2 ve MMP-9) kolon karsinoma metastazı sürecinde ECM yıkımına neden olan proteolitik kaskada rol oynadığını göstermiştir (Sang-Oh vd., 2003). Mesane tümörlerinde MMP-2 ve MMP-9 düzeyinin tümör derecesiyle arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada, 42 biyopsi örneği ile yapılan araştırma sonucunda tümörün derecesiyle orantılı olarak MMP-2 ve MMP-9 düzeyinin arttığı saptanmıştır (Davies vd., 1993).

Çeşitli kanser türüyle yapılan çalışmalarda TIMP ve MMP düzeyi arasındaki dengenin bozulmasının MMP aktivitesine bağlı tümör gelişimine yol açtığı bildirilmiştir. Fizyolojik dengenin sağlanmasında MMP-TIMP arasındaki oranın 1:1 olması gerekmektedir (Visse & Nagase, 2003). MMP-

TIMP arasındaki bu oranın bozulmasının tümörlerin malignant fenotipiyle ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Zhang & Chen, 2017). Yaptığımız çalışmalardan elde edilen verilere göre tümörlü ve normal doku arasında TIMP-2 düzeyleri açısından anlamlı derecede bir fark gözlenmemiştir. ELISA ve RT-PCR deneylerinde kullandığımız örnek sayısının 17 kişiyle sınırlı olması istatistiki açıdan anlamlı olmayan bir sonucun çıkmasında önemli bir sebep olarak görülmektedir. Ancak yüksek MMP-2 ve MMP-9 düzeyine karşılık TIMP-2 düzeyinin anlamlı derecede artış göstermemesi ve fizyolojik 1:1 oranının bozulması, MMP enzim aktivitesinin tümör çevresinde yıkıcı etkiler meydana getirebildiğini de göstermektedir.

Ovaryum tümörleriyle yapılan bir çalışmada tümör dokusunda MMP-9'un aşırı düzeyde ifadelenmesinin ve MMP-9 ile TIMP-1 arasındaki dengenin bozulmasının kanser gelişimini tetiklediğini göstermiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2 ve TIMP-3 düzeylerinin de ovaryum tümörlü dokusunda normal dokuya ve benign ovaryum tümörüne kıyasla yüksek olduğu gösterilmiştir (Hu vd., 2004). Liu ve arkadaşları 1320 hastayla yapılan 24 deneyin verileriyle yaptıkları meta-analiz çalışmalarında invaziv hipofiz adenomlarında MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 ifadelenme düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. Sonuçlar invaziv hipofiz adenomlarında normal dokuya göre MMP-2 ve MMP-9 ifadelenme düzeyinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ancak TIMP-2 ifadelenme düzeyinde anlamlı derecede farklılık gözlenmemiştir. Çalışmayı yapan araştırmacılar alınan bu sonuçla, daha fazla çalışma yapılmasına duyulan ihtiyacın ortaya çıktığını belirtmişlerdir (Liu, Gu, Wang, Ji & Mu, 2016). Bizim bulgularımıza göre de TIMP-2 düzeyi KRK ve normal bireylerde anlamlı bir fark göstermemektedir.

Bu aşamaya kadar yapılan deney sonuçları yüksek maligniteye sahip ve yüksek düzeyde NO bulunan tümörlü dokular ile normal dokuların kıyaslandığını kanıtlamıştır. Daha önce hiçbir tümörlü dokuda miktarı hakkında bilgi verilmeyen NOSIP düzeyi, ELISA çalışmalarımızdan elde edilen bulgulara göre kanserli hastaların plazmalarında normal bireylere göre düşük miktarda olduğu gözlenmiştir. RT-PCR deneylerinden elde edilen sonuçlarda ise istatistiki açıdan anlamlı olmamakla birlikte NOSIP gen ifadelenme düzeyinin kanserli hastaların tümör dokusunda daha düşük olduğu bulunmuştur. Bugüne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler NOSIP'in hücre içinde sitoplazmik alanda ve çekirdekte yerleşim gösterdiğini belirtmiştir. Schleicher ve arkadaşları yaptıkları çalışmada aşırı ifadelenen NOSIP'in eNOS enzimatic kapasitesini doğal hücre döngüsü sırasında azalttığını göstermiştir. Bunu hücre döngüsünün G₂ fazında eNOS'un aktin iskeletine yönelmesini sağlayarak gerçekleştirmektedir. Ancak bu mekanizma NOSIP'in çekirdekten sitoplazmaya geçişine ve

sitoplazmik alanda birikmesine bağlıdır. NOSIP'in çekirdekte yerleşim göstermesinin sebebi olarak α -importin ile olan etkileşimi gösterilmektedir. α -importin ile nükleer lokalizasyon sekansı (NLS), NOSIP'in çekirdekdeki yerleşimine aracılık etmektedir. NLS'nin mutasyonu α -importin ile etkileşimi ortadan kaldırmakta ve NOSIP'in çekirdeğe taşınmasını engellemektedir. Ayrıca NOSIP inhibisyonu da G₂-spesifik hücre iskeleti arasındaki ilişkiyi bozmaktadır. eNOS, yapısı itibarıyla aktin ile doğrudan etkileşime girebilmektedir. Yapılan bu çalışmada da hücre döngüsünün G₂ fazında eNOS ile hücre iskeleti arasındaki etkileşimin enzim aktivitesinin baskılanmasına yol açtığı kanıtlanmıştır. Hücre döngüsü sırasında en fazla G₂ fazında sitoplazmik alanda miktarı artan NOSIP'in baskılanması hücre döngüsü sırasında eNOS enzim aktivitesindeki azalmayı da ortadan kaldırmaktadır. Elde edilen bilgiler doğal hücre döngüsüne bağlı endojen NO üretiminin düzenlenmesini açıklamaktadır. Bu bilgiler hücre döngüsüyle ilişkili olan NO'nun apoptoz ve proliferasyondaki rolünün açıklanmasında oldukça önemlidir (Schleicher vd., 2005).

Bilindiği gibi NOSIP, eNOS ve nNOS kaynaklı NO miktarını azaltırken iNOS üzerinde baskılayıcı etki gösterememektedir (Dedio vd., 2001; Dreyer vd., 2004). eNOS kaynaklı NO'nun tümörün kanlanması ve gelişmesinde önemli rol oynayan anjiyojeneze katkı sağladığı düşünülmektedir. NOSIP, eNOS aktivitesini baskılayarak NO düzeyinin düşmesine sebep olabilir ancak inflamasyon durumunda uyarılan ve yüksek dozda NO üreten iNOS üzerinde baskılayıcı etki meydana getirememektedir. Bu sebeple tümörlü dokuda düzeyi artmış olan NO'nun MMP-2 ve MMP-9 enzimlerini uyararak tümör gelişimine katkı sağlayabildiği düşünülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar NOSIP'in çeşitli doku ve hücrelerde eNOS ve nNOS ile olan etkileşimi ile enzim aktivitelerinde azalmaya neden olduğunu kanıtlamaya yöneliktir. Bu nedenle, kanserli dokuda NOSIP düzeyinin normal dokuya göre az olmasının nedenini açıklayabilmek için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca NOSIP düzeyi hakkında yaptığımız deneysel çalışmalarda ELISA sonuçlarına benzer şekilde RT-PCR sonuçlarımızın da anlamlı olabilmesi için daha fazla örnek ile çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında elde edilen bilgiler ile ilk defa kanserli dokuda NO ile NOSIP, MMP-2, MMP-9, TIMP-2 arasındaki ilişki belirlenmiştir. Tümörlü dokuda yüksek miktarda NO bulunması, dokuda düşük olduğu gözlenen NOSIP düzeyine bağlanabilir. Ancak RT-PCR deneylerinden elde edilen NOSIP gen ifadenme bulguları ile ELISA ve RT-PCR deneylerinden elde edilen TIMP-2 bulgularının istatistiki açıdan anlamlı olmaması bu konuda daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır. Tez süresi içinde ulaşabildiğimiz örnek sayısının 17 hastayla sınırlı olmasının sonuçlarımızın istatistiki açıdan anlamlılık düzeyini etkilediğini düşündürmektedir. Ancak ilk kez tümörlü bir insan dokusunda NOSIP miktarının NO ve buna bağlı olarak miktarının değiştiği bilinen MMP-2 ve MMP-9 ile ilişkisinin belirlenmesi açısından önemli bir çalışma niteliği taşımaktadır. Böylece patolojik şartlarda NO ve NOSIP ile ilişkili mekanizmaların aydınlatılmasında çalışmamız bir öncü niteliğindedir. Bundan sonraki çalışmaların daha fazla örnek sayısı ile yapılması çalışmanın değerini arttıracaktır. Ayrıca yine tümör dokusu ile yapılan çalışmalarda nNOS ve/veya eNOS düzeylerinin de ölçülmesi, NOSIP'in enzim üzerinde etkinliğinin belirlenmesinde önemli olacaktır. Örneğin, metastatik tümörlerde miktarı ve ifadenme düzeyi belirlenen bu parametrelerle birlikte eNOS düzeyinin de belirlenmesi metastaz mekanizmasının aydınlatılmasında oldukça büyük önem taşıyacaktır. Gelecekte yapılacak çalışmaların bu yönde planlanması klinikte geliştirilecek tedavi imkanlarının geliştirilmesine de katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed R. L., Schmitz K. H., Anderson K. E., Rosamond W.D., Folsom A. R. (2006). The metabolic syndrome and risk of incident colorectal cancer. *Cancer*, 107(1):28–36.
- Akkoca, A. N., Yanık, S., Özdemir, Z. T., Cihan, F. G., Sayar, S., Cincin, T. G., Çam, A., Özer, C. (2014). TNM and modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(9):2828-2835.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357,593-615.
- American Cancer Society. (2008). What are the risk factors for colorectal cancer. www.cancer.org/docroot/CRI/content.
- American Joint Committee on Cancer. (2009). (7 th ed.). <https://cancerstaging.org/CSE/Physician/Pages/Articles.aspx>
- Baker, A. H., Edwards, D. R., Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*, 115:3719–3727.
- Barret, K., Brooks, H., Boitano, S., Barman, S. (2010). *Ganong's Review of Medical Physiology*. (23. Baskı). McGraw-Hill Medical.
- Beahrs, O.H., Sanfelippo, P. M. (1971). Factors in prognosis of colon and rectal cancer. *Cancer*, 28(1):213-8.
- Bode, W., Fernandez, C. C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., Maskos, K. (1999). Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(4):639–652.
- Bresailer, R. S. (2003). Malignant and premalignant lesions of the colon. *In Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology*, 407-435.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Brunnicardi, F. C., Andersen, D. K., Billiar, T. R., Dunn, D. L., Hunter, J. G., Matthews, J. B., Pollock, R. E. (2010). *Schwartz's Principles of Surgery*. (10nd ed.). Mc Graw Hill Education.
- Buğra D. (2004) Kolon, Rektum, Anal Bölge Anatomisi. *Kolorektal Özel Sayısı. Türkiye Klinikleri Journal of Surgery*, 9(1):1-9.
- Burke, A. J., Sullivan, F. J., Giles, F. J., Glynn, S. A. (2013). The yin and yang of nitric oxide in cancer pogression. *Carcinogenesis*, 34(3):503-512.
- Campos, F.G. (2017). Colorectal cancer in young adults: A difficult challenge. *World Journal of Gastroenterology*, 23(28): 5041-5044.
- Choi, B. M., Pae, H. O., Jang, S. I., Kim, Y. M., Chung, H., T. (2002). Nitric oxide as as pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 35(1):116-126. (75)
- Choudhari, S. K., Chaudhry, M., Bagde, S., Gadbail., A. R., Joshi, V. (2013). Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology*, 11:118.
- Colorectal resection. (2011).
<http://powderpostbeetle.pixnet.net/blog/post/27131169-%5B%27%9B%B4%E8%82%9B%E5%A4%96%E7%A7%91%5Dcolorectal-resections>
- Damodharan, U., Ganesan, R., Radhakrishnan, U.C. Expression of MMP2 and MMP9 (gelatinases A and B) in human colon cancer cells. (2011). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(5-6):1245-1252.
- Davies, B., Waxman, J., Wasan, H., Abel, P., Williams, G., Krausz, T., Neal, D., Thomas, D., Hanby, A., Balkwill, F. (1993). Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Research*, 53(22):5365-9.
- Dedio, J., König, P., Wohlfart, P., Schroeder, C., Kummer, W., Esterl, W. M. (2001). NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB Journal*, 15:79-89.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Dobrucalı, A. (2003). Kolorektal kanserde sınıflama ve etyopatogenez. *Kolon, rektum ve anorektal bölge hastalıkları, 1.Baskı*. İstanbul: Tasarım yayıncılık.
- Dreyer, J., Schleicher, M., Tappe, A., Schilling, K., Kuner, T., Kusumawidijaja, G., Esterl, W. M., Oess, S., Kuner. (2004). Nitric oxide synthase (NOS)-interacting protein interacts with neuronal NOS and regulates its distribution and activity. *The Journal of Neuroscience*, 24(46):10454-10465.
- Förstermann, U., Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33, 829-837.
- Förstermann, U., Boissel, J. P., Kleinert, H. (1998). Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB Journal*, 12(10):773-790.
- [Francis, S. H., Busch, J. L., Corbin, J. D. \(2010\). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacological Reviews*, 62:525-563.](#)
- Gersten, T. (2017). *Hematology/Oncology*. <https://medlineplus.gov/ency/imagepages/19218.html>
- Guyton, A. C., Hall, J. E. (2001). *Tıbbi Fizyoloji*. (10. Edisyon) Editör: Hayrünisa Çavuşoğlu. Tavaslı Matbbaacılık.
- Hansen, H. B., Moore, W. G. I., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Hansen, B. B., DeCarlo, A., Engler, J. A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in oral biology and medicine*, 4(2):197-250.
- [Hardingham, N., Dachtler, J., Fox, K. \(2013\). The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Frontiers in Cellular neuroscience*, 7:190.](#)
- Harford, W. V. (2006). Colorectal cancer screening an surveillance. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 15(1):1-20.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Hu, X. X., Li, L., Li, D. R., Zhang, W., Cheng, X. Q., Zhang, J. Q., Tang, B. J., Ai, Z. (2004). Expression of matrix metalloproteinases-9,-2,-7 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, -3 mRNA in ovarian tumors and their clinical significance. *Chinese Journal of Cancer*, 23(10):1194-8.
- Kim, Y. M., Bombeck, C. A., Biliar, T. R. (1999). Nitric oxide s a bifunctional regulator of apoptosis. *Circulation research*, 84:253-256.
- Kone, B. C., Kuncewicz, T., Zhang, W., Yu, Z. Y. (2003). Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 285(2):F178-F190.
- Labianca, R., Beretta, G.D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M.A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., Braud, F., Wils, J. (2010). Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74, 106-133.
- Lala, P.K., Orucevic, A.(1998). Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metastasis Review*, 17:91-106.
- Li, H., Qiu, Z., Li, F., Wang, C. (2017). The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncology Letters*, 14(5):5865-5870.
- Liabakk, N. B., Talbot, I., Smith, R. A., Wilkinson, K., Balkwill, F. (1996). Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Tumor Biology*, 56(1):190-6.
- Liu, H. Y., Gu, W. J., Wang, C. Z., Ji, X. J., Mu, Y. M. (2016). Matrix metalloproteinase-9 and -2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in invasive pituitary adenomas A systematic review and meta-analysis of case-control trials. *Medicine (Baltimore)*, 95(24): e3904.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Löffek, S., Schilling, O., Franzke, C-W. (2001). Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *European Respiratory Journal*, 38:191-208.
- Martinez-Ruiz, A., Araujo, I. M., Izquierdo-Alvarez, A., Hernansanz-Agustin, P., Lamas, S., Serrador, J. M. (2013). Specificity in S-nitrosylation: a short-range mechanism for NO signaling? *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(11):1220-35.
- Marvan, E., Po-Yin, C., Grzegorz, S., Mietek, W. (2009). Serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 and conventional tumor markers (CEA and CA 19-9) in patients with colorectal and gastric cancers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47(8):993-1000.
- McCawley, L. J., Matrisian, L. M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current Opinion in Cell Biology*, 13(5):534-540.
- Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., Coppedè, F. (2011). Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011:792362.
- Mungrue, I. N., Brett, D. S. (2004). nNOS at a glance: implications for brain and brawn. *Journal of Cell Science*, 117, 2627-2629.
- Natanson, C., Hoffman, W. D., Suffredini, A. F., Eichacker, P. Q., Danner, R. L. (1994). Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Annals of Internal Medicine*, 120(9):771-783.
- Oguic, R., Mozetic, V., Tesar, E. C., Cupic, D. F., Mustac, E., Dordevic, G. (2014). Matrix metalloproteinases 2 and 9 immunoexpression in prostate carcinoma at the positive margin of radical prostatectomy specimens. *Pathology research international*, 2014: 8.
- Opdenakker, G., Damme, J. V. (1992). *Cytokine*.
<https://www.rndsystems.com/resources/articles/matrix-metalloproteinases-mmps>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Pei D., Weiss, S. J. (1995) Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin 3 zymogen. *Nature*, 375(6528):244–247.
- Peng, W., Yan, J., Wan, Y., Wang, B., Tao, J., Yang, G., Pan, H., Wang, J. (2012). Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis. *Journal of Clinical Immunology*, 32, 1409–1414.
- Praga, S. M. W., Dickson, R. B., Hawkins, M. J. (1997). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Investigational New Drugs*, 15(1):61-75.
- Ritter, L. M., Garfield, S. H., Thorgeirsson, U.P. (1999). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 257(2):494–499.
- [Ruiz, A. M., Cadenas, S., Lamas, S. \(2011\). Nitric oxide signaling: classical, less classical and nonclassical mechanisms. *Free Radical Biology Medicine*, 51:17-29.](#)
- Sang-Oh, Y., Soo-Jin, P., Chang-Hyun, Y., An-Sik, C. (2003). Sustained production of H₂O₂ activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF-κB pathway, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1):128–137.
- Schleicher, M., Brundin, F., Gross, S., Esterl, W. M., Oess, S. (2005). Cell cycle-regulated inactivation of endothelial NO synthase through NOSIP-dependent targeting to the cytoskeleton. *Molecular and cellular biology*, 25(18):8251-8258.
- Sier, C. F. M., Kubben, F. J. G. M., Ganesh, S., Heerding, M. M., Griffioen, G., Hanemaaijer, R., Krieken, J. H. J. M., Lamers, C. B. H. W., Verspaget, H. W. (1996). MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *British Journal of Cancer*, 74(3):413-417.
- Stamler, J. S., Meissner, G. (2001). Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiological Reviews*, 81(1):209-237.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Staff, H. (2017). Colostomy for Colorectal. <https://myhealth.alberta.ca/Health/medications/Pages/conditions.aspx?hwid=zm6210>
- Süzen, L. B. (2008). *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş*. İstanbul. Bedray Basın Yayın.
- Tomuschat, C., O'Donnell, A. M., Coyle, D., Dreher, N., Kelly, D., Puri, P. (2017). NOS-interacting protein (NOSIP) is increased in the colon of patients with Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 52(5):772-777.
- Vahora, H., Khan, M. A., Alalami, U., Hussain, A. (2016). The potential role of nitric oxide in halting cancer progression through chemoprevention. *Journal of Cancer Prevention*, 21(1):1-12.
- Visse, R., Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92:827-839.
- Walther A, Johnstone E, Swanton C. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *National Reviews Cancer*, 9(7):489-99.
- Wang, Z., Juttermann, R., Soloway, P. D. (2000). TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(34):26411-26415.
- Woessner, J. F. (2002). MMPs and TIMPs-an historical perspective. *Molecular Biotechnology*, 22(1):33-49.
- Yu, X., Zhong, Y., Zhu, Z. (2012). Increased expression of nitric oxide synthase interacting protein (NOSIP) following traumatic spinal cord injury in rats. *Journal of Molecular Histology*, 43:661-668.
- Zajgla, J. M., Pozo, L. D., Ceballos, G., Maldonado, V. (2008). Tissue inhibitor of metalloproteinases-4. The road less traveled. *Molecular Cancer*, 7:85.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Zhang, Y., Chen, Q. (2017). Relationship between matrix metalloproteinases and the occurrence and development of ovarian cancer. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, 50(6):e6104.

Zhao, W. Q., Li, H., Yamashita, K., Guo, X. K., Hoshino, T., Yoshida, S., Shinya, T., Hayakawa, T. (1998). Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 111:1147–1153.

Ziche, M., Morbidelli, L. (2009). Molecular regulation of tumor angiogenesis by nitric oxide. *European Cytokine Network*, 20(4):164-70.

Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Aygöl Cemre ŞAHİN
Doğum tarihi ve yeri : ESKİŞEHİR 19/06/1991
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri
Mail Adresi : a.cemresahinn@gmail.com
Tel : 0505 867 1906

Eğitim Durumu

(Tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru ilköğretim, lise, üniversite, yabancı dil / diller) :
İlköğretim : Dumlupınar İlköğretim Okulu (2005)
Lise : Tayfur Bayar Lisesi (2009)
Üniversite : Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2013)
Yabancı Dil : İngilizce

Bilimsel Etkinlikler

Projeler: T98G Glioma Hücre Hattında Nitrik Oksit Miktarı ile Nöronal Nitrik Oksit Sintaz ve NOSIP Düzeyleri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi

Kurslar ve Eğitim Programları: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası