

**GASTROİNTESTİNAL KANSERLİ HASTALARIN
SERUMLARINDA MMP-2 VE MMP-9 PROTEOLİTİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF PROTEOLYTIC ACTIVATION OF
MMP-2 AND MMP-9 IN SERUM FLUIDS OF PATIENTS WITH
GASTROINTESTINAL CANCER**

ÖMER KEREM SELÇUK

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2012

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan


.....
Prof. Dr. Erol AKSOZ

Üye (Danışman)


.....
Doç. Dr. Hatice MERGEN

Üye


.....
Prof. Dr. Ali KALAYCIOĞLU

Üye


.....
Prof. Dr. Afife İZBIRAK

Üye


.....
Yrd. Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından 05/10/2012 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. F. Sevin DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

GASTROİNTESTİNAL KANSERLİ HASTALARIN SERUMLARINDA MMP-2 VE MMP-9 PROTEOLİTİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Ömer Kerem Selçuk

ÖZ

Kanser, bir hücredeki hasar sonucu hücrenin kontrolsüz ve anormal bir şekilde büyümesi, çoğalmasıdır. Kanser hastalığında hücrelerin çoğalması ardından farklı dokulara hatta lenfatik ve hematojenik yayılım ile metastaz ve invazyon sonucu uzaktaki organlarda tümör oluşumu sonucunda hastaların büyük bir bölümünde ölümlerle sonuçlanır. Moleküler düzeyde, kanser hastalarında erken tanı ve tedavi amaçlı, bazı biyobelirteçlerin kullanılmasına yönelik yapılan son yıllardaki çalışmalarda, çeşitli enzimlerin, periferik kan plazması, serumu ve çeşitli vücut sıvılarında saptanması kanser hastalığının tedavisi için umut verici olmuştur.

Bu tez çalışmasında da amaçlanan hedef, gastrointestinal kanser hastalarında hasta olmayan bireylere göre periferik kanda artışı olduğu düşünülen, Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) ve Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9) enzimlerinin jelatin zimografi yöntemi ile aktivasyonlarının belirlenmesidir.

Bu doğrultuda, klinik tanılı 28 gastrointestinal kanserli bireyden oluşan hasta grubu ile tümör bulgusu saptanmamış 40 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunun periferik kanından elde edilen serumlarında MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

Jelatin zimografi yöntemine göre yapılan jelatinaz aktivasyonu dansitelerinin karşılaştırılmasıyla elde edilen istatistiksel analizleri sonucunda, MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu için kanserli bireylerle, sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Deney kapsamında kullanılan enzimlerinin hassaslık ve özgüllükleri sırasıyla, MMP-2 için %85 ve %92; MMP-9 için %67 ve %75'dir.

Yapılan tez çalışması sonucunda MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin gastrointestinal tümörlerin belirlenmesi için kullanışlı olabileceği saptanmıştır. Ayrıca yapılan zimografi yöntemine ek olarak, mRNA ifadesinin kontrolü veya ELISA gibi yöntemlerle karşılaştırmalı olarak kanser metastazlarının erken tanısında enzimlerin kullanılma güvenilirliğinin artırılması sağlanabilir.

Anahtar Kelimeler: matriks metalloproteinaz, jelatin zimografi, gastrointestinal kanser, enzim, metastaz

Danışman: Doç. Dr. Hatice Mergen, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

DETERMINATION OF PROTEOLYTIC ACTIVATION OF MMP-2 AND MMP-9 SERUM FLUIDS IN PATIENTS WITH GASTROINTESTINAL CANCER

ÖMER KEREM SELÇUK

ABSTRACT

Cancer is uncontrolled division and growth of cells as a result of DNA damage in the cell. After the unregulated cell division, lymphatic and haematogenous metastatic spread at distant organs in cancer usually ends up with death in patients. Recent researches about the marker used in early diagnosis and treatments in patients with gastrointestinal cancer shows that the detection of some enzymes in peripheral blood plasma, serum and body fluids promise cancer treatment.

It is considered that enzyme activations of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) are increased in gastrointestinal cancer patients' peripheral blood serum. The main aim of this study is to compare the activation of MMP-2 and MMP-9 by using the gelatin zymography method in cancer patients and the control group. According to this, determination of enzyme activities of MMP-2 and MMP-9 is done by using the peripheral blood serum from 28 clinical diagnosed patients with gastrointestinal cancer and 40 healthy people.

By using gelatin zymography method, serum MMP-2 and MMP-9 levels were significantly elevated in patients with gastrointestinal cancer. The statistical analysis shows the significant differences which is obtained by comparing the gelatinase activations between patient group and control group. In addition, the sensitivity and specificity of MMP-2 is established as 85% and 92% while MMP-9 sensitivity and specificity is established as 67% and 75%.

In conclusion, MMP-2 and MMP-9 enzyme activities are promised to identify early diagnosis of gastrointestinal malignancy. In addition to gelatin zymography method, metalloproteinase activities could be compared with different methods such as mRNA expression and ELISA method. By this multiple comparisons, the reliability of metalloproteinase enzyme activities could be verified to determine early diagnosis of cancer malignancy.

Keywords: matrix metalloproteinase, gelatin zymography, gastrointestinal cancer, Enzyme, metastasis.

Advisor: Assoc. Prof. Hatice Mergen, Hacettepe University, Department of Biology, Molecular Biology Section

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, hoşgörü ve ilgisiyle daima yanımda olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Hatice Mergen'e,

Bilgi, tecrübe ve yardımları için, Arő. Gör. Dr. İ. Çağatay Karaaslan'a,

Çalıőmam sırasında her türlü yardımını esirgemeyen ve çalıőılması için gerekli ortamı yaratan çalışma arkadaşlarım Arő. Gör. Sibel Küçükyıldırım, Arő. Gör. Beril Erdem'e, Arő. Gör. Tuğçe Karaduman'a,

Çalıőmam için klinik desteęi sağlayan Doç. Dr. Zülfikar Polat'a,

Eğitim hayatımda ve tüm yaşamımda daima bana destek olan aileme,

Tez yazımım sırasında göstermiş oldukları sabır ve destek için tüm arkadaşlarıma,

En içten dileklerimiz, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖZ..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ..... | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | vi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | viii |
| | |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİ..... | 4 |
| 2.1. Kanser Oluşumu(Karsinogenez)..... | 4 |
| 2.2. Proto-onkogenler, Tümör Baskılayıcı Genler ve DNA Onarım Genleri.. | 5 |
| 2.3. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri..... | 7 |
| 2.3.1. Kontrolsüz Hücre Proliferasyonu..... | 8 |
| 2.3.2. Apoptozis Yetersizliği..... | 9 |
| 2.3.3. Hücre Farklılaşmasının ve Hücre Metabolizmasının Değişimi..... | 9 |
| 2.3.4. Genomik Kararsızlık..... | 10 |
| 2.3.5. Hücre Ölümsüzlüğü..... | 11 |
| 2.3.6. Metastaz ve İnvazyon..... | 12 |
| 2.4. Dolaşıma Karışmış Tümör Hücreleri(Circulating Tumor cell-CTC's)... | 15 |
| 2.5. Tümör Belirteçleri..... | 16 |
| 2.5.1. Tümör Belirteçleri Olarak MMP'lerin Kullanılması..... | 18 |
| 2.5.2. MMP'lerin Tümör Belirteci Olarak Kullanıldığı Durumlar..... | 21 |
| 2.5.3. Matriks Metalloproteinazların Kanserli Dokulardaki Aktivasyonu..... | 24 |
| 2.6. Tez Çalışmasında Kullanılan Matriks Metalloproteinazlar..... | 26 |
| 2.6.1. Matriks Metalloproteinaz-2(MMP-2; Jelatinaz A)..... | 26 |
| 2.6.2. Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9; Jelatinaz B)..... | 28 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3. | Materyal ve Metot..... | 30 |
| 3.1. | Hasta ve Kontrol Örneklerinin Toplanması..... | 30 |
| 3.2. | Jelatin Zimografi Yöntemi için Gerekli Tampon ve Solüsyonların Hazırlanması..... | 30 |
| 3.2.1. | Tamponlar..... | 30 |
| 3.2.2. | Yürütme Sonrası Tamponlar, Çözeltileri ve Ayraçlar..... | 31 |
| 3.3. | Jelatin Zimografi Yöntemi..... | 33 |
| 3.3.1. | Zimografi Jelinin Hazırlanması..... | 34 |
| 3.3.2. | Örneklerin Yürütülmesi ve Aktivasyonu..... | 36 |
| 3.4. | İstatistiksel Analizler..... | 36 |
| 4. | Sonuçlar..... | 37 |
| 4.1. | Hasta ve Kontrol Gruplarının MMP-2 ve MMP-9'un Jelatin Zimografi Yöntemi ile Aktivitelerinin Gösterilmesi..... | 38 |
| 4.1.1. | Hasta Grubunun MMP-2 ve MMP-9 Aktivasyonlarının Zimografi ile Tayin Edilmesi..... | 38 |
| 4.1.1.1. | Hasta Grubunun Zimografisinden Elde Edilen Sonuçların Dansitelerinin Analizi..... | 39 |
| 4.1.2. | Kontrol Grubunun MMP-2 ve MMP-9 Aktivasyonlarının Zimografi ile Tayin Edilmesi..... | 40 |
| 4.1.2.1. | Kontrol Grubunun Zimografisinden Elde Edilen Sonuçların Dansitelerinin Analizi..... | 42 |
| 4.3. | Sonuçların İstatistiksel Analizi..... | 44 |
| 5. | Tartışma..... | 51 |
| 6. | Kaynaklar..... | 56 |
| EK | Etik Kurul İzni..... | 61 |
| | ÖZGEÇMİŞ..... | 62 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 2.1. Epitel dokuda kanser oluşumunun ilk kanser hücresinden İnvazyona Basamakları..... | 8 |
| Şekil 2.2. Tümör gelişiminin iki şemada gösterilmesi..... | 11 |
| Şekil 2.3. Metastaz..... | 14 |
| Şekil 2.4. Metalloproteinazların domain yapısına göre sınıflandırılması..... | 19 |
| Şekil 2.5. Dendogram..... | 20 |
| Şekil 2.6. MMP-2 proteininin yapısı..... | 26 |
| Şekil 2.7. MMP-9 proteininin yapısı..... | 28 |
| Şekil 4.1. Hasta grubuna ait MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu zimografi sonuçları..... | 39 |
| Şekil 4.2. Hasta grubuna ait jel dansite hesaplamaları..... | 39 |
| Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu zimografi sonuçları..... | 41 |
| Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu zimografi sonuçları..... | 42 |
| Şekil 4.5. Kontrol grubu jel dansite hesaplamaları..... | 43 |
| Şekil 4.6. MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonlarının hasta kontrol grupları arasındaki farkın karşılaştırılması..... | 49 |
| Şekil 4.7. Tümör lokalizasyonu ile MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu arasındaki ilişki..... | 49 |
| Şekil 4.8. Roc Curve analizi..... | 50 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Çizelge 2.1. Omurgalılarda Metalloproteinaz ailesi..... | 18 |
| Çizelge 2.2. MMP'ler ve substratları..... | 22 |
| Çizelge 4.1. Tez çalışmasında kullanılan hasta listesi..... | 37 |
| Çizelge 4.2. Hasta grubu jel dansite verileri..... | 40 |
| Çizelge 4.3. Kontrol grubu jel dansite verileri..... | 43 |
| Çizelge 4.4. MMP-2 ve MMP-9 Roc Curve analizi koordinatları..... | 44 |
| Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol gruplarının MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonları nicel verileri..... | 45 |
| Çizelge 4.6. MMP-2 enzimi grup istatistikleri..... | 47 |
| Çizelge 4.7. MMP-9 enzimi grup istatistikleri..... | 48 |
| Çizelge 4.8. Roc Curve analizi..... | 50 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-------------------|---|
| APC | : Adenom polipoz koli |
| APS | : Amonyum Persulfat |
| BM | : Bazal membran |
| BRCA | : Meme kanseri proteini |
| CaCl ₂ | : Kalsiyum klorür |
| CTC | : Dolaşıma karışmış tümör hücresi |
| dH ₂ O | : Deiyonize su |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| ECM | : Ekstraselüler Matriks |
| EGF | : Epidermal büyüme faktörü |
| ELISA | : Enzim immünotesti |
| FGF | : Fibroblast büyüme faktörü |
| HCl | : Hidroklorik asit |
| HNPCC | : Kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser |
| IL | : İnterlökin |
| kDa | : Kilo Dalton |
| MMP | : Matriks Metalloproteinaz |
| mRNA | : Mesajcı ribonükleik asit |
| PAGE | : Poliakrilamid jel elektroforezi |
| PBS | : Fosfat tamponu |
| RB | : Retinoblastoma |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| ROC | : İşlem karakteristiği eğrisi |
| RT-PZR | : Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu |
| SDS | : Sodyum dodesil sülfat |
| SH | : Tiyol |
| TEMED | : Tetrametiletildiamin |
| TGF | : Değişirici büyüme faktörü |

| | | |
|-------------------|---|------------------------------------|
| TİMP | : | Metalloproteinaz doku inhibitörü |
| TNF | : | Tümör nekroz faktörü |
| TP53(P53) | : | Tümör Proteini 53 |
| VEGF | : | Vasküler endotelyal büyüme faktörü |
| XP | : | Xeroderma pigmentosum |
| Zn | : | Çinko |
| ZnCl ₂ | : | Çinko klorür |

1.GİRİŞ

Kanser, hücrede gerçekleşen genetik ve epigenetik değişikliklerin bir sonucu olarak hücrelerin kontrolsüz çoğalması şeklinde tanımlanmaktadır. Endojen mekanizmalar veya bir takım çevresel etkileşimler de kanserleşmede büyük rol oynarlar (Schwab, 2008). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 yılı verileri dünyadaki ölümlerin %13'üne kanserin sebep olduğunu göstermektedir. Bu yılda 7,6 milyon insanın kanserden öldüğü anlamına gelmektedir (www.who.int). Dünyada yılda 12.662.600 yeni kanser vakası teşhis edilmektedir ve dünya nüfusunun %18.7'si 75 yaşına gelmeden kansere yakalanma riski taşımaktadır. Dünyada en çok görülen 5 kanser tipi akciğer, göğüs, kolorektal, mide ve prostat kanserleridir (globocan.iarc.fr). Türkiye'de ise 2004-2006 yılları arasında, Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan en son istatistiksel çalışmaya göre erkeklerde tüm kanser tiplerinde kaba hız yüz binde 245, kadınlarda ise yüz binde 164 olarak hesaplanmıştır. Türkiye'de akciğer, prostat kolorektal ve mide kanseri erkeklerde; göğüs, kolorektal, tiroid, uterus korpusu kanseri ise kadınlarda en çok görülen kanser tipleridir (www.kanser.gov.tr).

Tütün kullanımı, alkol tüketimi, kötü beslenme, fiziksel tembellik kanser riskini artıran ana sebepler arasında kabul edilmektedir. Kanserden kaynaklanan mortalite bu oranlara göre artış gösterecek olursa 2030 yılında dünyada kanser hastalığı nedeniyle hayatını kaybeden birey sayısının 11 milyonu aşacağı öngörülmektedir. Kanser gelişim mekanizmalarının tam anlamıyla anlaşılmasının öngörülebilir gelecekte gerçekleşmesi olası olabilir; ancak, bireysel farklı mekanizmalarla gelişim gerçekleşebileceği için tekil bir yaklaşıma güvenmek neredeyse imkânsız olmaktadır. En geniş anlamıyla en yeni bilimsel keşiflerin kanser tedavisine yeni yaklaşımlara dönüştürülmesi ve kanser risk etkenleri hakkındaki bilgilerin popülasyonun davranış biçimlerine yansıtılması konularını kapsayan dönüşümsel araştırmalar son derece önemlidir (Boyle and Levin,2008).

Kanser, kendini göstermesi, gelişimi ve sonuçları açısından bir hastadan diğerine çok değişken olan, karmaşık bir hastalıktır. Aynı heterojenlik ve çeşitlilik hücresel ve moleküler düzeyde de kendini gösterir. Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve uzak dokuları istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir süreçtir (Merlo et al., 2006). Hastalığın ve hastaların arasındaki heterojenlikten dolayı biyobelirteçlerin kullanımı kanserin patofizyolojik

karakterizasyonunun belirlenmesi açısından gelecek vaat etmektedir. Biyobelirteçler patojenik veya normal bir biyolojik süreç için ölçülebilir ve değerlendirilebilir veya tedavi sırasında farmakolojik olarak kullanılabilir. Bu belirteçler, nükleik asitler, proteinler, şekerler, yağlar ve küçük metabolitler olabileceği gibi, hücreler ve ürünlerini de içeren geniş çeşitlilikteki biyokimyasallardır. Biyobelirteçler kan, serum, idrar ve doku örneklerinden belirlenebilmekte ve bu belirteçlerin son yıllarda kanser taramalarında ve tanımlamalarında, ilaç gelişim süreçlerinin takibinde kullanılmaktadır (Nass and Moses, 2007).

Bir biyobelirteç, tümör tarafından salgılanan bir molekül olabilir ya da vücudun tümöre karşı verdiği özgün bir yanıt olabilir. Gen diziliminde, ifadesinde ya da protein yapı ve işlevindeki değişiklikler, her tür kanserle ve bunların çeşitli gelişim aşamalarında ilerleyişle ilişkilendirilmiştir. Gen ifadesindeki ve protein yapı ya da modifikasyonundaki değişimler, kanseri saptamak, teşhis etmek ve hastalığın ilerlemesiyle tedaviye yanıtı izlemek için kullanılabilir (Srivastava and Wagner, 2007). Ancak seçicilik ve duyarlılık ne kadar düşükse kanser olmayan bireylerin pozitif sonuç verme sıklığı o kadar fazla olacaktır. Şu andaki mevcut biyobelirteçlerin hiç biri %100 seçiciliğe ve duyarlılığa erişememiştir (Li et al., 2002).

Yaygın olarak kullanılan biyobelirteçlerin yanı sıra, matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) da sıklıkla kanser belirteci olarak birçok çalışmada tercih edilmiştir. Matriks metalloproteinazlar çinko bağımlı metalloendopeptidaz ailesinin üyesidir. Üçlü çinko bağlanma bölgesi bulunan aktif histidin reziduları ile karakterize edilirler. MMP'ler ekstraselüler matriks (ECM) proteinleri olan kollajen, fibronektin, laminin ve proteoglikanları hidrolize ederek bağ dokunun bütünlüğünü değiştirirler (Schwab, 2008). Yapılan birçok çalışma MMP'lerin kanserleşmede çok önemli bir rol üstlendiğini göstermiştir. MMP'ler büyüme faktörü ve diğer proteazların salınımını arttırarak, aktifleşmelerini sağlamakta ve tümör hücrelerinin ekstraselüler matrikse saldırılarına sebep olmaktadır (Tutton et al., 2003). Günümüzde moleküler ağırlıkları, işlevleri, konumları veya substrat özgünlükleri ile birbirlerinden ayrılan 11 farklı MMP tanımlanmıştır. Epitelial tümörlerin yayılımı sırasında karşlarına çıkan ilk bariyer, tip IV kollajen içeren bazal laminadır (BM). Tip IV kollajenazlar ve jelatinazlar olarak bilinen MMP-2 (jelatinaz A) ve MMP-9 (jelatinaz B) BM'deki kollajeni, jelatini ve fibronektini degrade edebilmektedirler (Liabakk et al., 1996).

Son yıllarda, gastrointestinal sistemde, özellikle kolon ve rektum kanseri ile bunlara ek olarak mide ve özefagus kanseri insidansları endüstrileşmiş Kuzey ve Batı Avrupa ülkelerinde, Kuzey Amerika'da aşırı artış göstermiştir (Schulz, 2005). Dünya genelinde gastrointestinal kanser insidansı toplam 1,5 milyonu aşmıştır. Mortalite ile insidans arasında 2:1 oranı söz konusudur (www.globocan.iarc.fr). Pek çok kolorektal kanser, tanımlanabilir kanser öncesi lezyonları içeren çok aşamalı bir süreç aracılığıyla ortaya çıkan sporadik adenokarsinomlardır. Düzenli taramaların ve adenomatöz poliplerin alınmasının etkin koruma stratejileri olduğunun anlaşılmış olmasına karşın, bu stratejiler pahalıdır ve yakın tıbbi gözlem gerektirmektedir. Semptomların çok belirgin olmaması, yaygın olarak kullanılan biyobelirteçlerin duyarlılığının düşük olması erken tanıda sorunlar yaratmaktadır (Boyle and Levin, 2008).

Bu tez çalışmasında, gastrointestinal kanser tanısı konulmuş 28 birey ve tümör varlığına ilişkin herhangi bir bulgusu olmayan 40 sağlıklı bireyden serum örnekleri alınarak, jelatinaz zimografi yöntemi ile MMP-2 ve MMP-9 proteolitik aktiviteleri belirlenmiş ve bu proteinlerin biyobelirteç olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

2.GENEL BİLGİ

2.1. Kanser Oluşumu

Kanser oluşumu (karsinogenez), vücudun farklı dokularında çeşitli evreleri içeren çok basamaklı gelişim sürecidir. Bu süreç hiperplazi, displazi, metaplazi, benign tümör ve son basamakta da malign tümör oluşumunu kapsar. Malign tümörler duruma göre invaziv ve metastatik olarak, hormonların ve büyüme faktörlerinin kontrolünde gelişim gösterebilmektedir (Schwab, 2008).

Kanser hücrelerinin gen/kromozom yapı ve sayıları çok sayıda değişimler içerir. Kanser hücrelerindeki değişimlerin çoğunluğu somatik hücrelerdeki mutasyonlardır. Bazı çocukluk çağı kanserlerinin genetik ve epigenetik bozukluklarında fetal gelişim dönemi etkili olmaktadır. Aslında, genomik kararsızlık kanseri tanımlayan özelliklerden bir tanesidir ve birçok kanser hücresinde görülen anormal çekirdek yapısı genom farklılığının morfolojik sonucunun açık bir göstergesidir (Schulz, 2005). Tümör oluşumu yıllar süren oldukça karmaşık bir süreçtir. Tümör oluşum süresince normal hücreler neoplasik fenotipli hücrelere evrimleşirler. Tümör oluşumunda rastgele mutasyonlar ve epigenetik etkileşimler hücre proliferasyonunu, hücre ölümsüzlüğünü ve diğer malign fenotipli hücrelerin özelliklerini kontrol ederler (Weinberg, 2007).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar doğrultusundan kanser oluşumu için üç ana kuralın ihlal edilmesi gerektiği kabul edilmektedir:

-Birinci kural hücrelerin ancak doğru sinyal aldıklarında bölünmeleridir. Hücre, bu kuralı bir hormon veya büyüme faktörü ile uyarıldığında hücre bölünmesini sürekli olarak aktif hale getirerek ihlal eder (bölünme uyarısından bağımsız bölünebilme).

-İkinci kural hücrelerin DNA replikasyonu için uygun koşulları sağlayamadığı takdirde, replikasyonu başlatmak yerine apoptozisi (kendi kendini imha etme) aktif hale getirmeleridir. Apoptozisi ihlal etmek için hücrenin, RB1(Retinoblastoma) ve TP53(p53) genlerinden yani iki ana kontrol geninden mutasyon sonucu kurtulması gerekir. Bu iki genin mutasyonu sonucu hücreler apoptozisten kaçınabilirler

-Üçüncü kural, normal hücrelerin sadece sınırlı, belli sayıda bölünme kuralıdır. Hücreler sınırlı sayıdaki DNA replikasyonunu kromozomların uçlarındaki telomer

yapıları ile sağlarlar. Kanserli hücreler bu kuralı telomeraz denilen bir enzimin azalan telomer uçlarına yeni tekrar dizilerinin eklenmesi ile ihlal ederler. Başka bir bakış açısıyla hücreler sonsuz gençlik evresine girerler. Ancak unutulmamalıdır ki kanserli hücrelerin asıl sorunu bu değişiklikleri eşgüdümlü olarak yapabilmektir (Hanahan and Weinberg, 2000).

Kanser genellikle köken dokusuyla sınırlı kalan, küçük, gösterişsiz bir lezyon olarak başlar ve çoğu zaman klinik açıdan benign olarak düşünülür. Kanser erken benign bir aşamada yakalanmadığında, sadece büyüklük açısından değil, komşu hücrelere müdahale etme ve bozma açısından da ilerler ve gelişir. Dolayısıyla karsinogenezde zaman ve ilerleme kritiktir. Kanser gelişimini basamaklaştıracak olursak önce normal hücrelerin DNA'larında oluşan mutasyon sürecini içeren "başlangıç" dönemi gelir. Bunu mutant hücrelerin aşırı büyüme özelliği kazandığı ve lezyonlar oluşturduğu "hızlanma" evresi ve hücreleri genetik-epigenetik modifikasyonlarla daha saldırganlaştıran bir evre olan "ilerleme" evreleri takip eder (Boyle and Levin, 2008).

2.2. Proto-onkogenler, Tümör Baskılayıcı Genler ve DNA Onarım Genleri

Kanserin hedeflediği genetik programlar insan genomuna dağılmış genlerde yazılıdır. Bu genlerin birkaç bin kadarı kanserde regülasyonu bozulan genetik programlarda rol alan proteinleri kodlamaktadır. İşlevini kaybeden bir gen, kritik bir proteinin anormal düzeylerde üretimine, işlev kazanması veya kaybetmesine ya da bir proteinin hiç oluşmamasına sebep olabilir (Boyle and Levin, 2008). Örneğin KRAS olarak adlandırılan bir gende meydana gelen bir mutasyon, hücre zarının hemen içinde bulunan küçük bir proteinin hücre büyümesinin sinyalini arttıran bir protein haline almasına neden olur ve sürekli hücre bölünmesi sinyalini verir. KRAS mutasyonları kolorektal kanserlerin %30-40'ında ya da akciğer adenokarsinomalarının %20-30'unda yaygın olarak saptanmaktadır. Bu şekilde etkinleşmiş bir gen onkogen olarak adlandırılır (Olivier et al., 2008).

Proto-onkogenlerin tanımlanması, hücrelerin proliferasyonu nasıl gerçekleştirdiğini de güçlü bir şekilde açıklamıştır. Proto-onkogenler tarafından kodlanan proteinler büyüme faktörü sinyallerinin düzenlenmesi ve iletilmesi görevini üstlenmişlerdir. Bu genlerde oluşan bir mutasyon ile büyüme faktörü sinyallerini düzenleyen proteinlerde regülasyon bozuklukları oluşmaktadır. Bu durumda salgılanan proteinlerin kontrollü

bir şekilde salınımı yerine sürekli bir sinyal iletimi oluşur ve kanser hücreleri ile ilişkili proliferasyonlar gerçekleşir (Weinberg, 2007).

Proto-onkogenler, büyüme, gelişme ve çoğalmayı denetleyen karmaşık bir hücre sel sinyal ağının kontrol noktalarında bulunan proteinleri kodlamaktadır. Bu genlerin hatalı mutant versiyonları onkogen olarak adlandırılmaktadır ve büyüme sinyalinin devamlı oluşumuna neden olurlar (Weinberg, 2007).

Birinci grup onkogenler retrovirüslerin genomunun bir bölümünden keşfedilmiştir. Bu virüsler memeli veya kuşlarda hematolojik veya yumuşak dokuda kanserleşme oluşturmaktadırlar. Bu virüsler hedef organizmanın mezenşimal dokularında veya hematopoetik sistemlerinde büyüme özelliklerini değiştirirler. İkinci grup onkogenler ise retrovirüslerin Proto-onkogenlerin regülasyonunu bozmasıyla aktive olan onkogen grubunu içermektedir (Schulz, 2005).

Bazı genler ise onkogenlerin tersine etkin olmadıklarında kanser gelişimine katkıda bulunurlar. Örneğin TP53 geni yanlış hücre bölünmesini engeller. Bu gendeki mutasyon proteini bozar ve protein hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını durduramaz. TP53 mutasyonu hemen hemen tüm kanserlerde görülmektedir. İşlev kaybı nedeniyle kanser gelişimine neden olan genler tümör baskılayıcı olarak adlandırılır (Olivier et al., 2008).

Birçok kalıtsal kanser, germ hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğraması sonucu oluşur. Birçok kalıtsal baskın tip kanserlerde, tümör baskılayıcı genin bir mutant alleli bir sonraki nesle aktarılır. Diğer allelin, mutant allelin mutasyon, delesyon, rekombinasyon veya epigenetik mekanizmalar ile inaktive olması kanser gelişimini başlatır. Sporadik kanser tiplerinde ise iki allelin de mutasyonu ile hücre hatlarında gelişim gözlemlenmektedir. Tümör baskılayıcı allellerdeki delesyon veya rekombinasyon polimorfik belirteçlerde heterozigozite kaybına neden olur. Heterozigozite kaybının analizi tümörlerde delesyon ve rekombinasyonun saptanmasında çok kullanışlıdır (Schulz, 2005).

Gerçekte birçok araştırmacı kanser hücrelerindeki esas kusurun hücrelerdeki normal DNA onarım yetisindeki sapmaların olduğuna inanırlar. Genomik bütünlüğün yitilmesi hücre çoğalmasını, programlı hücre ölümünü ve hücre-hücre bağlantısını çeşitli yönlerden kontrol eden bazı özel genlerdeki mutasyonlara yol açar. Bu

süreçleri kontrol eden genlerdeki mutasyon birikimleri kansere yol açmaktadır. Kanser hücrelerindeki genomik düzensizliğin yüksek seviyelerde olması durumu mutator fenotip olarak bilinir ve kanserlerin bir kısmı DNA tamirini kontrol eden genlerde bulunan hasarların sonucudur. Örneğin xeroderma pigmentosum (XP) ultraviyole ışınlarına ve diğer karsinojenlere karşı olağandışı duyarlılık ile karakterize edilir ve bu hastalarda malignant deri kanseri gelişir. Bu hastalara ait hücreler DNA onarımını başarabilmesi için gerekli yedi genden birinde ortaya çıkan mutasyonlara bağlı olarak nükleotid eksizyon (kesip-çıkarma) onarımında kusurludurlar. Bu hastalar ultraviyole ışına maruziyet sonucu meydana getirilen timin dimerleri gibi DNA hasarlarını onaramazlar. Benzer şekilde bir başka örnek ise, kalıtsal polipozis-olmayan kolorektal kanserde (HNPCC) DNA tamirini kontrol eden sekiz gendeki mutasyonlar sonucunda kanser oluşmaktadır. Bu ilgili genlerin dördü DNA yanlış eşleşme mekanizmasını kapsamaktadır. MSH2, MSH6, MLH1 ve MLH3 genlerinden herhangi birindeki inaktivasyon, mutasyonların hızlı birikimine ve sonucunda kolorektal kansere yol açmaktadır. Otozomal dominant bir sendrom olan HNPCC, kolondan başka yumurtalık, uterus, böbrek gibi kanserlerin gelişme riskine yatkındır (Klug, Cummings and Spencer, 2006). Kadınlar arasında en yaygın olan kanser türü olan meme kanseri için 1994 yılında iki tane DNA tamir geni tanımlanmıştır. BRCA1 ve BRCA2 isimli bu iki gendeki germ hattı mutasyonları ailesel meme kanserinin en önemli nedenidir. BRCA1 ve BRCA2 genlerinin moleküler işlevleri tam kesin olmasa da hasara uğrayan DNA'nın onarımında görev aldığı olarak bilinmektedir. Bu genlerdeki mutasyonlar değişken penetranslar ile otozomal dominantlar gibi davranır. Bu genlerde mutasyona sahip kadınlar %36-85 oranında meme kanseri oluşumunda, %16-60 oranında yumurtalık kanseri oluşumunda riske sahiptirler (Surbone et al., 2001).

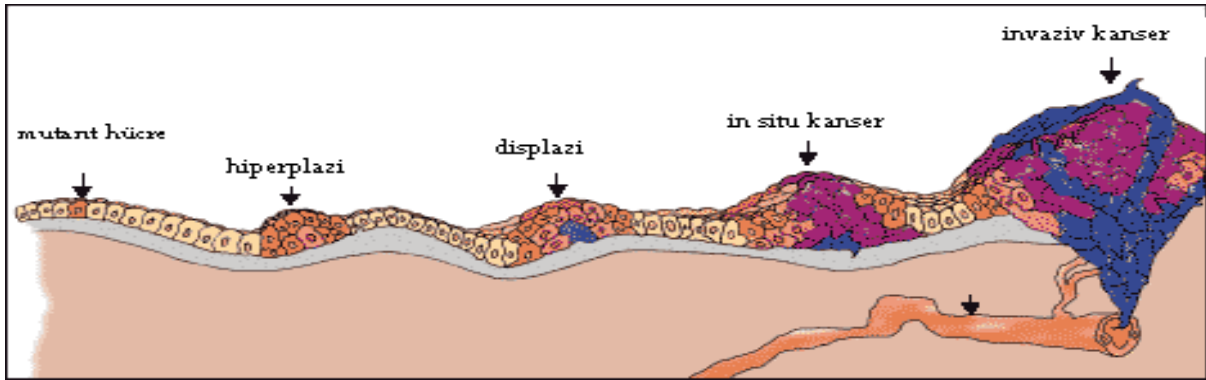
2.3.Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

Kendi içlerinde çeşitlilik gösterse de genel olarak kanserler bazı ortak özellikleri paylaşmaktadırlar. Bu özelliklerden bazıları diğer hastalıklarda da görülebilmektedirler. Ancak kontrolsüz hücre proliferasyonu, metabolizma değişiklikleri, genomik kararsızlık ve metastaz kanser için spesifik özellikler olarak kabul edilmektedir (Schulz, 2005). Kanserli hücreler bu özellikleri genellikle karsinogenez sürecinin farklı basamaklarında kazanarak, kanser gelişiminin devamlılığını bu yolla kolaylaştırmaktadırlar.

2.3.1. Kontrolsüz Hücre Proliferasyonu

Tümörlerin en belirgin özelliği normal değerleri aşan hücre bölünmesidir. Tümör terimi vücutta anormal büyüklüklere ulaşmış yapı, şişkinlik veya sıvı dolu kistlere verilen genel addir. Kanserler, hücre sayısının artışına neden olan bu birincil tümörlerden köken alırlar. Doku yenilenmesi, gelişimi ve bazı kanser olmayan hastalıklarda da artmış hücre proliferasyonu görülmektedir.

Genel olarak dokudaki hücre sayısının artışına hiperplazi adı verilmektedir. Geniş hiperplazi veya bazı hücrelerin farklılaşması (displazi) sonucu benign tümörler oluşmaktadır. Displazi malign tümör oluşumdan bir önceki durumdur ve bazı preneoplastik değişimler içerir. Doku yapısında oluşan farklılaşmalar ve tümör hücresi invazyonu bir malign tümörü veya kanseri ifade etmektedir (Şekil 2.1.). Hiperplazi, benign tümör ve kanser mikroskobik olarak ayırt edilebilmektedir.



Şekil 2.1. Bir epitel dokuda kanser oluşumunun ilk kanser hücresinden invazyona basamakları. Kanserli hücrenin boyut ve derecesine göre sınıflandırılması gösterilmektedir. **a.** Hücrenin mutasyon sonucu kontrolsüz çoğalması. **b.** Değişmiş hücrelerin ve oğul hücrelerin çoğalmaya devam etmesi; hiperplazi. **c.** Oğul hücrelerin morfolojik olarak anormalleşmesi ve çeşitli mutasyonlar geçirmesi; displazi **d.** Aynı dokuda kalan anormal hücreler; in situ kanser **e.** Farklı dokulara sızrayan ve dolaşıma karışan kanser hücreleri; invaziv kanser (Weinberg, 2007).

Kanserlerde hiperproliferasyon büyüme düzenleyici sinyallere verilen cevabın değişmesi ile gelişebilir. Bazı kanserler büyüme uyarıcı sinyallere karşı yüksek hassasiyet gösterirken bazıları da bunlardan bağımsız olarak gelişim gösterir. Bu değişken cevaplar kanserin otonom büyüme karakterinin farklılığına sebep olurlar.

2.3.2. Apoptozis Yetersizliği

Hücreler tümör oluşumu yolağında ilerlerken, varlıklarını tehdit eden, hücreleri strese sokan birçok fizyolojik neden sonucu apoptozise girerler (Weinberg, 2007). Apoptozis, programlanmış hücre ölümü ile hücre sayısının dengede tutulması anlamına gelen ve bu dengenin bozulması halinde nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olan bir olgudur (Boyle and Levin, 2008).

Bazı onkogenlerin aktivasyonu, bazı yolakların regülasyonunu kaybetmesi ve çeşitli DNA hasarları apoptozis bozulmasına sebep olmaktadır. Bu durum neden kanserlerin neredeyse tamamında apoptozis mekanizmasının inaktif olduğunu açıklamaktadır (Weinberg, 2007).

Apoptozisteki hatalar neoplastik hücrelerin yaşlanmasının ötesinde, mutasyon birikiminin artmasına rağmen hayatta kalabilmelerini sağlar ve böylelikle tümör kitlesi genişledikçe hipoksiya ve oksidatif stresten korunma sağlamış olur. Bazı kanserlerde, özellikle meme kanserinde büyüme ile apoptozis arştı arasında pozitif ilişki bulunmuştur (Parton et al., 2001).

2.3.3. Hücre Farklılaşmasının ve Hücre Metabolizmasının Değişimi

Birçok kanser, öncül doku orijini hücrelerinden ve normal farklılaşmasını tamamlamamış hücrelerden meydana gelmektedir. Bazıları da farklılaşmanın ileri seviyelerinde özellik gösteren hücrelerden meydana gelmektedir. Bazı kanserler ise bütün farklılaşma belirteçlerini taşıyan hücrelerden oluşur ve en önemli özellikleri proliferasyona devam etmeleridir. Bu tip kanser hücrelerinin primer dokularını tanımlamak oldukça kolaydır ve tanıda büyük önem taşırlar. Kanser hücreleri, kendi doku orijinlerinde bulunmayan belirteçleri ifade ederler. Kanser hücreleri, kolon kanserindeki karsinoembriyonik antijen veya karaciğer kanserindeki alfa-fetoprotein gibi onkofetal olarak adlandırılan sadece fetal hücrelerde ifade olan proteinleri ifade eder. Melanomadaki kanser testis antijenleri ve akciğer kanserindeki peptid hormonlar gibi diğer proteinler, kanserli hücreler dışında orijinal hücre tipinden hiç sentezlenmez ve buna ektopik ekspresyon adı verilir (Schulz, 2005).

Hücre farklılaşması hücre proliferasyonu ile ilişkilidir. Birçok normal dokuda hücre farklılaşmasının son evresinde geri dönüşümsüz olarak replikatif potansiyelin kaybı

gerçekleşir. Buna terminal farklılaşma denir. Dokularda hücre oluşumu ve ölümü arasındaki farklılaşma süreci anahtar rol oynamaktadır (Schulz, 2005).

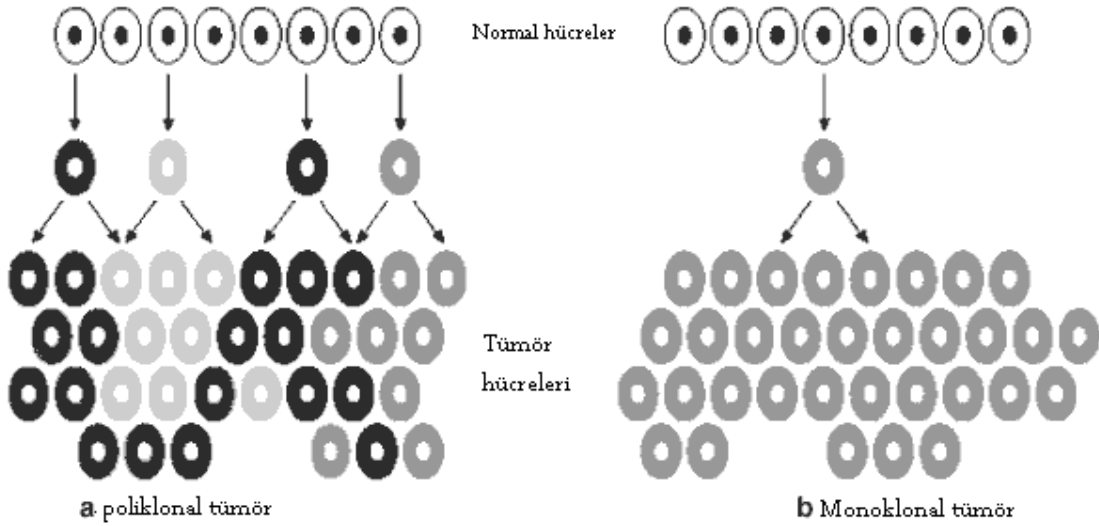
Hücre proliferasyonu, hücre metabolizmasında da değişikliklere neden olur. Hücre bölünmesi sırasında, hücre organellerinin bölünmelerini sağlayabilmesi için lipid sentezi artışı gözlemlenir. Çünkü vücuttaki yağ depolarından yeterince lipid sağlanamaz ve sonuç olarak ilgili enzimlerin ifadesi ve aktivitesi kanserli hücrelerde artış gösterir. Bu metabolizma artışı ile kanserli hücreler gelişir ve vücudun başa çıkmak zorunda olduğu laktat gibi ürünlerin salınımını artırır. Metabolizma hızının artışı ile ortamda oksijenli solunum yeterli olmaz ve bu durumda glikoliz yoluna başvurularak glikoz oksijensiz solunum ile laktata indirgenir. (Schulz, 2005).

Ayrıca kanser hücreleri bazı toksik etkili hormon ve enzimlerin salınımını da artırır. Bazı sitokinler metabolik bozukluklara ve fırsatçı enfeksiyonlara sebep olmaktadır. FAS ligand gibi bazı moleküller ise karaciğer gibi hassas organlara zarar vermekte veya homeostazinin üretilen hormonlar ile ektopik olarak dengesini bozmaktadır (Schulz, 2005).

2.3.4. Genomik Kararsızlık

Hücre döngüsü sırasında bazı potansiyel problemler genomda hasara yol açabilir. DNA kopyalanması sırasında, özellikle hücrenin DNA hasarı oluşmasına yol açabilecek ışınım, karsinojenlere maruziyet gibi stres koşulları altında olması, DNA kopyalanması bittikten sonra, hücrenin DNA sentez sistemini kapatması ve M fazında, hücre için gayet zor olan kromatidlerin eşit şekilde ayrılması işini yapması şeklinde 3 ayrı aşamada problem çıkmaktadır. Bu nedenle hücrenin bu işlemler sırasında duraklama yapabilmesi gerekmektedir. Bunun yapılamaması kanserin özelliği olan genetik ve genomik kararsızlığa yol açabilmektedir. Genetik kararsızlık, DNA onarımındaki hatalar nedeni ile gen mutasyonu, delesyonu ya da gen rekombinasyonunun artması ile karakterize edilir. Genomik kararsızlık ise kromozomların translokasyonuna, büyük kromozom parçalarının kaybı ya da tekrarlanmasına ve anormal kromozom sayılarına (anöploidi) neden olabilir (Boyle and Levin, 2008).

Kanser ve kanser olmayan hücre proliferasyonu arasındaki fark genomik kararsızlığa dayanmaktadır. Anöploidi ve Poliploidi gibi anormallikler kanser dokularında gözlemlenebilmektedirler. Diploid kalan kanser hücrelerinde ise nokta mutasyonları ve DNA metilasyon modellerinde değişimler gözlenmektedir. Kanserleşme sürecinde, hücreler kendi genomlarındaki çeşitliliğin sayısını artırma eğilimindedirler. Kanser hücrelerinde, hızlı proliferasyon yapabilme, stres koşullarına karşı tolerans, immün cevaptan kaçınma özelliklerine en iyi uyumu sağlayan hücre klonu seçilir ve bu klon gelişmeye devam eder (Şekil 2.2). Kanserleşme sürecinde hücreler mutasyon biriktirmeye devam ederlerken bir yandan da genomik kararsızlıkları ve epigenetik bozuklukları artar. Sonuçta, genomik kararsızlık, kanserli hücrelerde DNA onarımındaki bozukluklardan, genomik bütünlüğün kontrolündeki bozukluklara kadar birçok sebepten kaynaklanabilmektedir (Schulz,2005).



Şekil 2.2. Tümör gelişiminin şematik olarak gösterilmesi. Tamamı olmasa da insanda oluşan kanserlerin çoğu monoklonal olarak gelişim göstermektedir (Varmus and Weinberg, 1993)

2.3.5. Hücre Ölümsüzlüğü

Hücrenin ölümsüzlük kazanması, hücre popülasyonunun sınırsız sayıda bölünmeye maruz kalması anlamına gelmektedir. Normal memeli somatik hücreleri belirli bir sayıda proliferasyona uğrar ve maksimum bölünme sayıları da “Hayflick limit” olarak adlandırılır. Bu limit aşıldığında hücreler bazı biyokimyasal değişikliklere uğrar ve yaşlanma dönemine girerler. Ancak limit aşımına rağmen bölünmeye devam eden

hücreler ise ölümsüzleşmiş kabul edilir. Birçok kanser ölümsüz hücreler barındırır. Tümörler 2^{40} kadar hücre bulundurlar, ancak rasgele oluşan ve hücrelere büyüme avantajı sağlayan genetik değişimlerin kanserli hücrelerde birikimi ve genetik kararsızlık, anjiyogenez sebebiyle hücrelerin ölümsüzlüğü sağlanmaktadır (Reddel, 2000).

Hücre yaşlanması kromozom uçlarındaki telomerlerin kısalması ile gerçekleşmektedir. Telomerler tekrar dizileri içerirler. Her hücre bölünmesi sırasında "TTAGGG" tekrar dizilerinin kısalmasıyla hücre yaşlanma gerçekleşir. Ancak ölümsüzleşen hücrelerde telomer tekrarları telomeraz enzimi tarafından tamamlanır. Bu enzim birçok kanserli hücrede aktif durumdadır. Buna ek olarak alternatif telomer uzaması mekanizması ile de kanserli hücrelerde ölümsüzlük gerçekleştirilmektedir (Shay et al., 2006). Kanserli bazı hücrelerde telomeraz aktivitesi gözlemlenmemiş ve kanserin ölümcül etkisi için sınırsız bölünmeye ihtiyaç duymadığı yapılan bazı çalışmalar ile gösterilmiştir (Schulz, 2005).

2.3.6. Metastaz ve İnvazyon

Metastaz, konum değiştirmiş bir lezyondur. Yayılma yani invazyon ise bir tümörün metastaz oluşturma sürecine atıfta bulunmaktadır. Bu süreç büyümekte olan tümörlerin ortaya çıktıkları, normal hücrelerin yerini ve hacmini aldıkları, damar bariyerlerini geçerek kan ya da lenf dolaşımına girdikleri ve sağlıklı dokulara sızdıkları bir dizi basamaktan oluşur (Li et al., 2007).

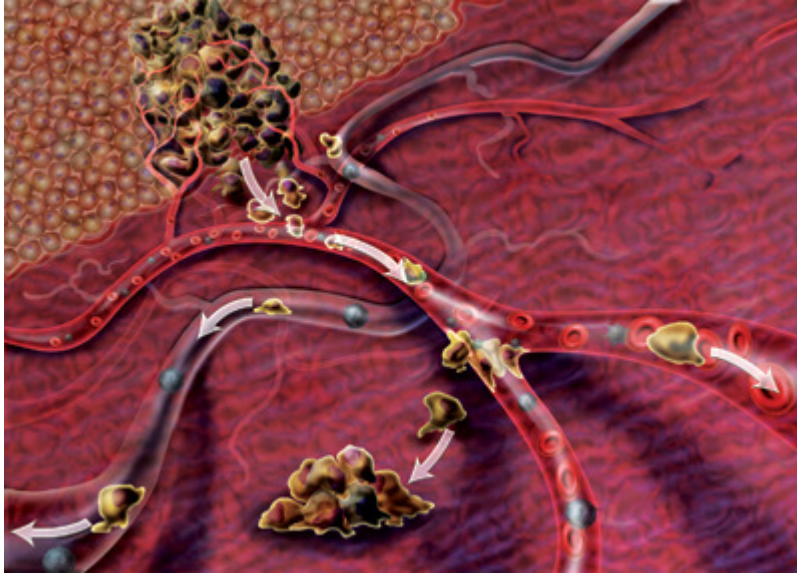
İnvazyon süresince kanser farklı doku katmanlarına veya aynı dokunun bölümlerine yayılır. İnvazyon çok basamaklı bir süreçtir ve kanser hücrelerinin doku yapısını değiştirmesine neden olur. Kanserleşme sürecinde bazal membrandaki epitel ve mezeneşim dokular tümör hücreleri tarafından tahrip edilir ve BM bariyerini geçen hücreler bağ doku ve kas tabakasına ilerler. Bağ dokuda tümör büyümeye devam ederken, komşu bağ dokuyu sıkıştırmaya başlar ve/veya ekstraselüler matriksi parçalayarak komşu dokuya sızdırır. Stromadaki invazyon tek taraflı değildir. Stromal hücrelerin farklı gen aktivitesiyle beraber invazyon desteklenir veya inhibe olur. Bu stromal reaksiyon, tümör hücrelerinin metastatik yeteneklerini belirleyen en önemli değişiktir. İnvazyon sürecinde, immün sistem hücreleri stroma hücrelerinin ve tümörlerin sinyalleriyle uyarılır ve buna yangı adı verilir. Yangı stromal reaksiyon gibi invazyonu destekleyebilir veya durdurabilir (Schulz, 2005).

Malign tümörün invazyon sürecindeki en önemli bileşeni anjiyogenezdir. Anjiyogenez yeni kapillerler oluşturarak tümörü kan ile besler ve gelişimine katkıda bulunur. Anjiyogenez normal kılcalların uzaması ve fibrinojen gibi plazma proteinlerinin damar dışına kaçmasına izin vermesi ile başlar. Perisit denilen damar dışı hücreleri dokunun matriksine uzanır. Damar etrafında MMP'ler tarafından tahrip edilmiş bazal membranı saran ve çatallaşmalar yapan kılcallar normal dokuyu veya kanser kitlesini çevrelerler. Normal anjiyogenezde endotelial hücreler normal bir proliferasyondan geçer. Ancak tümör anjiyogenezinde kılcallar düzensizdir. Anjiyogenezin kontrolünde yer alan pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler proteazlar tarafından ekstraselüler matriksten uzaklaşır. Bu da anjiyogenezin regülasyonunu engeller. Normal ve tümör anjiyogenezindeki diğer fark büyüme faktörleridir. Tümör dokular normal dokulara göre çok yüksek seviyede Fibroblast büyüme faktörleri(FGF'ler), epidermal büyüme faktörü(EGF) ve anjiyopoetin 1 ve 2 ve sitokin benzeri IL8 gibi Plateletten farklılaşmış büyüme faktörleri(PDGF'ler) ve ana faktör olan vasküler endotelial büyüme faktörü(VEGF) üretir. Bunlar kılcalları ve endotelial hücre proliferasyonunu uyarır. İnvazyonda kritik konuma, büyüyen veya göç eden tümör hücresi kan veya lenf damarına rastlayınca gelinir. Büyüyen tümör hücresi veya tek bir tümör hücresi damarı sıkıştırır ve damar içine geçen hücreler vücutta bir dolaşım yeteneği kazanırlar (Schulz, 2005).

Metastazın gelişip gelişmemesinden bağımsız olarak, invazyon karsinomanın geliştiği organın adipoz dokusunda, doku kapsülünde ve komşu organlarda işlemini sürdürür. Bu durumda invazyon sırasında karaciğer, böbrek, pankreas ve yumurtalık gibi bazı kanserlerde karınzarı boşluğundan sıçrama çok sık görülmektedir (Schulz, 2005).

Metastaz süresinde kanser hücreleri primer tümörden ayrılarak, kan ve lenf damarları ile yeni organlara göç edip ve uzak organları kolonize ettikleri bir dizi basamağı içerir (Schulz, 2005). Malign hücreler metastaz adayları olmadan önce bazı tümörjenik koşulları yerine getirmelidirler. Sınırsız çoğalabilmeli, köken aldıkları dokuların çevresel kısıtlamalarından kaçınabilmeli, anjiyogenez yani, yeni kapiller ve kan damarları oluşturarak kan tedariki sağlayabilmelidirler. Belki de en önemlisi yeni dokulara uyum sağlayabilme kapasitesi kazanmış olmasıdır (Hanahan and Weinberg, 2000). Tümörler büyüdükçe immün yanıtın oluşturduğu baskılar, oksijen derişiminin azalması ve dokuda asiditenin artışı gibi çevresel baskılara uyum sağlamalı ve tepki vermelidirler (Fidler et al., 2000).

Metastazların organlara dağılımı primer tümörün türüne ve yerine bağlıdır. Ayrıca metastaz tümörün dağılım yolu ile de ilintilidir. Örneğin sarkomalar kasları venöz drenajı yüzünden akciğerlerde metastaz yapma eğilimindedir; kolon karsinoma hücreleri portal dolaşıma girerek karaciğere erişebilirler (Boyle and Levin, 2008). Metastaz sırasında kanser hücreleri mutlaka damar dışına çıkmak zorundadır. Bu durum genelde mikropiller sistemi olan karaciğer, akciğer, böbrek ve kemik gibi organlarda gerçekleşir (Schulz, 2005). Metastatik hücreler lenfatik nodlarda da yayılma yapabilirler. Metastatik hücreler lenfatik kanallar boyunca bir noddan diğerine geçebilir ve drenaj nodlarında birikebilirler. Buradan eferent lenf nodlarına akarak birçok organa doğru ilerleyebilirler. (şekil 2.3.). Ancak nodların bazal membranın kütliği sebebiyle kapiler sisteme göre tümör hücresi girişi tehlikesi daha azdır. Bir tümör hücresinin lenf damarlarında ya da kapillerlerde yayılma eğilimi drenaj nodlarının subkapsüler sinüsündeki retiküler lifler ya da kan damarı iç çeperindeki endotelial hücreler gibi özgün yapılara yapışabilme yeteneğine bağlıdır (Chambers et al., 2002).



Şekil 2.3. Metastaz. Metastaz sırasında vücudun diğer yerlerine göç eden hücreler. Bu hücreler doku membranlarını parçalayabilirler. Lenfatik sistem ve kan damarlarına girebilen bu hücreler, buradan kaçarak farklı dokularda ikincil kanser formları oluşturabilmektedirler (www.anaximperator.wordpress.com).

Metastazların en çok geliştiği yer karaciğer, beyin, kemikler, akciğer ve adrenal bezlerdir. “seed and soil (tohum ve toprak)” hipotezine göre, kanser hücrelerinin köken aldıkları doku metastaz hedefine afinitesini etkilemektedir. Örneğin fizyolojik olarak kalsiyum gereksinimi olan meme kanseri hücreleri, kalsiyum açısından zengin olduğu için kemikte metastaz yapmayı seçerler (Jodele et al., 2006).

Metastaz ile yeni dokuya gelen kanser hücreleri dokunun matriksine yapışır ve hayatta kalmaya çalışır. Kanserli hücreler genişlemek için mikrometastaz yapar. Bu işlemler sırasında kanser hücreleri yıllarca sürebilecek uyku formuna geçebilirler (Schulz, 2005).

Güncel araştırmalar kan ve/veya lenf damarlarında metastatik hücrelerin saptanması ve primer tümörlerin metastaz oluşturma eğilimleri hakkında tahminde bulunmayı sağlayacak gen ifadesi örüntülerinin tanımlanması üzerinde odaklanmaktadır (Boyle and Levin, 2008).

2.4. Dolaşıma Karışmış Tümör Hücreleri (Circulating Tumor Cells-CTC's)

Tümör dokusundan ayrılarak, kan veya lenf damarları aracılığı ile vücutta dolaşan hücrelere dolaşıma karışmış tümör hücreleri adı verilmektedir. Dolaşım halinde olan bu hücreler, kanser hücrelerinin invaziv olma oranlarını tanımlarlar. Tümör hücrelerinin anjiyogenez ile gelişmesi ekstraselüler matriksi bozar ve tümör hücreleri hareketlilik kazanır. Ayrıca bölgesel üretilen fibroblast büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü ve epidermal büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü(TGF- β) tümör hücrelerinin hayatta kalmasını dengeler ve E-kaderin regülasyonu hücre adezyonunu bozar ve tümör invazivliğini artırır (Paterlini-Brechot and Bernali, 2007).

Dolaşıma karışmış tümör hücreleri göç ederken bir kümelenme oluştururlar. Kan damarlarında kümelenmiş olarak bulunan CTC'ler hayatta kalma, hedef organlarda mikrometastatik lezyon oluşturma ve proliferasyon potansiyellerini de arttırmış olurlar (Thiery and Sleeman, 2006).

Hedef organa ulaşan CTC'ler tekrar proliferasyon özelliğini kazanmak için epitel hücrelerine ihtiyaç duyarlar. Hedef organ ile metastatik tümör hücreleri arasındaki ilişki tam olarak çözülemese de hedef organa özgü kemokin moleküllerin göç eden tümör hücrelerini kan damarlarının duvarlarına yapışması için uyardığı ve kan damarından özgün hedef organa giriş olduğu düşünülmektedir (Fidler, 2003).

Aynı doğrultuda fikir birliği sağlamış güncel çalışmalar invazyonun erken dönemde ve bazen klinik olarak sessiz bir yayılım ile olabileceğini göstermektedir. Tümör hücre yayılımının, yıllar sonra ortaya çıkan birincil tümör gelişiminden önce olabileceği düşünülmektedir. Aslında, primer tümör hücrelerinin özgün bir gen ifade örüntüsüne sahip olabileceği ve bu örüntünün metastatik kolonilerle eşleştiği düşünülmektedir. Bu örüntünün, tümör ister sabit kalsın isterse de metastaz yapsın, erken tanı için yüksek hassasiyetle kullanılabileceği düşünülmektedir.

Epitel kökenli kanser hücrelerinin dolaşımda hayatta kalma süreleri düşüktür. Dolaşımdaki tümör hücreleri “anoikis” süreci ile kan damarlarında hızlıca kaybolurlar. Anoikis hücrelerin kendi dokusu dışına çıktığında programlı ölümdür. Ancak metastatik potansiyele sahip kanser hücrelerinin çoğu apoptozis inhibitörleri ile bağlantılı olarak anoikise dirençlidir. Dolaşıma karışmış tümör hücreleri tanımlanmış hayvanlarla yapılan çalışmalarda, CTC’lerin 1/40’ı mikrometastaza neden olduğu, makrometastaz için %0.01 proliferasyon görülmüştür. Bu metastatik eksikliğin, CTC’lerin apoptozise hassas olmasının, hedef organlardaki yalnız hücrelerin hayatta kalamamasının neden olabileceği, erken mikrometastazın başarısız olması sonucu anjiyogenezin başlaması ve makrometastazın devam etmesi olabileceği düşünülmektedir. Yalnız hücrelerin ve mikrometastazlar birkaç yıl için dormansiye girmiş olabilmekte ve bunda immun sistemin ve anjiyogenezin etkisinin olabileceği düşünülmektedir (Luzzi et al., 1998). Malign tümörler lenf, kan damarı ve omurilik sıvısı gibi metastaz yollarına kendiliğinden veya cerrahi müdahaleler sırasında girebilmektedirler. Yapılan çalışmalarda, CTC’lerin tümör belirteçleri olarak en uygun tanı yöntemi olduğu kabul edilmekte ve üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı bilinmektedir (Elshimali and Grody, 2006).

2.5. Tümör Belirteçleri

Birçok kanser tipi, Proto-onkogenlerin, tümör baskılayıcı genlerin veya DNA onarıcı genlerin mutasyon, amplifikasyon ve rekombinasyonu ile oluşan farklılıkların sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durumda, en doğru kanser tanı yöntemlerinden biri bireyin tümör hücrelerinde taşıdığı tanısal değeri olan biyobelirteçlerin belirlenmesidir (Schwab, 2008). Kanser gelişimi sırasında hem hücre morfoloji hem de moleküler imzalar değişir. Bu değişikliklerin biyobelirteçlerin yardımıyla hassas olarak fark

edilmesi kanserleri erken yakalama ve tanı koyma sürecini hızlandırabilir (Srivastava and Wagner, 2007).

Biyobelirteçler vücut sıvılarında kanser gibi patolojik bir durumun sinyalini veren DNA, RNA, protein veya metabolit gibi miktarı ölçülebilen moleküllerdir. Bir biyobelirteç, malign oluşum tarafından salgılanan molekül olabileceği gibi, vücudun tümöre karşı verdiği özgün bir yanıt da olabilir. Gen dizilimi, ifadesi ile protein yapısı ve işlevindeki değişiklikler kanserle ve kanserin gelişim aşamaları ile ilişkilendirilebilir (Srivastava and Wagner, 2007).

Normal biyolojik, patolojik süreçlerin veya tedaviye verilen cevabın indikatörleri olan biyobelirteçler insan vücudunda nükleik asitler, proteinler, karbonhidratlar, lipidler ve küçük metabolitler gibi biyokimyasal çeşitliliğe sahiptir ve kan veya doku örneklerinden biyomedikal görüntülemeye kadar geniş bir tanı yelpazesi içinde araştırılabilmektedir (Nass and Moses, 2007).

Tümör belirteçlerinin geliştirilmesi, doğru değerlendirilmesi ve onaylanması için beş aşamalı ilkeler belirlenmiştir. Bu ilkeler ile biyobelirteçlerin klinik uygulamalara geçişi kolaylaştırılmıştır.

Aşama 1: Potansiyel yarara sahip biyobelirteçlerin tanımlanmasını içeren buluş aşaması

Aşama 2: Belirteçlerin kanserli insanlar ile olmayanlar arasında ayırt etme açısından ayrıntılı analizlerin yapıldığı onaylama aşaması

Aşama 3: Belirteçlerin çeşitli araştırma gruplarından zaman içinde toplanmış dokuların karşı teste tabi tutularak klinik öncesi belirtecin hastalığı saptama aşaması.

Aşama 4: İleriye dönük çalışmaları içerir.

Aşama 5: Biyobelirtecin hem kanseri yakalamadaki başarısını hem de popülasyon üzerindeki toplam etkisini değerlendiren büyük ölçekli çalışmaları içerir.

İdeal bir biyobelirtecin duyarlılığı, seçiciliği büyük önem taşımaktadır. İyi bir tümör belirtecinin hem duyarlılığı hem de seçiciliği %100 olmalıdır ancak henüz böyle bir belirteç bulunamamıştır (www.cancer.gov). Tümör belirteçlerinin küçük boyuttaki tümörlerde de pozitif sonuç verebilmesi, sağlıklı bireylerde pozitif sonuç vermemesi,

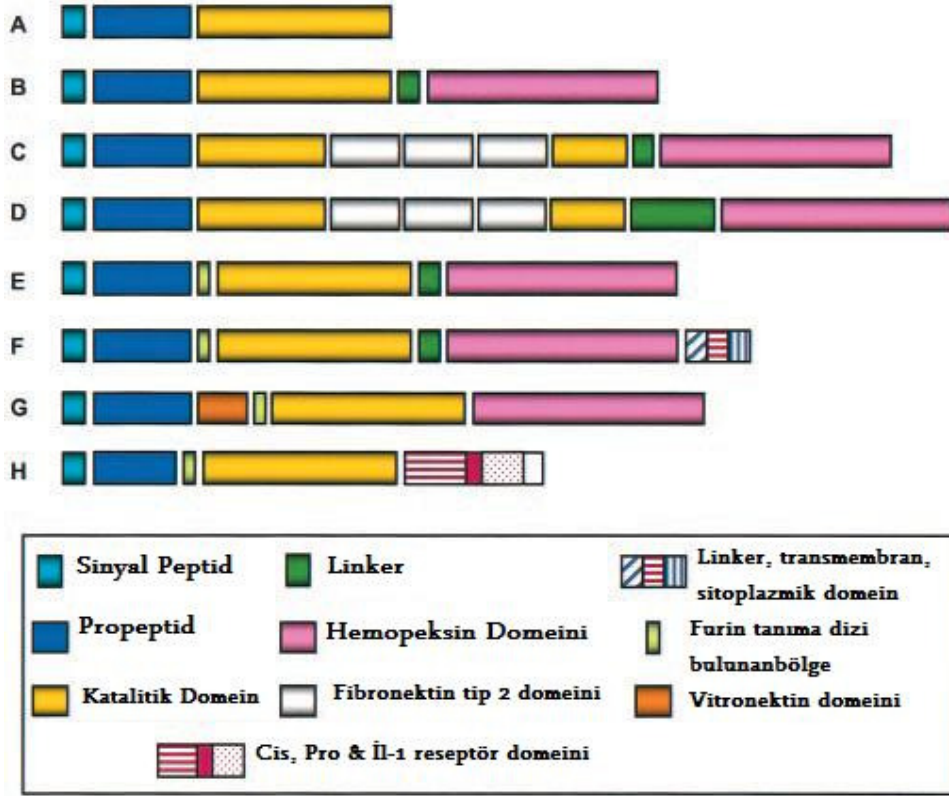
maliyetinin düşük olması, hızlı sonuç verebilmesi, moleküler deneylerin stabil olması ve belirteçlerin tekrarlanabilirliğinin olması gerekmektedir (Pepe et al., 2001).

2.5.1. Tümör Belirteci Olarak MMP'lerin Kullanılması

Tümör belirteci olarak kabul edilen MMP'lerin temel substratları ECM bileşenleridir. MMP ailesine ait en az 23 proteinaz, ekstraselüler matrikste kendi substratını parçalayabilmektedir (Çizelge 2.1. ve Çizelge 2.2.). MMP'ler genel özellikleri bakımından yapısında katalitik çinko iyonu bulundurlar. Klinik araştırmalar için MMP'lerin daha özgünleşmiş olan üyeleri tercih edilmektedir (Schulz, 2005).

Çizelge 2.1. Omurgalılarda Metalloproteinaz Ailesi

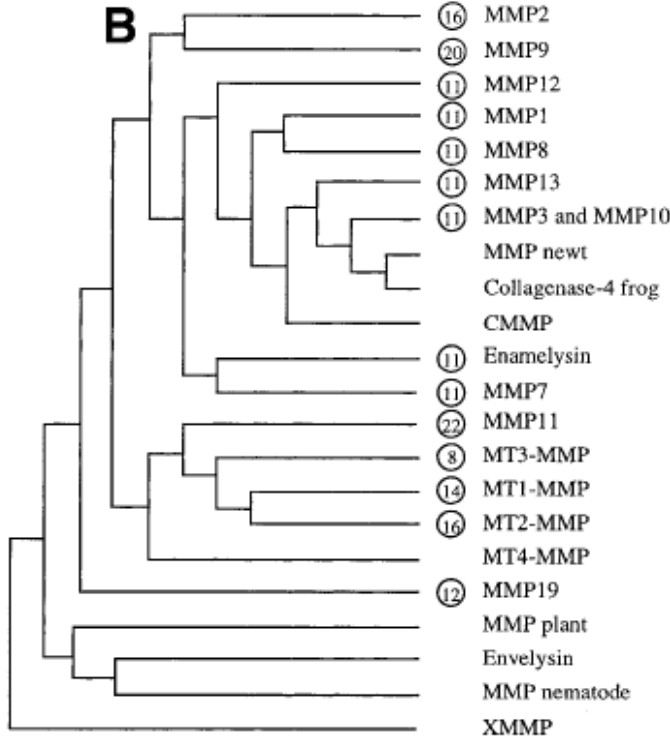
| Protein | MMP | Domeyn Kompozisyonu |
|-----------------------|--------|---------------------|
| Kollajenaz 1 | MMP-1 | B |
| Jelatinaz A | MMP-2 | C |
| Stromelizin 1 | MMP-3 | B |
| Matrilizin | MMP-7 | A |
| Kollajenaz 2 | MMP-8 | B |
| Jelatinaz B | MMP-9 | D |
| Stromelizin 2 | MMP-10 | B |
| Stromelizin 3 | MMP-11 | E |
| Makrofaj Elastaz | MMP-12 | B |
| Kollajenaz 3 | MMP-13 | B |
| MT1-MMP | MMP-14 | F |
| MT2-MMP | MMP-15 | F |
| MT3-MMP | MMP-16 | F |
| MT4-MMP | MMP-17 | F |
| Kollajenaz 4(zenopus) | MMP-18 | B |
| İsimiz | MMP-19 | B |
| Enamelizin | MMP-20 | B |
| XMMP | MMP-21 | G |
| CMMP | MMP-22 | B |
| İsimsiz | MMP-23 | H |



Şekil 2.4. Metalloproteinazların Domein yapısına göre sınıflandırılması

Ekstraselüler matriks (ECM) ve dolayısıyla onun önemli bir üyesi olan MMP'ler organizmanın normal gelişiminde kritik öneme sahiptir. Sinyal iletim sisteminde, hücre farklılaşmasında, hücre ölümlerinde hayati önem taşıyan ECM yüksek hassasiyetle korunmuş ve regüle edilmişlerdir. Bitkiler, omurgalı ve omurgasızlardan elde edilen 64 MMP ailesi üyesi enzimin incelenmesi ve analizleri sonucu MMP'lerin 23 alt ailesi olduğu saptanmıştır (Çizelge 2.1., 2.2.). Veriler alt ailelerin yapısındaki domeyn ve çoklu domeyn yapılarının erken evrimin olduğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca matrilizin sınıfındaki basit domeyn yapısı da geri evrim olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.4.). Omurgalıların yanı sıra omurgasızlarda ve bitkilerde de çoklu dizi analiz yöntemi ile MMP'ler tanımlanmıştır. Yapılan çalışmada peptid dizi analizi ile metal içerikli enzimin *B.fragilis*'de bulunması sonucu MMP'lerin çok eskiden beri var olduğunu düşündürmektedir. Bitkiler ve omurgasızlardaki MMP'ler kuvvetli bir bağlantı göstermektedir. Yalnız XMMP diğer MMP'lerden farklı bir yapıya sahiptir. Bitki ve omurgasız MMP'lerinin yapısında hemopeksin benzeri domeyni bulunmamaktadır. Sınıflandırmada kullanılan yöntemlerin birincisinde sinyal ve propeptid bölgeleri karşılaştırılmıştır. Evrimsel farklılıklar genlerdeki nokta mutasyonlar, delesyonlar, insersiyonlar göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır. Çoklu

dizilemede ikinci ve üçüncü sınıflandırmada çeşitlilik ve korunumda evrimsel önemi olan MMP'lerin katalitik ve hemopeksin benzeri domeynlerin dizileri göz önünde bulundurulmuştur (Çizelge 2.3.) (Massova et al., 1998).



Şekil 2.5. Dendogram; MMP'lerin evrimsel sınıflandırılması. Yuvarlak içindekiler insan kromozomal orijini için uygun olanlar.

MMP'lerin normal fizyolojik dokuların değişiminden ve ekstraselüler matriksin tüm bileşenlerinin degradasyonundan sorumlu olduğu bilinmektedir (Tutton et al., 2003). Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde MMP seviyesindeki artış, MMP'lerin metastaz, anjiyogenez ve hücre proliferasyonundaki etkinliği ile ilişkilendirilmektedir. MMP'lerin tümör hücrelerindeki seviyelerinin artmasının yanı sıra stromal ve yangısal hücrelerdeki aktivite artışı, MMP'lerin dolaşıma karışan tümör hücrelerinde de saptandığını göstermektedir (Zucker and Cao, 2005). Yapılan çalışmada serumlarında yüksek MMP-9 aktivitesi saptanan hastaların, düşük aktive belirlenen bireylere göre metastaza daha yatkın olduğu ve hayatta kalma sürelerinin kıaldığını gösterilmiştir (Nikkola et al., 2005). Bu durumda kanser hastalarından alınan serum örnekleri kullanılarak, dolaşımdaki MMP miktarlarının belirlenmesinin kanser tanısında kullanışlı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda

hassasiyetin yüksek ve sonuçların tekrar edilebilir olması önem taşımaktadır (Zucker and Cao, 2005).

2.5.2. MMP'lerin Belirteç Olarak Kullanıldığı Durumlar

Matriksinler olarak da bilinen MMP'ler embriyonik gelişim, organ morfogenezini, kemik yapılanması, anjiyogenez gibi birçok normal biyolojik süreçte ve artirit, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nefrit, nörolojik bozukluklar, ülser, karaciğer fibrözünü, amfizem gibi patolojik süreçlerde önemli rol alır (Parks and Mecham, 1998).

Örneğin amniyon epiteliyal hücreleri doğum öncesi apoptotik hücre ölümlerine maruz kalır ve bu olay kollojen degradasyonundan sorumlu olan MMP-13 ile ilişkilendirilmektedir (Lei et al., 1996). MMP'lerin patolojik işlevleri transgenik hayvanlar ve gen transfer teknikleri ile de kontrol edilmektedir. Fare blastosit büyümesi sırasında ve iskelet doku yapısının gelişiminde trofoblast dev hücrelerinde MMP-9 ifadesi kritik rol oynar (Reponen et al., 1994). MMP-9 eksikliği olan farelerde açık bir fenotipik bozukluğa rastlanmamıştır. Yapılan çalışmada MMP-9 eksikliğinin büyük ihtimalle diğer MMP'ler tarafından giderilmekte olduğu düşünülmektedir (Liu et al., 1998). MMP-12 eksikliği olan ve uzun süre sigara dumanına maruz kalan farelerde, yabancı tipte gelişmesine rağmen amfizem hastalığı gelişmemiştir (Shipley et al., 1996). MMP eksikliği olan Nakavt fareler ile yapılan çalışmalarda ise bağ doku anomalilikleri ile cücelik, osteopeni ve artirit hastalıkları çalışılmaktadır (Holmbeck et al., 1999).

MMP'lerin ekstraselüler matriksin degradasyonundaki rolünden dolayı patolojide önemli bir rol aldığı bilinmektedir. Daha önceki araştırmalarda da belirlendiği gibi matriks metalloproteinazlar ECM'nin yeniden yapılandırılmasında ciddi bir öneme sahiptir. Çinko bağımlı endopeptidaz olan MMP'ler normal dokuların zorunlu bileşeni iken patolojik durumlarda da belirteç olarak önemi bulunmaktadır (Chen et al., 2005).

Dolaşıma karışmış matriks metalloproteinazların miktarının ölçümü, kalp rahatsızlıkları ve ventriküler yapılanmada biyobelirteç olarak potansiyele sahiptir. MMP'lerin ekokardiyografik parametreler ile ciddi anlamda bağlantılı olduğu ve gelecek araştırmalar için umut vaat ettiği saptanmıştır. Yapılan çalışmada sistolik kalp rahatsızlığı çeken hastalarda periferik kan plazmasında MMP miktarı R+D sistem ELISA yöntemi ile kontrol edilmiştir. Yapılan bu çalışmadaki sonuçlarla MMP-9 ile

sistolik kalp rahatsızlığı çeken hastalar arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Ancak bu konu hakkında birçok çalışma yapılmaktadır. (Vorovich et al., 2008). Ankilozan Spondilit hastalarının serumlarındaki MMP-3 miktarlarını ELİSA yöntemi ile ölçerek hastalık ile MMP aktivasyonu arasındaki ilişki ölçülmüştür. MMP-3 (stromelizin-1), agregan, fibronektin, laminin ve kollajen içerikli ECM bileşenlerinin hidrolizine neden olmaktadır (Chen et al., 2005).

Çizelge 2.2. MMP'ler ve Substratları (Kahari and Saarialho-Kere,1999)

| Enzim | Substratlar |
|----------------------------|---|
| Kollajenazlar | |
| Kollajenaz-1(MMP-1) | Kollajen I,II,III,VII,VIII,X, jelatin,agregan, versikan,proteoglikan bağlama proteini,L-selektin, entaktin, tenaskin,serpinler, α2-makroglobulin, TNF öncülü,MBP,IGFP-3 |
| Kollajenaz-2(MMP-8) | Kollajen I,II,III,VII,VIII,X, jelatin,agregan, fibronektin, laminin, serpinler, α2-makroglobulin |
| Kollajenaz-3(MMP-13) | Kollajen I,II,III,VII,VIII,X, jelatin,agregan, perlekan, fibronektin, laminin, tenaskin, fibrilin,SPARC, serpinler, PAI |
| Jelatinazlar | |
| Jelatinaz A, 72kDa(MMP-2) | Jelatin, Kollajen I,II,III,VII,VIII,X, agregan, versikan, proteoglikan bağlama proteini, fibronektin, laminin, laminin-5, tenaskin, fibrilin, SPARC, elastin, vitronektin, α2-makroglobulin, TNF öncülü,MBP,IGFP-3 |
| Jelatinaz B, 92 kDa(MMP-9) | Jelatin, Kollajen I,II,III,VII,VIII,X, agregan, versikan,nidojen, proteoglikan bağlama proteini, fibronektin, fibrilin, SPARC, entaktin, elastin, vitronektin,α1-antitripsin, α2-makroglobulin, TNF öncülü, MBP,anjyostatin |
| Stromelizinler | |
| Stromelizin-1(MMP-3) | Jelatin, Kollajen I,II,III,VII,VIII,X, agregan, versikan,nidojen, proteoglikan bağlama proteini, fibronektin, tenaskin, fibrilin, SPARC, entaktin, elastin, TNF öncülü,MBP,IGFP-3 |
| Stromelizin-2 (MMP-10) | Kollajen III,IV,V jelatin,agregan,nidojen, proteoglikan bağlama proteini, fibronektin, elastin |
| Stromelizin-3(MMP-11) | α1-proteinaz inhibitörü,agregan(zayıf),fibronektin,laminin |
| Matrilizin(MMP-7) | Kollajen IV,jelatin,agregan,nidojen, fibronektin, elastin, laminin, tenaskin,versikan SPARC,vitronektin,MBP,anjyostatin |
| Metalloelastaz (MMP-12) | Kollajen IV,jelatin,agregan,nidojen, fibronektin, elastin, fibrilin, vitronektin, α1-antitripsin, TNF öncülü, anjyostatin |
| Membran Tip MMP'ler | |
| MT1-MMP(MMP-14) | Kollajen I,II,III, jelatin, nidojen, agregan, perlekan, fibronektin, laminin, tenaskin, vitronektin, fibrilin |
| MT2-MMP(MMP-15) | agregan, perlekan, fibronektin, laminin, tenaskin |
| MT3-MMP(MMP-16) | Jelatin,kaskin |

| | |
|----------------------|---------------------|
| MT4-MMP(MMP-17) | Jelatin, TNF öncülü |
| MT-5MMP(MMP-24) | Tanımlanmamış |
| Diğer MMP'ler | |
| MMP-18&-19 | Jelatin |
| Enamelizin(MMP-20) | amelojenin |
| MMP-21&-22&-23 | Tanımlanmamış |

Matriksinler ECM'nin yapısını bozarak kanser hücrelerinin yayılımından da sorumludurlar. Ayrıca birincil ve metastatik tümörlerin büyümesinde çevresel desteğin sağlanmasında da önemli rol oynarlar. Spontan adenom polipoz koli (APC) gen mutasyonunun geliştiği farelerde intestinal tümör gelişimi gözlenirken MMP-7 eksiği olanlarda tümör gelişiminde ve büyümesinde bir azalma görülmüştür (Masson et al., 1998).

Matriks metalloproteinazların gen ifadelerinin yanı sıra post-translasyonel zimojenik ve enzim inhibitör bağlanmaları ile regüle edildiği bilinmektedir. Proteinaz aktivasyonu, zimojenik basamaklar ile düzenlenmektedir. Substrat jel elektroforezi veya Zimografi yaygın olarak tümör dokularında ya da tümör hücre besi yerlerindeki MMP miktarlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntem, hücrel MMP profilleri hakkında hassas ve hızlı bir şekilde fikir edinilmesinde kullanılmaktadır (Birkedal-Hansen, 1995).

Sıklıkla kullanılan bu yöntem bazı yanlış anlamalara da sebep olmaktadır. MMP zimojenleri bu deney ortamında, sodyum dodesil sülfat ortamında proteolitik aktiviteleri gözlemlenmekte olup ayrıca MMP/TIMP (metalloproteinazların doku inhibitörü) kompleksinin bağlı olmadığı bir elektroforetik ortamda deney gerçekleştirilmektedir. Bu durum normalden fazla enzimatik aktiviteyi gösterebilmektedir.

Bu durumlar göz önüne alındığında zimografi yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar bir başka deney ile kontrol edilebilmektedir. Floresan peptid MMP substratları ile tanımlanan ve peptidaz aktivitesinin görüntülenmesini sağlayan yöntemler bulunmaktadır. ELISA yöntemi de Zimografi sonuçlarının kontrolü açısından yaygın kullanılan yöntemler arasındadır. Ayrıca daha gelişmiş olarak

MMP eksikliği oluşturulmuş nakavt fareler ile gen inaktivasyonu kontrolü yapılmaktadır (Ellerbroek and Stack, 1999).

Zimografi yöntemi hızlı ve hassas sonuçlarından dolayı kanserli doku ve serumlardaki MMP aktivasyon miktarı için uygun bir yöntem olarak görülmektedir. Bu nedenle gastrointestinal tümörlü hastalarda da en sık tercih edilen Zimografi yönteminde MMP ailesinden daha çok jelatinaz sınıfı matriksinler tercih edilmektedir.

2.5.3. Matriks Metalloproteinazların Kanserli Dokulardaki Aktivasyonu

Kanser hücrelerinin metastatik potansiyel kazanmaları için aday hücrelerin birincil tümörden kopmaları ve çevreleyen hücre dışı matriksi (ECM) oluşturan protein yapılarına bağlanarak bunları bozmaları gerekir. Solid tümörlerin çoğu epitel kökenlidir ve normalde epitelyum doku bazal membran tarafından stroma ve mezenşimal dokulardan ayrılır. İn situ karsinomadan metastatik potansiyel taşıyan invaziv tümöre geçişte ilk adım bazal membranın oluşturduğu bariyerin aşılmasıdır (Engbring and Kleinman, 2003).

Bazal membran Kollajen IV, laminin, entaktin ve heparan sülfat gibi proteoglikanları içeren yapısal bir protein kompleksinden oluşur. Tümör hücrelerinin bazal membran ve ECM bileşenleri ile etkileşimi, yapışma ve matriks bozunması olmak üzere iki kritik faz içerir (Boyle and Levin, 2008).

Kanser hücrelerinde metastazın başlaması için genellikle, sıkı bağlantılar, adherens bağlantıları ve desmozomlar gibi hücre-hücre bağlantılarının yapıları ile E-Kadherin ve benzeri hücreler arası yapışma moleküllerinin ifadesinde değişimler oluşur (Glukhova, Deugnier and Thiery, 1995). Ayrıca epitel hücreler integrin gibi başka molekül sınıfları ile bazal membran ve ECM ile temas kurarlar. Özellikle integrinlerin ifade örüntülerindeki değişikliklerin kanser hücrelerinin başarılı bir göç için bir ön koşul olarak mikro çevrelerindeki değişimlere uyarlanması üzerinde büyük etkileri olabilmektedir. Hücre dışındaki ECM'yi hücre içindeki hücre iskeletiyle birleştiren ve böylece hücreleri ECM bileşenlerine yapıştıran integrinlerin kanser hücrelerindeki ifadelerinde birçok farklılık olduğu belirlenmiştir (Moschos et al., 2007). Ayrıca immünooglobulin süper ailesi üyelerinin ifade değişimleri ile tümör hücreleri üzerindeki integrinlerle etkileşime girerler ve bunların damar dışına çıkmasını kolaylaştırırlar.

Epitel hücrelerin büzülmesini tetikleyerek, damarın bazal membranını açığa çıkartır ve tümör hücrelerinin açığındaki proteinlere yapışmak üzere girişini sağlar (Kazerounian, Yee and Lawler, 2008).

Matriks bozulmasında ise yayılcı kanser hücrelerinde ECM bileşenlerinin bozulmasında rol alan birçok enzimin ifadesi artarken, bu enzimlerin düzenleyen moleküllerin ifadesi azalır; bu şekilde kanser hücrelerinin yayılması kolaylaşır (Bogenrieder and Herlyn, 2003). Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ECM bileşenlerinin bozulmasında rol oynayan enzimlerin önemli bir grubudur. MMP ailesi substrat tercihleri farklı olan, çok sayıda enzim içerir. Bunlar Kollajenaz, jelatinaz, stromelizindir. MMP enzim ailesinin tüm üyelerinde bir baş bölgesi ve substrat bağlanmasında rol alan çinko içeren, yüksek düzeyde korunmuş bir katalitik bölge bulunur. Bunlar normal gelişimde ve morfogenezde önemli rol oynarlar ve etkinlikleri sıkı kontrol altındadır. Aktivasyon, baş bölgesinin kesilmesine bağlıdır ve endojen MMP inhibitörleri tarafından düzenlenir; bunların arasında α -2 makroglobulin ve metalloproteinazların doku inhibitörleri (Tissue Inhibitors of MMPs, TIMP'ler) sayılabilir. MMP'ler ve MMP inhibitörleri arasındaki dengesizlik hücre dışı matriksin aşırı bozulmasına yol açarak, kanser hücrelerinin kendilerini çevreleyen dokuları istila etmesini ve metastaz oluşturmasını sağlar. Üzerinde en çok çalışma yapılmış MMP'ler MMP-2 (Jelatinaz A) ve MMP-9 (Jelatinaz B)'dir. Mesane, meme, kolon, prostat, akciğer, özofagus ve gastrik kanser dokularında etkin MMP-2 veya MMP-9 formlarının düzeylerinin arttığına dair açık kanıtlar vardır. Bu ifade artışı kanser hücrelerinde veya çevredeki normal stromal hücrelerde olabilir ki, bu da stromal hücrelerin kanser hücrelerinin göçü, yayılması ve metastazını kolaylaştıran faktörlerin salgılamasını tetiklediğine işaret etmektedir (Duffy et al., 2008).

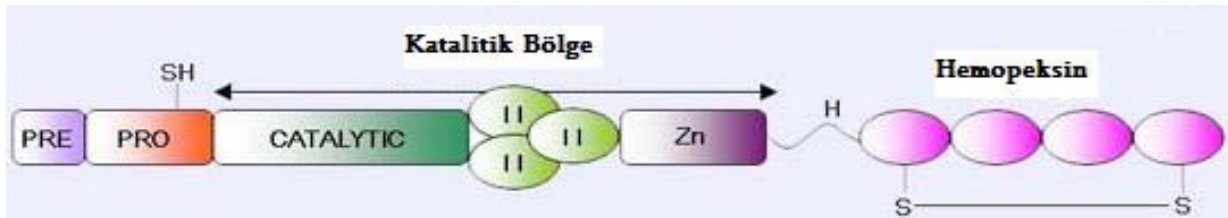
MMP'ler, ECM bileşenlerini bozmanın yanı sıra anjiyogenezdeki rolleri nedeniyle metastazın teşvik edilmesinde dolaylı bir etkiye sahiptir. Kapiller filiz oluşumu, stromada lokalize proteinleri gerektiren fizyolojik bir süreçtir. MMP-9, ECM'de sekestrasyon (ayırma) yolu ile vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) açığa çıkartarak, kanser ilerlemesi sırasında oluşan "anjiyogenik şalter" de rol oynar. Ayrıca bu proteazlar, büyüme faktörlerinin membrana bağlı ön biçimlerin bölge dışı kesilmesi ve kanser hücreleri için mitojenik ve kemotaksik olan peptidlerin salınması yoluyla da sürekli tümör büyümesine katkıda bulunurlar (Christiansen and Rajasekaran, 2006).

2.6. Tez Çalışmasında Kullanılan Matriks Metalloproteinazlar

2.6.1. Matriks Metalloproteinaz – 2(MMP-2;Jelatinaz A)

Matriksinler, 3 tane aktif çinko bağlayıcı histidin rezidusuna sahip, metzincin ailesinin üyesi olan endopeptidazlardır (Benbow and Brinckerhoff, 1997). Sekiz farklı domeyn kompozisyonuna sahiptirler ve substrat özgüllüklerine göre sınıflandırılırlar (Çizelge.2.4) (Nagase and Woessner, 1999).

Bir Jelatinaz olan MMP-2, Zn^{+2} bağımlı bir endopeptidaz olup zimojen formda sentezlenir ve salgılanır. Ekstraselüler matriksin iki ana bileşiği olan tip IV kollajen ve jelatinin degradasyonunda kilit bir rol oynayan MMP-2 aynı zamanda kollajenaz tip IV-A olarak da isimlendirilir. MMP-2 geni, kromozom 16 q13-q21 lokalizasyonunda bulunmaktadır ve 13 ekzon içermektedir. Protein yapısında pre, pro, katalitik, bağlanma ve hemopeksin domeynlerini içermektedir (Şekil 2.4.). Pre bölgesi sinyal sekansını, pro bölgesi serbest çinko bağlama tiyol (SH) grubunu, katalitik bölge çinko bağlanma bölgesini ve kollajen fibronektin tip II bölgelerini içermektedir. MMP-2 jelatinaz A proteininin aktif formu 68 kDa iken, pro-MMP-2 72 kDa ağırlığındadır (Morgunova et al., 1999).



Şekil 2.6. MMP-2 proteininin yapısı (www.atlasgeneticsoncology.org'dan alınmıştır.)

Başlangıç bölgesi olan pre domeini N-terminal sinyal sekansı içerir ve proteini endoplazmik retikulumla yönlendirir. Pre domeinini takip eden Pro domeini herhangi bir tahrip veya ayrılma olana kadar enzimin sessiz kalmasını devam ettirir. Hemopeksin domeini doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP) bağlanma ve bazı substratların bağlanma bölgelerini, membran aktivasyon ve bazı proteolitik aktivitelerin olduğu bölgeleri içerir. MMP-2'nin katalitik domeininde zengin sistein tekrarı olan üçlü kuyruk dizisi bulunmaktadır. Bu bölge kollajen tip II bağlanan fibronektin tekrarlarına benzemektedir. Bu benzerlik domeine kollajen ve elastine bağlanma ve ayırma yeteneği sağlamaktadır (Morgunova et al., 1999).

MMP-2 aktivitesinin düzenlenmesi birçok aşamadan oluşmaktadır. TIMP-2 ve hücre yüzeyi reseptörü MT1-MMP düzenlemede kritik belirleyicilerdir. Yüksek derecede TIMP-2 ve MT1-MMP aktivasyonu, MMP-2 ile üçlü bir form oluşturarak pro-MMP-2 aktivasyonunu inhibe ederler. Ancak ortamda düşük TIMP-2 bulunması, serbest MT1-MMP oluşumuna sebep olacağından, MMP-2 aktivasyonu gerçekleşebilmektedir. Veriler, TIMP-2, MMP-2 ve MT1-MMP ifadelerinin birlikte kompleks bir düzenleme ile kontrol edildiği belirtmektedir. Pro-MMP-2 aktivasyonunun osteopontin, endotelial hücrelerdeki IL-8 gibi bazı sitokinler gibi ekstraselüler matriks proteinleriyle de indüklendiği belirlenmiştir (Zeng et al., 1999).

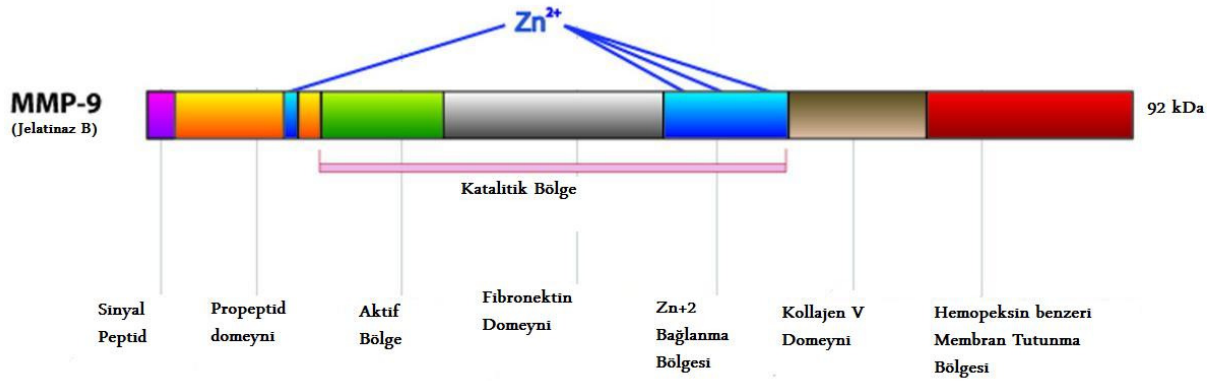
MMP-2 ifadesi, transkripsiyonal ve post-transkripsiyonal olarak düzenlenmektedir. MMP-2'nin birincil görevi ekstraselüler matriksin degradasyonudur. Proteolitik olarak jelatini ve tip IV, V, VII, IX, X kollajeni parçalar. Fizyolojik olarak MMP-2 diğer matriksinlerle bağlantılı çalışır. Embriyonik gelişim, anjiyogenez, ovulasyon, meme bezi gelişimi ve yaraların iyileşmesi gibi normal doku yapılanmasında rol oynamaktadır. Ayrıca kemik formasyonu ve rezorpsiyonunda görev almaktadır (Zeng et al., 1999).

MMP-2 geninin 2. ekzonunun 101. kodonunda G'nin A'ya dönüşümü Suudi ailelerde gözlemlenmiş ve idiyopatik multisentrik osteoliz hastalığına neden olmaktadır. Bu değişim pro-domeinde histidin yerine arjinin gelmesine sebep olmakta ve türler arasında yüksek korunuma sahip bu bölge otoproteolitik MMP-2 aktivasyonu içermektedir (Martignetti et al., 2001). Winchester Sendromunda ise ekzon 8'deki G-A değişimi, katalitik domeinde glutamik asit-lizin değişimine neden olur. Glutamik asit tüm metalloproteinazların peptidaz aktivasyonu için gereklidir (Zankl et al., 2005).

MMP-2 ifadesi genellikle kolorektal tümörler, gastrik karsinoma, pankreatik karsinoma, meme ve ağız kanseri, Melonoma, malignant glioma, kondrosarkoma, gastrointestinal adenokarsinomları gibi invaziv ve yüksek tümörjenik kanserlerde görülmektedir. MMP'ler invaziv kanserlerde tümör gelişimini ve metastazı bazal membran ve bağ doku degradasyonu ile artırır. ECM degradasyonu sadece tümör göçüne yardım etmekle kalmayıp yeterli boşluğu sağlayarak tümör gelişimini şekillendirir. Ayrıca MMP-2 ve diğer üyeler kanserleşmede çok kritik bir süreç olan anjiyogenezde önemli rol oynamaktadır (John and Tuszynski, 2001).

2.6.2. Matriks Metalloproteinaz - 9 (MMP-9; Jelatinaz B)

Kollajenaz tip IV-B olarak da isimlendirilen MMP-9 geni 20.kromozomun q11.2-q13.1 bölgesinde bulunmaktadır. 13 ekzon içermektedir. MMP-9 proteinin aktif formu 83kDa ağırlındayken pro-formu 92kDa ağırlındadır (Şekil 2.5.) (Nagase and Woessner, 2008).



Şekil 2.7. MMP-9 proteininin yapısı (www.arthritis-research.com'dan alınmıştır.)

Zn⁺² bağımlı endopeptidaz MMP-9 monomerik formu olan zimojen olarak sentezlenir ve salgılanır. Jelatinaz B, yapısal olarak aynı ailenin diğer üyesi jelatinaz A (MMP-2) ile aynı yapısal özellikleri taşır. N-terminal sinyal dizisini proteinin başlangıç formu olan Pre domeininde bulundurur. Serbest çinko bağlayan tiyol (SH) grubunu bulunduran propeptid kısmını taşıyan Pro domeini, enzimi ayrılma veya bir tahrip oluşuncaya kadar inaktif tutar. Katalitik bölge ise korunmuş çinko bağlanma bölgesini bulundurur. Katalitik bölgeye bağlı Hemopeksin/vitronektin benzeri domeini doku MMP inhibitörü (TIMP) bağlanma bölgesi, membran aktivasyonu ve bazı substrat bağlanma ve proteolitik aktivitelerinin bulunduğu bölgeyi içeriğinde bulundurmaktadır. MMP-9'un katalitik domeininde zengin sistein tekrarı olan üçlü kuyruk dizisi bulunmaktadır. Bu bölge kollajen tip II bağlanan fibronektin tekrarlarına benzemektedir. Bu benzerlik domeine kollajen ve elastine bağlanma ve ayırma yeteneği sağlamaktadır (Morgunova et al., 1999).

Diğer proteolitik enzimler gibi MMP-9 önce inaktif proenzim veya zimojenler olarak sentezlenir. Aktivasyonu plazminojen akitivatörü ve plazmin sistemi ile gerçekleşmektedir. MMP-9'un regülasyonu TIMP-3 ile kontrol altında tutulmaktadır.

MMP-9 ifadesi interlökinler, interferonlar, epidermal büyüme faktörü, sinir gelişim faktörü, temel fibroblast gelişme faktörü, vasküler endotelial gelişme faktörü, trombosit gelişimi faktörü, tümör nekrozu faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü, ekstraselüler matriks metalloproteinaz indükleyici EMMPRIN ve osteopontin gibi bazı sitokinler ve büyüme faktörleri ile düzenlenmektedir (Zeng et al., 1999).

Birincil görevi ekstraselüler matriksi parçalamak olan MMP-9, proteolitik olarak dekorin, elastin, fibrilin, laminin, jelatin ve tip IV, V, XI ve XVI kollajeni parçalar. Jelatinaz B ayrıca, büyüme faktörü benzeri pro-TGFb ve pro-TNFa'yı da aktive eder. MMP-9 akson gelişimi, embriyonik gelişim, anjiyogenez, ovulasyon, meme bezi oluşumu ve yara iyileşmesi gibi normal doku yapılanmasında büyük rol oynamaktadır (Zeng et al., 1999).

MMP-9 ve MMP-2 ifadesine, kolorektal tümörler, gastrik karsinoma, pankreatik karsinoma, meme ve ağız kanseri, melanoma, malignan glioma, kondrosarkoma, gastrointestinal adenokarsinoma gibi invaziv ve yüksek tümörjenik kanserlerde sıklıkla rastlanmaktadır. MMP-9 invaziv kanserlerde tümör gelişimine ve metastaza ekstraselüler matriks, bazal membran ve bağ dokusunu zedeleyerek katkıda bulunur. MMP-2 ve MMP-9 etkili bir şekilde kollajen IV ve laminin-5'i parçalayabildiği ve bu iki molekül ECM'nin ana bileşenleri oldukları için metastatik kanser hücrelerinin bazal membrandan geçişini kolaylaştırdıkları bilinmektedir (Jhon and Tuszynski, 2001). Bunun yanı sıra, MMP-9'un sessiz formunun aktif formuna oranının, tümör gelişimi ile arttığı gözlemlenmektedir. MMP-9'un anjiyogenik molekül olarak bilinen vasküler endotelial gelişim faktörünün salınımı ile anjiyogenezde rol oynadığı bilinmektedir. Artirit, otozomal resesif osteolizis bozukluğu, koroner arter hastalığı, amfizem ve diyabetik retinopati gibi hastalıklarda da MMP-9'un aktivasyonu yapılan çalışmalarla gözlemlenmiştir (Matsuyama et al., 2003).

3.MATERYAL VE METOT

3.1.Hasta ve Kontrol Örneklerinin Toplanması

Yapılan tez çalışmasında, hasta grubunu Gülhane Askeri Tıp Akademisi Gastroenteroloji Polikliniği'nde endoskopik ve kolonoskopik incelemeler sonucu tümör varlığı saptanan ve kanser/metastaz tanısı konulan bireyler oluşturmaktadır. Çalışmada kullanılan tümör örnekleri kolorektal, mide ve özefagus olmak üzere üç tiptir. Kontrol grubunu oluşturan 40 sağlıklı bireyde ise tümör varlığına dair hiçbir bulgu yoktur. Hasta ve kontrol grubu bireyleri gönüllülük esasına göre çalışmaya dahil edilmiştir. Yapılan çalışmada hasta ve kontrol bireylerinden etik kurallar çerçevesinde yaklaşık 10 ml kan örneği toplanmıştır. Toplanan periferik kan örnekleri, hemoliz olmadan 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Süpernatant temiz bir tüpe aktarılmıştır. Örnekler -70° C'de saklanmıştır.

3.2. Jelatin Zimografi Yöntemi İçin Gerekli Tampon ve Solüsyonların Hazırlanması

3.2.1.Tamponlar

Zimografi yöntemi örneklerin bir dizi işlemde geçmesi ve bu sırada birçok tampon ve çözeltinin kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Kullanılan tampon çözeltiler aşağıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

Tris Tamponu

Akrilamid/Bisakrilamid karışımında ve jel hazırlanırken kullanılmak üzere 1.5 M'lık Tris tampon hazırlanmıştır.

1.5 M 500ml Tris tamponu için:

-Gerekli miktardaki Tris-HCl, deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlanıp tamponun pH'sı 8,8'e ayarlanmıştır ve hazırlanan tampon +4° C'de saklanmıştır.

Laemmler Tamponu

Serum örneklerini zimografi jelinde yürütürken kullanılmıştır. Örnekler yürütülmeden önce iki saat 37° C'de Laemmler tamponu ile inkübe edilmiştir.

20 ml Laemmlı tamponu için:

-125 mM Tris-HCl

-%10 SDS (Sodyumdodesilsülfat)

-%0.0002 bromfenol mavisi son hacim 20 ml olacak şekilde deiyonize suda çözülmüştür. Hazırlanan tampon +4° C'de saklanmıştır.

Yürütme Tamponu

Zimografi jelinin yürütülmesi için kullanılmıştır.

1L tampon için:

-25 mM Tris-HCl

-144 gr Glisin

-10gr SDS son hacim 1 L olacak şekilde deiyonize suda çözülmüştür ve pH 8,8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon +4° C'de saklanmıştır.

-

3.2.2.Yürütme Sonrası Tamponlar, Çözeltiler ve Ayraçlar

Yürütme sonrasında Zimografi jeli 3 tane tampon ile inkübasyona sokulmuştur. Bu tamponların hazırlanması için kullanılan zimotampon aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

1L pH 7,5 zimotampon için:

-30,5gr Tris-baz

-1gr Sodyum azid son hacim 1 L olacak şekilde deiyonize suda çözülmüştür. Hazırlanan tampon +4° C'de saklanmıştır.

Zimotampon kullanılarak hazırlanan 3 tane inkübasyon çözeltisi aşağıdaki gibidir. Hazırlanan çözeltiler +4° C'de saklanmıştır.

- Cözelti 1(400ml): 80ml 5X zımotampon, 10ml triton X-100, 310 ml deiyonize su içerir.

- Cözelti 2 (300ml): 60ml 5X zımotampon, 10ml triton X-100, 30µl 10mM ZnCl₂, 17mg CaCl₂, 230ml deiyonize su içerir.

- Cözelti 3 (300ml): 60ml 5X zımotampon, 30µl 10mM ZnCl₂, 17mg CaCl₂, 50µl Brij 35, 240ml deiyonize su içerir.

İnkübasyon sonrası jelin boyanması ve ardından boyamanın durdurulması için iki ayrı çözelti daha hazırlanmıştır.

- Boyama Çözeltisi: %20 asetik asit, %20 metanol, %0.5 Commassie Blue (G-250) içeren çözelti, son hacme deiyonize su ile tamamlanıp +4° C'de saklanmıştır.

- Destaining Çözeltisi: %20 asetik asit, %20 metanol, %60 deiyonize su içermektedir. Çözelti +4° C'de saklanmıştır.

Zimografi Jeli için kullanılan ayraçlar ve çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

-%40'lık Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi:

38,0 gr Akrilamid ve 2,0 gr Bisakrilamid son hacim 100 ml olacak şekilde deiyonize su ile çözülüp, çözelti alüminyum folyo ile ışık almayacak şekilde +4°C'de saklanmıştır.

-%10'luk Sodyum dodesil sülfat çözeltisi(SDS):

Ticari SDS' ten 3 gr tartılarak 30ml'ye deiyonize su ile tamamlanıp, steril falkon tüpünde +4°C'de saklanmıştır.

- Jelatin Çözeltisi:

Ticari jelatinden 0,3 gr tartılarak 30ml deiyonize su ile çözdürülmüştür. Jelatinin iyi çözülmesi için su 60°C' ye ısıtılmıştır. Ancak deiyonize su hiçbir şekilde kaynatılmamalıdır. Çözdürülen jelatin steril eppendorf tüplere bölünerek -20° C' de saklanmıştır.

- Amonyum persülfat (APS):

Ticari olarak satılan APS'den 0,03 gr tartılarak 300 µl deiyonize su ile homojen olarak karıştırılmış ve çözelti her bir jel için taze olarak hazırlanmıştır.

3.3. Jelatin Zimografi Yöntemi

Zimografi, proteoglikan (Barrett, 1966), jelatin (Itoh et al.,1998) ve kazein (Leber and Balkwill,1997; Zeng et al.,2002) substratlı jellerde proteinazların miktarını ve ağırlığını görsel olarak belirlemeye yarayan elektroforetik bir tekniktir. Genellikle bu yöntem karmaşık biyolojik örneklerin proteinaz kompozisyonunu belirlemede etkin olarak kullanılmaktadır, çünkü jeldeki görüntüleme tamamen proteolitik aktiviteye bağlıdır (Feitosa et al., 1998; Jain et al., 2001). Zimografi yöntemi, Matriks Metalloproteinaz çalışmaları için de sıklıkla tercih edilmektedir (Kjeldsen et al., 1993).

Elektroforez ve renatürasyon sonrası aktivite gösteren tüm proteinazlar için zimografi yöntemi kullanılmaktadır. Zimografi jelini hazırlarken dikkat edilmesi gereken önemli noktalardan biri, substratı jelin içine homojen bir şekilde karıştırmaktır. Proteinaz içeren örnekler Sodyum dodesil sülfatla (SDS) denatüre edilmiştir. Bu sırada örnekler hiçbir şekilde kaynatılmamıştır. Daha sonra örnekler elektroforezde yürütülmüştür. Yürütülen örnekler iyonik olmayan SDS içerikli Triton X-100 içeren deterjan çözeltisi ile renatüre edilmiştir. Daha sonra jelin enzimatik aktivitesini kazanabilmesi için uygun çözeltilerde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası aktivite gösteren enzimlerin jelatini parçalayıp parçalayamadığını gözlemlemek için Coomassie Blue G-250 ile boyama yapılmıştır. Boyama sonunda bütün jel mavi renk almıştır. Aktivasyonun gerçekleştiği bölgelerde jelatin parçalandığı için beyaz bant görülmüştür.

Zimografi için kullanılan materyaller:

- Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi (%40'lık)
- Jel tamponu
- Jelatin çözeltisi (10mg/ml)
- Amonyum persülfat
- TEMED (Tetrametiletildiamin)

- SDS (sodyum dodesil sülfat) tamponu
- Laemmlı örnek yükleme tamponu
- MMP örnekleri
- Moleküler ağırlık Standartlı Proteinazlar
- Enzim renatürasyon tamponu
- Aktivasyon tamponları
- Boyama çözeltisi
- Boyama durdurma çözeltisi
- Elektroforez aparatı(SDS-PAGE-mini jel sistemi) ve güç kaynağı
- Örnek yükleme mikropipeti.

3.3.1.Zimografi Jelinin Hazırlanması

Jelatin zimografi yöntemi bir çeşit Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemidir. PAGE yönteminde, sentetik akrilamid ve türevlerinin monomerlerinin polimerizasyonu ile oluşturulan jel kullanılmaktadır. PAGE yönteminde jel, yan yana bağlanarak bir zincir oluşturan akrilamidlere çapraz bağlanarak ağsı bir yapı oluşturan bisakrilamidler ile polimerizasyon reaksiyonu sonucu oluşur. Bu ağsı yapıyı, amonyum persülfat (APS) ve N-N-N'-N' tetrametil-etilendiamin(TEMED) polimerleştirir.

Bu yöntemde akrilamid ve türevi N-N' –metilen bisakrilamidin yanı sıra proteinlerin ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısını bozan ve denatüre hale getiren sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılmıştır. Böylece proteinler ağırlıklarına göre ayırt edilmiştir. Ayrıca klasik PAGE yönteminden ayrı olarak, tez çalışması kapsamında kullanılan enzimatik aktivite için jele, substrat olarak jelatin eklenmiştir.

Zimografi jelini hazırlarken öncelikle Mini-PAGE camları deiyonize su ile silinmiştir. Camların arasına aralık çubukları iki kenara gelecek şekilde yerleştirilip cam düzenek yatay düzeyde kısıkaçlarla sabitlenmiştir. Daha sonra zimografi için örneklerin yükleneceği jel hazırlanmıştır. Jel hazırlanırken Akrilamid/Bisakrilamid yüzdesi

araştırılacak proteinazların moleküler ağırlığına göre değişmektedir. MMPlerin ağırlığı 20 ila 100 kDa arasında çeşitlilik göstermektedir. Yapılan tez çalışmasında araştırılan MMP-2 72kDa ve MMP-9 92kDa moleküler ağırlığındadır. Bu proteinazlar için %10 Akrilamid/Bisakrilamid kullanılmıştır. Zimografi jeline, her jel için taze hazırlanan Amonyum persülfat (APS) eklenmiştir. APS jelin polimerizasyonu için gerekli olan serbest radikalleri oluşturan bir reaksiyon başlatıcıdır. 0,03gr APS 300 µl deiyonize su içerisinde iyice çözdürülmüştür. Jel karışımına eklenen diğer bir ürün ise jelatin çözeltisidir. Çözelti, 0,3gr Jelatin ile 30 ml deiyonize suyun karıştırılması ile hazırlanmıştır. Jelatin'in iyi çözünmesi için deiyonize su 60° C'a kadar ısıtılır. Jel çözeltisine ayrıca %10'luk SDS çözeltisi ve ticari olarak satılan TEMED çözeltisi eklenmiştir. En son olarak APS ve TEMED eklenmiştir. Reaksiyonda TEMED katalizör, APS reaksiyon başlatıcı olduğundan karışıma başta eklenmeleri diğer çözeltilerin jelde homojen karışamamalarına neden olur.

Yapılan tez çalışmasında zimografi jeli için aşağıdaki karışım oranları ve karışıma katılma sırası kullanılmıştır.

%10'luk, 15ml Zimografi Jeli:

- 3,75 ml Akrlamid/Bisakrilamid çözeltisi
- 3 ml Tris tampon pH:8,8
- 1,5 ml Jelatin çözeltisi(10mg/ml)
- 250 µl SDS
- 250 µl APS
- 50 µl TEMED
- 6.25 ml Deiyonize su (dH₂O) ile son hacim 15 ml'ye tamamlanır.

Hazırlanan karışım pipet yardımı ile yatay cam düzeneğin içine dökülmüştür ve iki cam arası hava kabarcığı kalmayacak şekilde tamamen jel karışımı ile dolunca 10 veya 15 kuyucuklu tarak camların kulakçıklı tarafına yerleştirilmiştir. Jel polimerizasyonu için yaklaşık 30 dakika beklenmiştir. Literatürde, yapılan çalışmalara göre 15 dakika jelin %70'nin polimerleşmesi gerekmektedir. Polimerleşmeme veya çok hızlı polimerleşme jelin elektroforetik yapısını bozar. Bu nedenle polimerizasyonda APS ve TEMED miktarı önem taşımaktadır.

3.3.2. Örneklerin Yürütülmesi ve Aktivasyonu

Örnekleri jele yükleme aşamasından önce, oda sıcaklığına getirilen hasta ve kontrol serumları, Laemmlı tamponu ile eş hacimde olacak şekilde 10'ar µl alınarak eppendorf tüplerde karıştırılmıştır. Her bir örnek 37° C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Örneklerden ve standart protein belirtecinden jele 20'şer µl yüklenmiştir. Jel 200 Volt sabit akımda 120 dakika yürütülmüştür. Laemmlı tamponu jelden çıktıktan sonra yürütme durdurulmuştur. Jel deiyonize su ile yıkanmıştır

Jel aktivasyon kabına alınarak çalkalamalı inkübatörde 40'ar dakika sırasıyla birinci ve ikinci aktivasyon çözeltileri içerisinde inkübe edilmiştir. Daha sonra üçüncü aktivasyon çözeltisi ile jel 18 saat 37° C'de inkübasyona bırakılmıştır. 18 saat sonunda aktivasyon çözeltisi jelden uzaklaştırılarak reaksiyon durdurulmuştur. Boyama için jel 2 saat çalkalamalı etüvde boyama çözeltisinde inkübe edilmiştir.

Boyamayı durdurmak için boya kaptan uzaklaştırılmış ve boya durdurma çözeltisi jele eklenerek jel 15-20 dakika yıkanmıştır. Zimografi sonucunda örneklerdeki enzimatik aktivasyon belirlenmiştir.

3.4 İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, ImageJ (Image Processing and Analysis in Java), SPSS version 15.0 for Windows (SPSS, Inc, Chicago, Illinois, USA) ve MedCalc software paket programları kullanılarak yapılmıştır.

ImageJ programı ile Jelatinaz Zimografi sonucunda hasta ve kontrol bireylerin serumlarından elde edilen bantların yoğunlukları 3 tekrarlı olarak ölçülmüştür. Bu veriler SPSS programında hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırmalı olarak T-testi kullanılarak analiz edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan enzimlerin, hasta ve kontrol bireyleri arasında özgüllük hassaslık eğrileri için ROC Curve analizleri SPSS ve MedCalc programları kullanılarak yapılmıştır. Analizlerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR

Sonuçların değerlendirilmesi aşamasında, tez çalışması için Gülhane Askeri Tıp Akademisi Gastroenteroloji Polikliniği'ne gelen, kolonoskopik ve endoskopik analizler sonucu tümör varlığı saptanan 28 hasta ve kontrol grubu olarak kullanılan 40 sağlıklı bireyden periferik kan alınmıştır (Çizelge 4.1.). Bu kan örnekleri serumlarını ayırmak amacı ile santrifüj edilerek plazma ve serumları ayrılmıştır. Her bir bireyin serum örnekleri tez çalışmasında kullanılmak üzere -80° C'de saklanmıştır.

Çizelge 4.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Hasta Listesi

| HASTA | CİNSİYET | DOĞUM YILI | TÜMÖR LOKASYONU |
|-------|----------|------------|------------------|
| 1 | K | 1965 | MİDE |
| 2 | E | 1952 | KARDİYA(MİDE) |
| 3 | K | | MİDE |
| 4 | E | 1971 | KOLON |
| 5 | K | 1931 | KOLON |
| 6 | E | 1949 | KARDİYA(MİDE) |
| 7 | | | MİDE |
| 8 | | | MİDE |
| 9 | | | MİDE |
| 10 | E | | MİDE |
| 11 | | | MİDE |
| 12 | E | | MİDE |
| 17 | E | | MİDE |
| 18 | E | | KOLON |
| 19 | K | | MİDE |
| 20 | E | 1924 | KOLON |
| 21 | E | 1964 | REKTUM |
| 22 | E | 1944 | REKTUM |
| 23 | E | 1956 | SPLENİK FLEKSURA |
| 24 | E | 1967 | KARDİYA(MİDE) |
| 25 | K | 1928 | REKTUM |
| 26 | E | 1952 | KOLON |
| 27 | E | 1967 | ANTRUM |
| 28 | K | 1954 | ÖZEFAGUS |
| 29 | E | 1936 | KOLON |
| 30 | E | 1942 | MİDE |
| 31 | E | 1938 | SİGMİOD KOLON |
| 32 | K | 1986 | MİDE |

Bu örneklerin MMP-2 ve MMP-9 enzimatik aktiviteleri Jelatinaz Zimografi yöntemi ile araştırılmış ve istatistiksel veriler doğrultusunda karşılaştırmalar yorumlanmıştır.

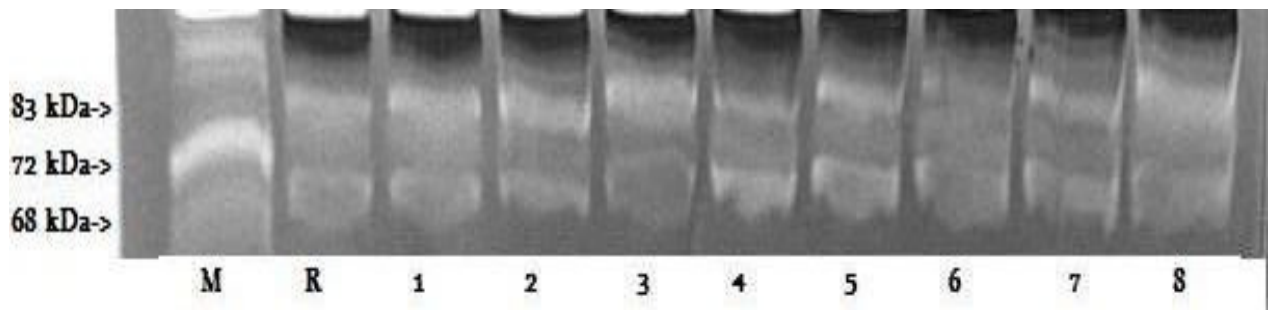
4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarında MMP-2 ve MMP-9'in Jelatinaz Zimografi Yöntemi ile Aktivitelerinin Gösterilmesi

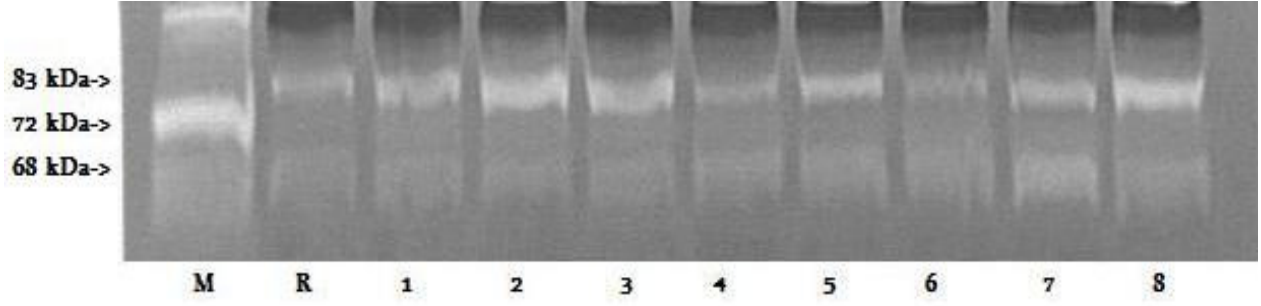
Yapılan tez çalışmasında, gastrointestinal kanserli hastalarda aktivasyonunun arttığı düşünülen MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin, bir PAGE türü olan jelatinaz zimografi sisteminde hasta ve kontrol serumlarının kullanılması ile aktivasyonları saptanmıştır.

Deney sisteminde hasta ve kontrol bireylerinin yanı sıra ticari olarak satın alınıp, kullanılan MMP-2 belirteci ve daha önce yapılan bir çalışmayla MMP-9 aktivasyonu kanıtlanmış referans bir örnek kullanılmış ve enzimatik aktivitelerin hangi enzime ait olduğu analiz edilmiştir.

4.1.1. Hasta Grubunda MMP-2 ve MMP-9 Aktivasyonlarının Zimografi ile Tayin Edilmesi

Yapılan tez çalışmasında jelatinaz zimografi yöntemi hasta ve kontrol grupları arasında ayrı ayrı yapılan deneyler ile belirlenmiştir. Toplanan 28 hasta bireyin serumları ticari olarak alınıp kullanılan pro-formdaki 72 kDa'luk MMP-2 belirteci ve 83 kDa'luk MMP-9 aktivasyonu kanıtlanmış referans bir örnek ile beraber 3 tekrarlı olarak analiz edilmiştir (Şekil 4.1.). Jellerde ilk iki kuyucuk sırası ile MMP-2 belirteci ve MMP-9 referans örneği ile yüklüdür. Diğer kuyucuklara ise hasta bireyler yüklenmiş ve analizler yapılmıştır. Belirteç MMP-2 pro formda olduğu için 72 kDa iken hasta örnekler aktif formda bulunan 68 kDa ağırlığında gözükmektedir. Referans örneği ve hastaların MMP-9 aktivasyonu ise aktif form olan 83 kDa ağırlığında bulunmaktadır.



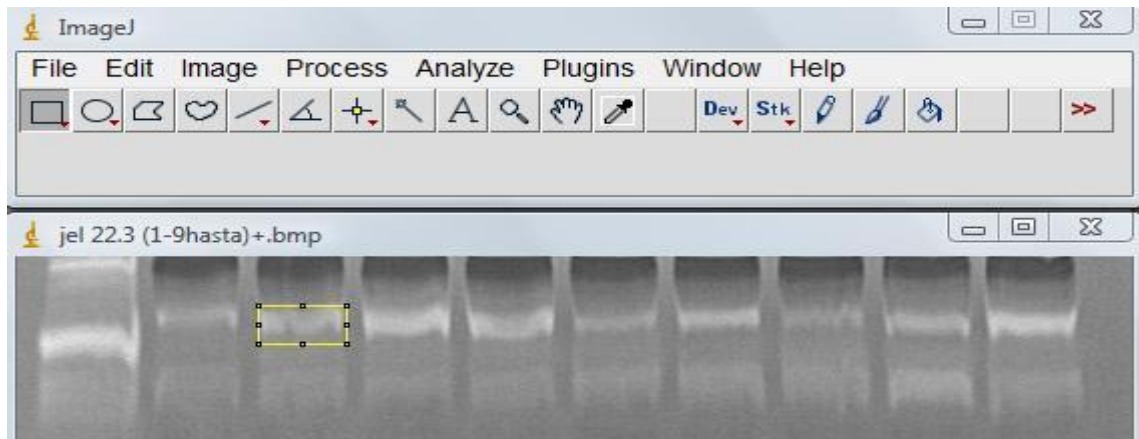


Şekil 4.1. Hasta grubuna ait MMP-2 MMP-9 aktivasyonu Zimografi sonuçları. M:Belirteç (72 kDa), R: referans örnek (83 kDa), 1-8 hasta bireylerin zimografi sonuçları.

Yapılan çalışmalarda ve bu tez çalışmasında da kullanılan jel sistemi jelatinaz zimografi olduğu için ve enzimlerin jelatinaz özellikleri olmasından dolayı jelde başka bir enzim aktivasyonu gözlemlenmesi veya yanlış pozitiflik oluşması engellenmiştir.

4.1.1.1. Hasta Grubunun Zimografisinden Elde Edilen Sonuçların Dansitelerinin Analizi

Tez çalışması kapsamında toplanan 28 hasta bireyin 3 tekrarlı Zimografi sonuçlarının nicel verileri ImageJ programı ile belirlenmiştir(Şekil 4.2.). Her bir jelde, ticari belirteç dahil olmak üzere tüm hasta bireylerin jelatinaz Zimografi yöntemi sonucu 18 saat inkübasyon sonunda 37°C'de aktive olması sonucunda oluşturduğu bantlar bilgisayar ortamında görüntülenmiştir. Görüntülerdeki her bir bant ImageJ programı ile nicel veriler açısından analiz edilmiştir(Çizelge 4.2.).



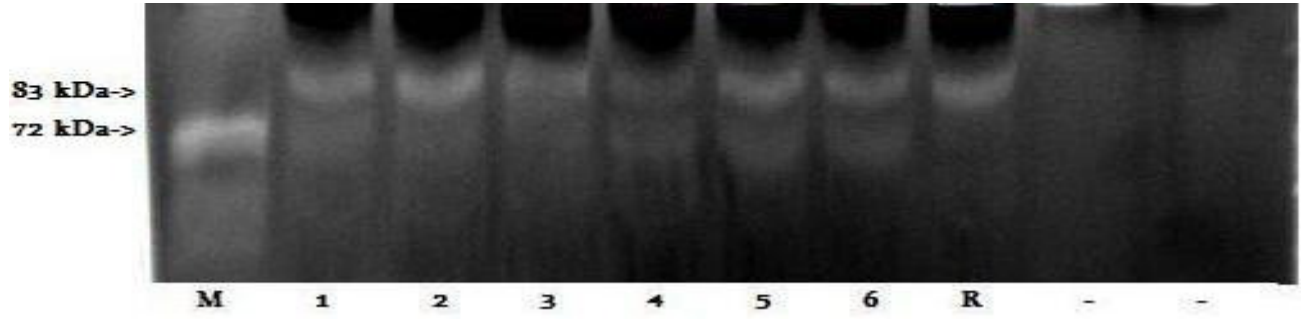
Şekil 4.2. ImageJ Programı ile Hasta Grubu Jel Dansite Hesaplamaları.

Çizelge 4.2. Hasta Grubu Jel Dansite Verileri. 1:Ticari MMP-2 Belirteci Dansite verisi,2-10 MMP-2 Hasta birey dansite verileri, 12: Referans hasta MMP-9 dasite verisi, 11,13-19 MMP-9 Hasta birey dansite verileri.

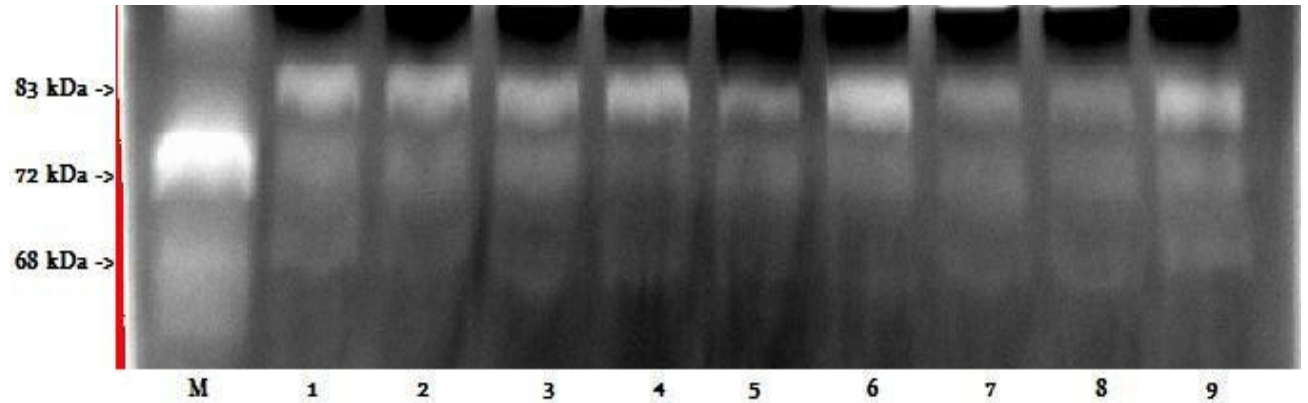
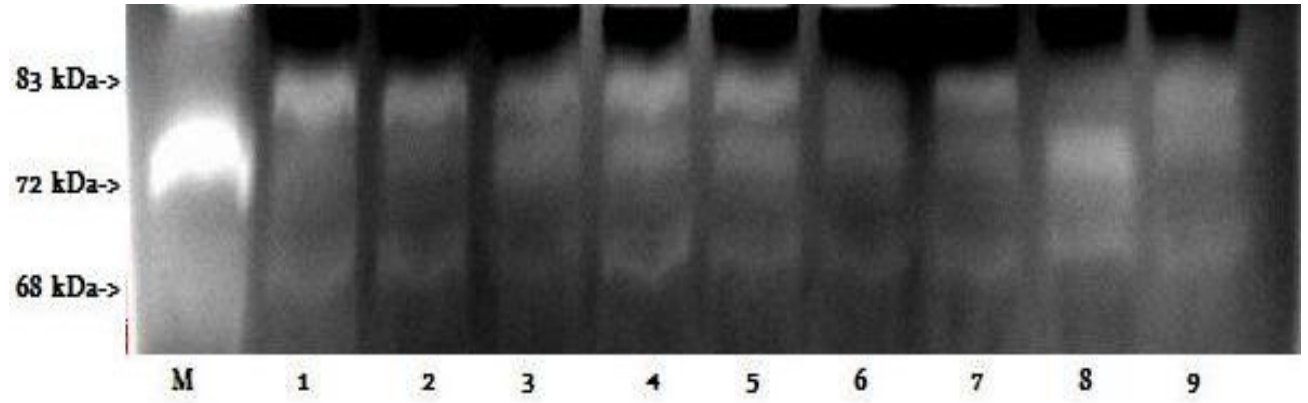
| | Alan | Ortalama | Min. | Maks. |
|-----------|-------------|-----------------|-------------|--------------|
| 1 | 1200 | 188.509 | 144 | 238 |
| 2 | 1176 | 141.547 | 123 | 161 |
| 3 | 1204 | 141.703 | 122 | 160 |
| 4 | 1104 | 138.247 | 119 | 155 |
| 5 | 1008 | 140 | 121 | 153 |
| 6 | 1242 | 138.044 | 117 | 158 |
| 7 | 1144 | 141.483 | 120 | 158 |
| 8 | 1242 | 141.721 | 119 | 160 |
| 9 | 1066 | 151.721 | 123 | 173 |
| 10 | 1150 | 143.778 | 122 | 166 |
| 11 | 840 | 151.061 | 126 | 192 |
| 12 | 903 | 159.048 | 128 | 196 |
| 13 | 990 | 169.678 | 125 | 212 |
| 14 | 860 | 162.951 | 125 | 213 |
| 15 | 560 | 148.123 | 130 | 171 |
| 16 | 615 | 159.324 | 126 | 192 |
| 17 | 640 | 143.934 | 125 | 168 |
| 18 | 903 | 151.866 | 121 | 192 |
| 19 | 1035 | 167.250 | 126 | 209 |

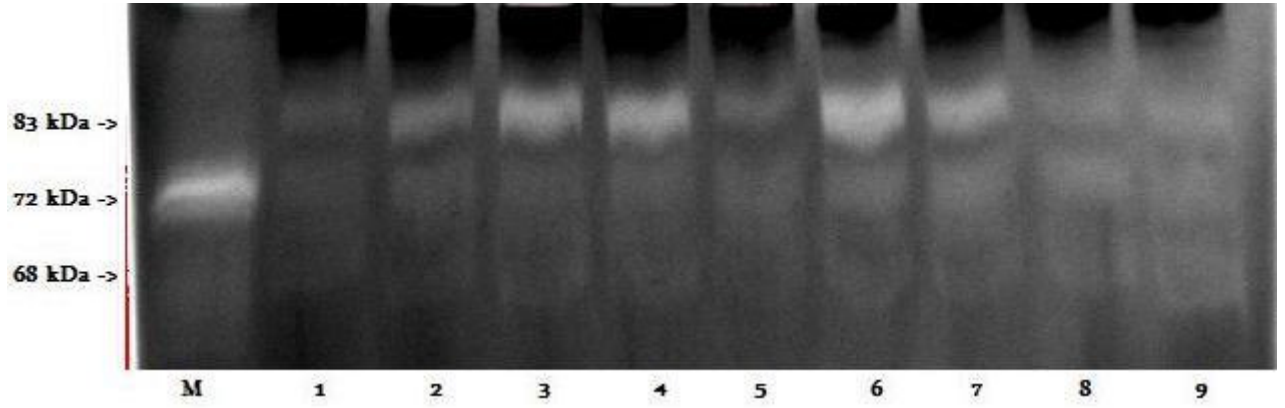
4.1.2. Kontrol Grubunda MMP-2 ve MMP-9 Aktivasyonlarının Zimografi ile Tayin Edilmesi

Tez çalışmasında hedeflenen 40 sağlıklı bireyden alınan serumlar MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonlarının kontrol edilmesi için Jelatinaz Zimografi yöntemi ile deneylerde kullanılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan bu kişilerde tümör oluşumuna dair hiçbir bulgu saptanmamıştır(Şekil 4.3.). Kontrol gruplarındaki örneklerde MMP-2 enziminin hem pro hem de aktif formuna rastlanmış istatistiksel analizler için aktif formların dasiteleri değerlendirmeye alınmıştır(Şekil 4.4.).



Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait MMP-2, MMP-9 aktivasyonu Zimografi sonuçları. M:MMP-2 Belirteci(72 kDa), R: referans MMP-9 örneği (83 kDa), 1-4 kontrol bireylerinin zimografi sonuçları, 5 ve 6 hasta bireylerin zimografi sonuçları.





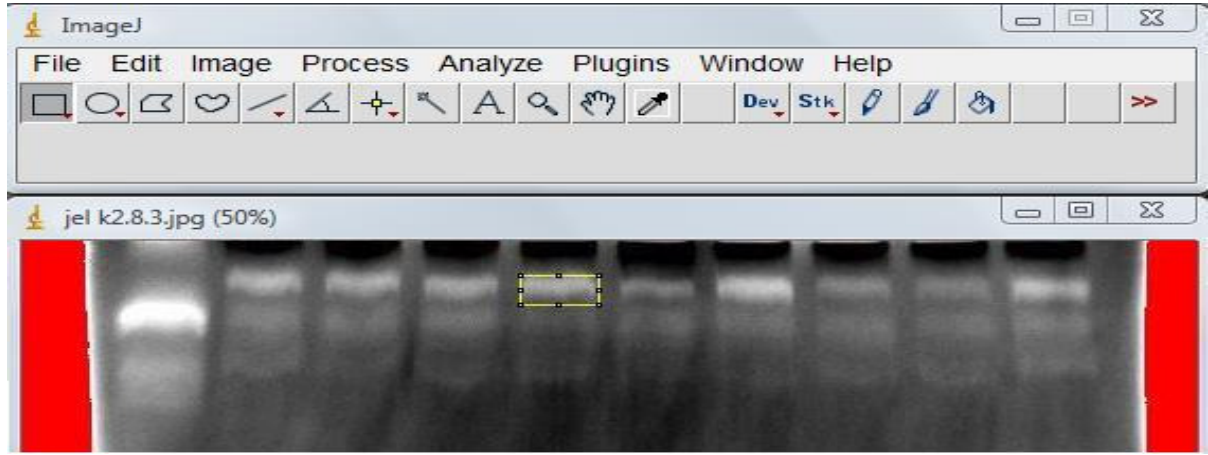
Şekil 4.4. Üç Farklı kontrol grubuna ait MMP-2, MMP-9 aktivasyonu Zimografi sonuçları. M:MMP-2 Belirteci(72 kDa), 1-9 kontrol bireylerinin zimografi sonuçları(MMP-9:83 kDa aktif form; MMP-2:72 kDa pro-form, 68 kDa aktif form).

Hasta grubunda olduğu gibi kontrol grubunda da 3 tekrarlı olarak zimografi yöntemi kullanılmıştır. Aktivasyonun hangi enzime ait olduğunu göstermek için her bir jelde ticari belirteç kullanılmıştır.

4.1.2.1. Kontrol Grubunun Zimografisinden Elde Edilen Sonuçların Dansitelerinin Analizi

40 sağlıklı bireye ait örnekler Jelatinaz PAGE sisteminde 3,5 saat yürütüldükten sonra 15'er dakikalık temizleme solüsyonlarında bekletilmesinin ardından 18 saatlik aktivasyon çözeltisinde jelatinaz jelde oluşan aktivasyona dayalı enzimatik parçalanmayla oluşmuş bantlar ImageJ programına aktarılarak nicel verileri analiz edilmiştir (Şekil 4.5.).

Elde edilen tüm nicel veriler istatistiksel analizlerde kullanılmış, hasta ve kontrol gruplarında MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin aktivasyon artışlarının anlamlı bir fark oluşturup oluşturmadığı değerlendirilmiştir(Çizelge4.3.).



Şekil 4.5. ImageJ Programı ile Kontrol Grubu Jel Dansite Hesaplamaları.

Çizelge 4.3. Kontrol Grubu Jel Dansite Verileri. 1:Ticari MMP-2 Belirteci Dansite verisi,2-10 MMP-2 Kontrol birey dansite verileri, 11-19 MMP-9 Kontrol birey dansite verileri.

| | Alan | Ortalama | Min | Maks. |
|-----------|-------------|-----------------|------------|--------------|
| 1 | 4128 | 213.305 | 105 | 254 |
| 2 | 3744 | 95.441 | 67 | 119 |
| 3 | 3040 | 75.124 | 33 | 105 |
| 4 | 3404 | 63.759 | 41 | 89 |
| 5 | 3072 | 57.278 | 40 | 79 |
| 6 | 3312 | 57.043 | 33 | 86 |
| 7 | 3564 | 66.054 | 41 | 97 |
| 8 | 3404 | 82.127 | 63 | 109 |
| 9 | 3496 | 86.608 | 68 | 105 |
| 10 | 3800 | 96.149 | 65 | 118 |
| 11 | 3192 | 137.220 | 80 | 196 |
| 12 | 2592 | 134.195 | 54 | 188 |
| 13 | 2736 | 126.082 | 65 | 177 |
| 14 | 1980 | 143.651 | 74 | 188 |
| 15 | 2664 | 91.390 | 32 | 136 |
| 16 | 3432 | 141.839 | 64 | 217 |
| 17 | 2592 | 107.850 | 58 | 145 |
| 18 | 3024 | 106.491 | 66 | 137 |
| 19 | 3192 | 136.395 | 76 | 204 |

4.3. Sonuçların İstatistiksel Analizi

Tez çalışmasında 28 hasta ve 40 sağlıklı bireyin serumlarında MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin aktivasyonu, jelatinaz zimografi yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında hassaslık ve özgüllük kontrolü için Roc Curve analizi yapılmıştır. ROC eğrisinin altında kalan alanın büyüklüğü, üzerinde çalışılan tanı testinin ayırma yeteneğinin istatistiksel olarak önemini gösterir. Roc Curve analizinden elde edilen veriler enzimlerin hassaslık-özgüllük saptaması için program tarafından uygun bir cut off verisi verilerek saptanmıştır(Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. MMP-2 MMP-9 Roc Curve analizi koordinatları. Kırmızı veri eğri için MedCalc programı tarafından seçilmiş en uygun cutoff verileridir.

| MMP2 Cutoff Verileri | | | MMP9 Cutoff Verileri | | |
|----------------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|--------------|
| Kriter | Hassaslık | Özgüllük | Kriter | Hassaslık | Özgüllük |
| ≥1 | 100,00 | 0,00 | ≥1 | 100,00 | 0,00 |
| >1 | 92,86 | 0,00 | >1 | 92,86 | 0,00 |
| >12 | 92,86 | 85,00 | >13 | 78,57 | 62,50 |
| >13 | 85,71 | 92,50 | >14 | 67,86 | 75,00 |
| >14 | 60,71 | 97,50 | >15 | 57,14 | 82,50 |
| >15 | 46,43 | 100,00 | >18 | 7,14 | 100,00 |
| >17 | 0,00 | 100,00 | >19 | 0,00 | 100,00 |

Hasta ve kontrol gruplarındaki her bireyin MMP-2 ve MMP-9 enzim aktivasyonu 3 tekrarlı olarak deney sisteminde kullanılmıştır. Jellerdeki bu aktivasyon ImageJ programına aktarılarak nicel veriler elde edilmiştir. Her iki grupta bulunan bireylerin MMP-9 ve MMP-2 aktivasyonlarının ortalamaları istatistiksel analizde kullanılmıştır (Çizelge4.5.).

Çizelge 4.5. Hasta ve Kontrol Gruplarının MMP-2 ve MMP-9 Aktivasyonları Nicel Verileri

| <u>Hasta ortalamaları</u> | MMP-2 | | | | MMP-9 | | | |
|-----------------------------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|----------|
| | jel 1 | jel 2 | jel 3 | Ortalama | jel 1 | jel 2 | jel 3 | Ortalama |
| hasta 1 | 150,149 | 144,158 | 147,486 | 147,2643 | 161,713 | 159,395 | 175,104 | 165,404 |
| hasta 2 | 141,023 | 148,134 | 144,955 | 144,704 | 101,853 | 165,107 | 166,262 | 144,4073 |
| hasta 3 | 135,073 | 142,646 | 147,977 | 141,8987 | 155,117 | 180,47 | 194,28 | 176,6223 |
| hasta 4 | 121,774 | 142,44 | 147,198 | 137,1373 | 158,88 | 169,127 | 187,694 | 171,9003 |
| hasta 5 | 144,458 | 143,624 | 143,228 | 143,77 | 135,543 | 152,322 | 158,86 | 148,9083 |
| hasta 6 | 136,283 | 144,328 | 156,905 | 145,8387 | 142,794 | 167,683 | 187,549 | 166,0087 |
| hasta 7 | 126,946 | 144,292 | 154,295 | 141,8443 | 126,663 | 145,189 | 174,808 | 148,8867 |
| hasta 8 | 108,881 | 127,924 | 153,496 | 130,1003 | 139,029 | 136,105 | 155,656 | 143,5967 |
| hasta 9 | 100,66 | 131,401 | 144 | 125,4727 | 141,282 | 154,229 | 173,468 | 156,3263 |
| hasta 10 | 117,408 | 137,205 | 170,336 | 141,6497 | 122,47 | 141,991 | 177,628 | 147,363 |
| hasta 11 | 104,136 | 123,437 | 151,765 | 126,446 | 124,171 | 130,437 | 154,867 | 136,4917 |
| hasta 12 | 120,289 | 129,237 | 156,657 | 135,3943 | 117,41 | 125,364 | 157,427 | 133,4003 |
| hasta 17 | 122,937 | 148,759 | 161,882 | 144,526 | 142,028 | 175,374 | 184,567 | 167,323 |
| hasta 18 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| hasta 19 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| hasta 20 | 122,698 | 144,493 | 162,235 | 143,142 | 152,281 | 171,304 | 180,068 | 167,8843 |
| hasta 21 | 122,116 | 144 | 165,007 | 143,7593 | 134,445 | 158 | 173,03 | 155,1583 |
| hasta 22 | 119,031 | 138,577 | 178,608 | 145,4053 | 140,22 | 162,101 | 185,519 | 162,6133 |
| hasta 23 | 107,822 | 176,39 | 143,922 | 142,7113 | 128,72 | 184,972 | 180,29 | 164,6607 |
| hasta 24 | 116,402 | 135,352 | 204,546 | 152,1 | 142,564 | 156,79 | 208,408 | 169,254 |
| hasta 25 | 156,667 | 129,126 | 103,997 | 129,93 | 139,997 | 120,543 | 121,597 | 127,379 |
| hasta 26 | 151,96 | 122,268 | 103,205 | 125,811 | 126,743 | 113,136 | 111,007 | 116,962 |
| hasta 27 | 144,216 | 118,538 | 108,711 | 123,8217 | 127,081 | 115,386 | 131,95 | 124,8057 |
| hasta 28 | 137,302 | 115,067 | 106,813 | 119,7273 | 125,993 | 90,39 | 113,403 | 109,9287 |
| hasta 29 | 136,98 | 112,757 | 107,189 | 118,9753 | 127,881 | 88,903 | 114,847 | 110,5437 |
| hasta 30 | 151,099 | 121,472 | 111,485 | 128,0187 | 129,163 | 92,431 | 119,478 | 113,6907 |
| hasta 31 | 177,474 | 123,664 | 110,367 | 137,1683 | 144,995 | 129,936 | 119,739 | 131,5567 |
| hasta 32 | 136,7 | 137,591 | 112,45 | 128,9137 | 133,373 | 132,892 | 107,314 | 124,5263 |
| <u>Kontrol ortalamaları</u> | jel 1 | jel 2 | jel 3 | Ortalama | jel 1 | jel 2 | jel 3 | Ortalama |
| kontrol 1 | 53,317 | 72,009 | 60,81 | 62,04533 | 95,679 | 92,893 | 75,825 | 88,13233 |
| kontrol 2 | 36,901 | 54,516 | 51,832 | 47,74967 | 54,922 | 58,526 | 53,837 | 55,76167 |
| kontrol 3 | 45,762 | 61,655 | 55,027 | 54,148 | 68,217 | 81,611 | 56,5 | 68,776 |

| | | | | | | | | |
|-------------------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|----------|
| kontrol 4 | 53,097 | 61,897 | 48,612 | 54,53533 | 82,028 | 71,793 | 61,578 | 71,79967 |
| kontrol 5 | 45,266 | 67,452 | 45,859 | 52,859 | 56,826 | 69,145 | 47,027 | 57,666 |
| kontrol 6 | 43,721 | 59,333 | 51,34 | 51,46467 | 89,161 | 78,502 | 66,302 | 77,98833 |
| kontrol 7 | 40,689 | 65,939 | 56,36 | 54,32933 | 52,328 | 77,47 | 72,404 | 67,40067 |
| kontrol 8 | 39,748 | 53,569 | 49,053 | 47,45667 | 51,016 | 64,67 | 49,841 | 55,17567 |
| kontrol 9 | 50,253 | 62,783 | 47,934 | 53,65667 | 41,996 | 58,118 | 45,087 | 48,40033 |
| kontrol 10 | 34,443 | 64,095 | 121,875 | 73,471 | 65,907 | 139,731 | 147,31 | 117,6493 |
| kontrol 11 | 27,044 | 76,262 | 111,213 | 71,50633 | 60,907 | 178,269 | 148,79 | 129,322 |
| kontrol 12 | 31,467 | 89,492 | 107,859 | 76,27267 | 58,492 | 184,663 | 140,457 | 127,8707 |
| kontrol 13 | 19,384 | 90,165 | 87,34 | 65,62967 | 62,887 | 188,43 | 149,575 | 133,6307 |
| kontrol 14 | 20,91 | 96,73 | 99,638 | 72,426 | 32,229 | 151,179 | 105,142 | 96,18333 |
| kontrol 15 | 23,176 | 96,786 | 104,193 | 74,71833 | 68,825 | 201,804 | 157,676 | 142,7683 |
| kontrol 16 | 28,381 | 115,247 | 113,854 | 85,82733 | 41,42 | 193,62 | 124,617 | 119,8857 |
| kontrol 17 | 31,25 | 124,314 | 116,041 | 90,535 | 51,129 | 191,69 | 124,66 | 122,493 |
| kontrol 18 | 47,263 | 143,852 | 125,646 | 105,587 | 99,094 | 229,78 | 154,503 | 161,1257 |
| kontrol 19 | 57,965 | 74,031 | 127,096 | 86,364 | 63,689 | 85,343 | 134,154 | 94,39533 |
| kontrol 20 | 66,113 | 79,657 | 140,144 | 95,30467 | 106,286 | 97,71 | 148,139 | 117,3783 |
| kontrol 21 | 71,003 | 66,723 | 111,981 | 83,23567 | 98,949 | 122,961 | 157,831 | 126,5803 |
| kontrol 22 | 78,904 | 83,05 | 120,091 | 94,015 | 115,88 | 126,345 | 162,897 | 135,0407 |
| kontrol 23 | 80,581 | 74,809 | 113,585 | 89,65833 | 78,55 | 93,073 | 125,064 | 98,89567 |
| kontrol 24 | 91,54 | 94,498 | 128,086 | 104,708 | 132,995 | 153,7 | 186,31 | 157,6683 |
| kontrol 25 | 102,703 | 99,153 | 121,508 | 107,788 | 120,566 | 132,401 | 143,957 | 132,308 |
| kontrol 26 | 110,214 | 101,093 | 125,085 | 112,1307 | 114,563 | 85,835 | 122,067 | 107,4883 |
| kontrol 27 | 113,22 | 111,703 | 114,371 | 113,098 | 125,413 | 109,538 | 112,201 | 115,7173 |
| kontrol 28 | 78,892 | 92,428 | 76,574 | 82,63133 | 148,582 | 122,009 | 118,173 | 129,588 |
| kontrol 29 | 64,213 | 62,826 | 68,944 | 65,32767 | 103,932 | 89,509 | 85,837 | 93,09267 |
| kontrol 30 | 51,589 | 79,805 | 70,722 | 67,372 | 81,378 | 84,433 | 87,827 | 84,546 |
| kontrol 31 | 53,552 | 91,845 | 74,48 | 73,29233 | 77,123 | 110,864 | 74,474 | 87,487 |
| kontrol 32 | 47,706 | 86,73 | 94,005 | 76,147 | 73,231 | 96,457 | 104,134 | 91,274 |
| kontrol 33 | 52,065 | 65,469 | 114,899 | 77,47767 | 63,528 | 62,597 | 122,585 | 82,90333 |
| kontrol 34 | 51,016 | 73,734 | 118,118 | 80,956 | 84,047 | 76,212 | 157,101 | 105,7867 |
| kontrol 35 | 69,862 | 129,981 | 124,581 | 108,1413 | 52,857 | 82,593 | 131,632 | 89,02733 |
| kontrol 36 | 56,467 | 104,309 | 122,974 | 94,58333 | 69,139 | 107,902 | 135,916 | 104,319 |
| kontrol 37 | 152,149 | 123,151 | 116,495 | 130,5983 | 160,263 | 166,637 | 152,538 | 159,8127 |
| kontrol 38 | 130,235 | 108,866 | 124,45 | 121,1837 | 164,863 | 162,094 | 159,146 | 162,0343 |
| kontrol 39 | 114,863 | 113,158 | 125,457 | 117,826 | 151,156 | 157,029 | 146,975 | 151,72 |
| kontrol 40 | 101,095 | 120,985 | 141,158 | 121,0793 | 117,846 | 166,052 | 165,857 | 149,9183 |

MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonlarının hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark oluşturup oluşturmadığı T-testi ile analiz edilmiştir. Analizler her enzim için ayrı ayrı yapılmıştır. Hasta ve sağlıklı gruplar arasında her iki enzim için de anlamlı bir fark olduğu görülmüştür(Çizelge 4.6. ve Çizelge 4.7.). Hasta ve kontrol grubunda her iki enzim içinde p değeri 0.05'ten küçük olduğu için anlamlı bir fark var olarak kabul edilmiştir. Grup istatistikleri ve T-testi sonuçları ile yapılan analizlerdeki standart sapma ve güven aralıklarının birbirinin içinde kalıp kalmadığı gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. A:MMP-2 Enzimi Grup İstatistikleri, B: T-testi Analizleri. Hasta ve Kontrol grubu verileri T-testi ile karşılaştırılmış ve p değerleri verilmiştir.

| MMP2 | N | Ortalama | Standart Sapma | Ortalama Standart Hata |
|---------|----|-----------|----------------|------------------------|
| Hasta | 26 | 136,36655 | 9,447280 | 1,852764 |
| Kontrol | 40 | 82,42841 | 22,949080 | 3,628568 |

A

| Ortalamlar için T-Testi | | | | | |
|-------------------------------|------|----------------|---------------------|----------------------|-----------|
| MMP2 | Sig. | Ortalama Farkı | Standart Hata Farkı | %95 Güven Aralıkları | |
| | | | | Min. | Mak. |
| Varsayılan Eşit Varyanslar | ,000 | 53,938143 | 4,751783 | 44,445364 | 63,430921 |
| Varsayılmayan Eşit Varyanslar | ,000 | 53,938143 | 4,074217 | 45,776648 | 62,099638 |

B

Çizelge 4.7. A: MMP-9 Enzimi Grup İstatistikleri, B: T-testi Analizleri. Hasta ve Kontrol grubu verileri T-testi ile karşılaştırılmış ve p değerleri verilmiştir.

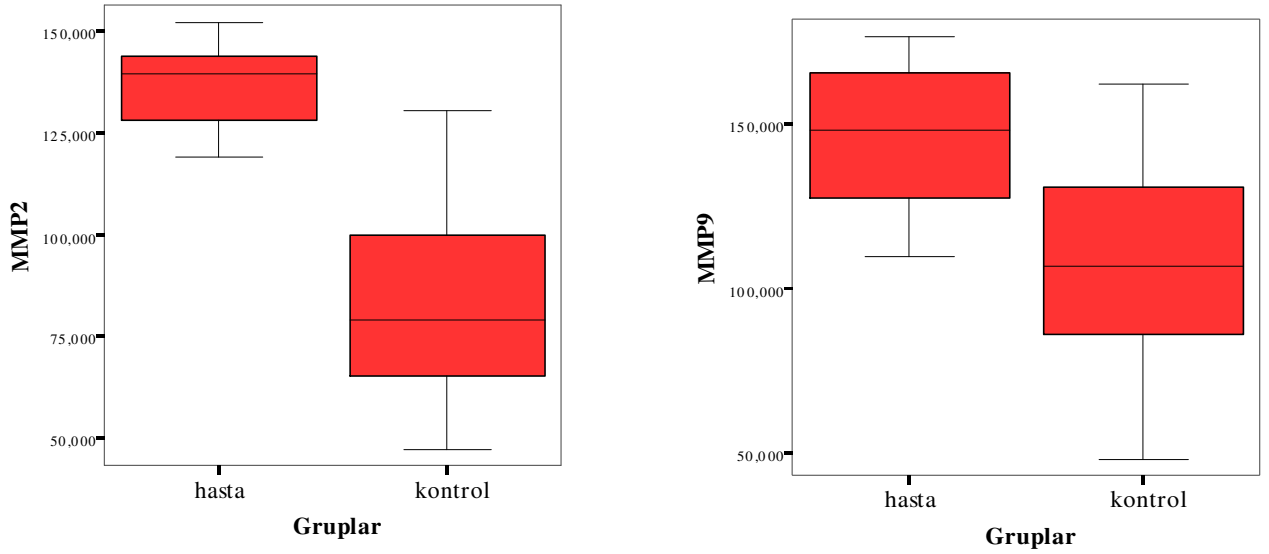
| MMP9 | N | Ortalama | Standart Sapma | Ortalama Standart Hata |
|---------|----|-----------|----------------|------------------------|
| Hasta | 26 | 145,60008 | 20,839880 | 4,087037 |
| Kontrol | 40 | 107,97527 | 32,141200 | 5,081970 |

A

| Ortalamalar için T-Testi | | | | | |
|-------------------------------|------|----------------|---------------------|----------------------|-----------|
| MMP9 | Sig. | Ortalama Farkı | Standart Hata Farkı | %95 Güven Aralıkları | |
| | | | | Min. | Mak. |
| Varsayılan Eşit Varyanslar | ,000 | 37,624802 | 7,121545 | 23,397880 | 51,851724 |
| Varsayılmayan Eşit Varyanslar | ,000 | 37,624802 | 6,521525 | 24,596553 | 50,653050 |

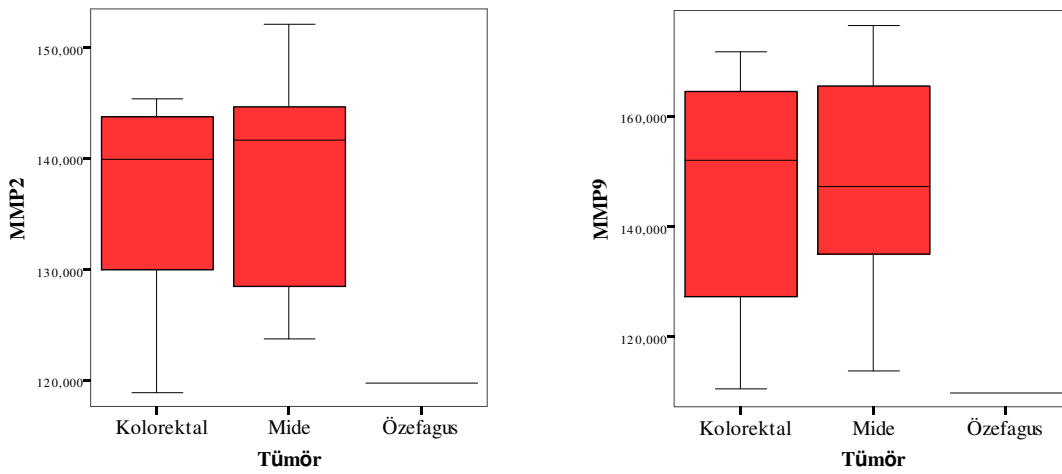
B

MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin elde edilen istatistiksel analizleri grafik olarak gösterilmiştir. Grafiğe bakıldığında hasta ve kontrol gruplarının ortalama değerleri ve güven aralıkları gösterilmiştir. Bulunan anlamlı fark grafiklerde farklı ortalamalar ile analiz edilmiştir(Şekil4.6.). Enzimlerin hasta ve kontrol grubu arasında yapılan değerlendirmede (Ortalamalar için T-testi) MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin hasta grubunda, kontrol grubundan daha çok ifade edildiği ortaya konmuş ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmasında, istatistiklere göre MMP-2 enziminde ortalamalar arasında ciddi bir fark bulunmuştur. Güven aralıkları hasta grubunda kontrol grubuna göre daha farklı bir ortalamada yer aldığı saptanmış ve p değeri anlamlı bulunmuştur. MMP-9 enziminde hasta-kontrol grupları ortalamaları her ne kadar birbirine yakın olsa ve güven aralıkları birbirinin içinde kalsa da, p değeri bu enzim için de anlamlı bir farkın olduğunu göstermiştir.



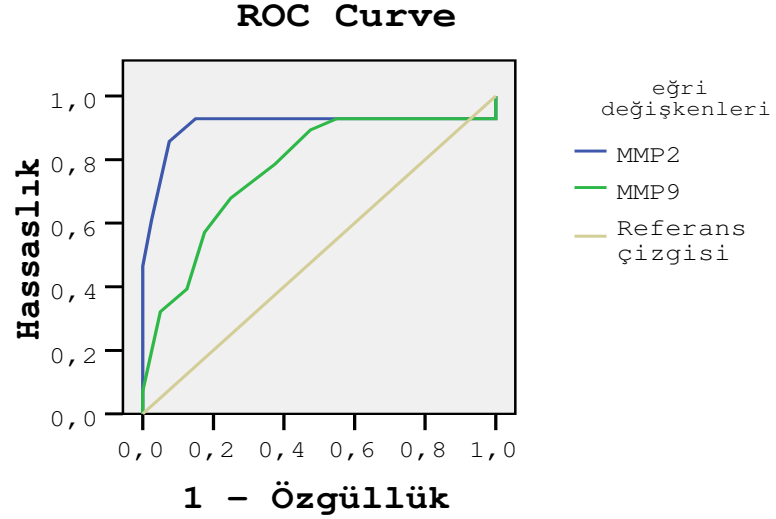
Şekil 4.6. MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonlarının Hasta-kontrol grupları arasındaki farkın karşılaştırılmasının T-testi sonuçları.

Hasta grubunda klinik ve patolojik olarak tanısı bulunan tümör lokalizasyonları ve MMP-2, MMP-9 enzimleri aktivasyonu arasındaki bağlantı grafiksel olarak kontrol edilmiştir(Şekil 4.7.). Hasta grubunda tümör lokalizasyonlarına göre özefagus, mide, kolorektal olmak üzere, gastrointestinal sistem içerisinde üç ana bölgeye ayrılan istatistiksel grupların analizleri yapılmıştır. Yapılan bu grafik tümör lokasyonu ile ifadesi arasındaki ilişkiyi gözlemek amacı ile yapılmıştır.



Şekil 4.7. Tümör Lokalizasyonu ve MMP-2, MMP-9 Enzim Aktivasyonu Arasındaki İlişki.

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin enzim aktivasyonları, MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin özgüllük ve hassaslıkları arasındaki bağlantının ROC Curve analizi yapılmasında da kullanılmıştır (Şekil4.8.).



Şekil 4.8. Roc Curve analizi ile MMP-2 ve MMP-9 özgüllükleri arasındaki bağlantının grafiksel olarak gösterilmesi.

Hasta bireylerin sonuçları y ekseninde hassaslık; kontrol grubunun sonuçları x ekseninde özgüllük için çeşitli cutoff değerleri kullanılarak grafik hazırlanmıştır. Referans olarak 0.5 değeri orijinden geçen çizgi olarak kullanılmıştır. Eğrilerin altında kalan alanın büyüklüğü güvenilirliği göstermektedir. Grafikte verilen herhangi bir hassaslık değerinde, beklenen yanlış-pozitiflik yani özgüllük görülebilmektedir. Analiz sonucunda her iki enzim için anlamlı sonuç bulunmuştur (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. Roc Curve analizi MMP-2 ve MMP-9 hassaslık-özgüllük sonucu.

| Değişkenler | Alan | Standart Hata | Anlamlılık | Güven Aralığı | |
|-------------|------|---------------|------------|---------------|------------|
| | | | | Min. Limit | Mak. Limit |
| MMP2 | ,906 | ,050 | ,000 | ,809 | 1,003 |
| MMP9 | ,769 | ,061 | ,000 | ,650 | ,888 |

5. TARTIŞMA

Tümörler çoklu genetik değişikliklerle artış gösterir. Bu solid tümörler öncelikli olarak hücre proliferasyonunu etkiler. Benign ve malign tümörler arasında önemli bir farklılık bulunmaktadır ki bu benign tümörlerin bir kapsül içinde hareketsiz kalması ve malign tümörlerin metastaz yapabilmesidir. Normal dokular epiteliyal orijinli hücreler için bir geçiş bulunmazken malign tümörler bazal laminaya sızarlar. Neoplastik hücrelerin konak dokulardaki büyüme süreci malign karsinomların oluşumunda kritik bir olaydır. Çünkü bu dokular birçok karmaşık etkileşimleri tümör ile paylaşır ve ekstraselüler matriksi(ECM) yeniden şekillendirirler. ECM degradasyonu ekstraselüler bir çok enzimin güçlü işlemlerine ihtiyaç duyar (La Rocca, G. et al., 2004).

Metastatik yayılım, tümör gelişim evresinin son aşamalarında ortaya çıkan genel bir kanser gelişimi süreci olarak bilinmektedir. Ancak son çalışmalar, ölümlere yol açan kanser vakalarının primer tümörden ayrılan hücrelerin metastazı sonucu vücuda kan ya da lenf yolu ile yayıldığını ve metastazın erken bir olay olabileceğini göstermiştir. Bu metastaz bölgesel ve/veya kemik, karaciğer, akciğer, böbrek, tiroid ve ender olarak beyin olmak üzere uzak metastaz olabilmektedir (Jeziarska A. et al.,2009).

40 yılı aşkın süren çalışmalar metalloproteinazlar gibi, ekstraselüler matriksi düzenleyen proteazların kanser gelişim sürecinde tümör etrafındaki mikro çevrenin değişimine katkı yaptığını birçok kanıtla desteklemektedir(Gialeli et al., 2010). Son birkaç yıldaki bilimsel araştırmalarda kanser hastalığında proteazların rolü inişli çıkışlı bir durum göstermektedir. Proteazların kanser invazyonu ve metastazında önemli bir parça olduğu ile ilgili bazı şüpheler olmasına rağmen, bazı özgül detaylar anlaşılması zor olarak kalmaktadır. Bununla beraber proteazların plazma veya serum miktarlarının ölçülmesi hastalığın görüntülenmesinde umut veren gelişmeler arasındadır (Zucker and Cao,2005). Tez çalışmasının da konusunu oluşturan metalloproteinazların gastrointestinal kanser hastalarındaki enzim aktivasyonu ile ilgili birçok çalışma büyüme faktörünün salınımı ve aktivasyonunda, diğer proteazların ve tümör hücrelerinin ECM'ye yayılmasında rolü olduğu kanısı yükseliş göstermektedir. Ayrıca kolorektal kanserlerde anjiyogenez oluşumunu MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin doğrudan etkilediği düşünülmektedir (Tutton et al., 2003).

Kanser hastalarında erken tanı, tedaviye rehberlik edebilme ve yanlış pozitiflik oranının düşük olması gibi özelliklerden yararlanabilmek adına hasta bireylerin periferik kan örneklerinden elde edilen serumlarda matriks metalloproteinazların aktivasyonunun araştırılması, bu özellikleri taşıması nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda MMP'lerin kanser hastalarının serumlarındaki veya plazmalarındaki aktivasyonu araştırılmasına rağmen geniş gruplarla yapılan çalışmaların olmaması, MMP ailesinin her bir üyesinin kanser gelişiminin farklı aşamalarında farklı roller üstlenmesi gibi sorunlar doğrudan hedefe ulaşılmasını erken tanı ve hastalık takibini zorlaştıran unsurlardandır (Gialeli et al., 2010).

Malignant kanserlerde MMP'lerin miktarları hasta serum ve/veya idrar örneklerinden saptanabilmektedir. Bu miktarlar bazı eşik değerlerini geçip geçmemelerine göre değerlendirilirken hastalığın gelişimi ve erken tanısında kullanılmaktadır. Tümörlerde MMP'lerin ifadesi immünohistokimyasal boyama, Western blotlama, Northern blotlama veya RT-PZR analizleri ile test edilebilmektedir. Aynı zamanda MMP'ler kollajen, jelatin veya kazein zimografi yöntemi ile yaygın bir şekilde taranabilmektedir. MMP'lerin ifade miktarları ile kanser hastalarının klinik patolojik karakteristiği arasındaki ilişkiyi gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bununla ilgili iki önemli saptama yapılmıştır. Birincisi MMP ifadesi ve tümör aşaması ve agresifliği arasındaki ilişkinin araştırılması, diğeri ise MMP ifadesi ve aktivitesi ile tedavi ve metastatik riskin araştırılmasıdır. Kanser invazyonu için ilk bariyeri oluşturan kollajen bazal membranı degrades edebilen MMP-2 ve MMP-9 başlangıç aşamasındaki ve gelişim sürecindeki tümörlerde araştırılmıştır(Nikkola et al., 2005). Akciğer, tiroid, idrar kesesi, gastrointestinal kanserlerin gelişim sürecinde incelenmesine rağmen Ring ve arkadaşları(1997) 212 kolorektal kanser hastası ile yaptığı çalışmada MMP-2 ve MMP-9 ile tümör hücreleri arasında pozitif bir ilişki bulamamıştır.

Literatürde kanser hastalığının erken tanı ve takibi için birçok belirtecin kullanıldığı deney sistemlerinin oluşturulduğu saptanmaktadır. Metalloproteinaz ailesi de kanser hastalığında birçok yöntem ile standart dışı olarak incelenmektedir. Örneğin MMP-2 akut miyeloid lösemide, cilt kanserinde erken tanıda kullanılmaktadır. Metastatik melanomlarda MMP-1 ve MMP-3 ifadelerinin yüksek miktarlarda olduğu saptanmıştır (Vuoristo et al.,2000). Ancak sonuçlar arasında bir standardın olmaması nedeniyle

gastrointestinal kanser hastalığının saptanmasında özgüllük kaygısından dolayı tercih edilmemektedir.

Tez çalışması kapsamında gastrointestinal kanser hastalarından toplanan periferik kanlardan elde edilen serum örneklerinde MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonunun ifadeleri jelatinaz zimografi yöntemi kullanılarak belirlenmesi ve bu enzimlerin hassaslığının, uygulanabilirliğinin ve özgüllüğünün incelenmesi hedef alınmıştır.

Yapılan çalışmada gastrointestinal kanser klinik tanılı 28 hasta ve tümör varlığına dair bir kanıt bulunmayan 40 sağlıklı bireyden oluşturulan kontrol grubu kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grubundan alınan periferik kandan elde edilen serumlarından MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonlarının ifadelerinden yararlanılmıştır. Yapılan deney sisteminde ifadelerin hangi enzimin aktivasyonuna ait olduğunu saptamak üzere MMP-2 ticari belirteci ve daha önce MMP-9 aktivasyonu bilinen referans hasta örneği serumu kullanılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen enzim aktivasyonları Çizelge 4.5. de yer almaktadır.

Periferik kandan izole edilen serum örnekleri daha sonra kullanılmak üzere PBS ile 10X sulandırılmış ve sulandırılmış tüm örnekler -80 °C saklanmıştır. Sulandırılmış örneklerde enzim aktivasyon kaybını önlemek amacı ile iki defa dondurulup çözülecek şekilde hazırlanmış örneklerle zimografi deneyi yapılmıştır. Deney sisteminde hasta grubunun klinik olarak belirlenmiş gastrointestinal sistemdeki tümör lokasyonları da değerlendirmeye alınmıştır (Çizelge 4.1.). Zimografi deneyi ile MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin aktivasyonunu değerlendirmek için oldukça izole bir deney sistemi kullanılmıştır. Zimografi yönteminde örneklerin yürütüldüğü PAGE jeli jelatin içerdiğinden sadece jelatinaz aktivasyonu olan metalloproteinaz ailesinden MMP-2 ve MMP-9 enzimleri jelde aktivasyon gösterebilmektedir. Jel aktivasyonları için 18 saat süreyle 37°C de inkübe edildikten sonra, ImageJ programı ile dasite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel T-testi yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Literatürde MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonunun saptanması ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Over kistadenokarsinom, kolorektal karsinom, meme kanseri, ürotelyal karsinom, deri kanseri, servikal karsinom, uveal, ve böbrek karsinomlarında periferik kan, serum, hücre hatlarından MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu analiz edilebileceği öne sürülmüştür (Vihinen et al., 2002). Ancak yapılan bazı çalışmalarda MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu ile kanser arasında anlamlı bir fark gözlemlenememiştir. Emara ve

ark.(2009) gastrointestinal kanser hastaları ile kontrol bireyleri arasında MMP-2 enzimi açısından anlamlı bir fark bulamazken, MMP-9 için anlamlı bir fark bulmuştur. Ancak buldukları bu farkı histolojik aşama veya klinik evrelerle ilişkilendirememişlerdir. MMP-9 zimografik değerlendirilmesi ile kolorektal ve gastrik kanserlerde klasik tümör belirteci olarak kullanılabilirliği analiz edilmiştir(Emara et al., 2009).

48 kolorektal tümör teşhisli hastada MMP-2 ve MMP-9 konsantrasyonları, cerrahi müdahale ile tümörleri alınmış 36 bireyin MMP-2 ve MMP-9 konsantrasyonları ile karşılaştırılmış ve tümürlü bireylerin periferik kan serumunda iki enzimde de anlamlı bir fark gözlemlenmiş ve klinik evrelendirme için güçlü bir ilişki saptanmıştır (Tutton et al., 2003).

Kolorektal kanser hastalarıyla MMP-2'nin marker olarak kullanılabilirliği üzerine yapılan başka bir çalışmada 269 hastada MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu jelatinaz zimografi yöntemi ile kontrol edilmiştir. Hastaların tümörsüz kolon mukozaları ile tümürlü dokuları arasında yapılan bu karşılaştırmada tümürlü dokudaki MMP-2 miktarı normal dokuya göre %95 daha yüksek bulunmuştur. Pro-MMP-9 miktarında da kanserli kolon dokularında, normal kolon mukozasına göre anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Roc Curve analizleri yapılan enzimlerin %84 hassaslık ve % 93 özgüllük oranları saptanmıştır (Murnane et al., 2009).

Tez çalışmasında MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin aktivasyonun jelatin zimografi yöntemi ile analiz edilmesi sonucu 28 hasta birey ve 40 sağlıklı bireyden oluşan hasta ve kontrol gruplarında aktivasyonlar belirlenmiştir (Çizelge 4.5.). Her iki enzim de birçok çalışmada çeşitli örneklem sayıları ile farklı sonuçlar verse de, çalışmamızda hasta bireyler ile kontrol bireyleri arasında enzim aktivitelerine göre her iki enzim de anlamlı bir fark olduğu t-testi analizleri ile belirlenmiştir. Enzimlerin hassaslık, özgüllük kontrolü için Roc Curve analizi kullanılmıştır. Enzim aktivasyonlarının analizlerine göre MMP-2 enziminin hassaslığı %85 özgüllük ise %93 olarak hesaplanmıştır. MMP-9 enziminin hassaslığı %68, özgüllüğü ise %75 olarak MedCalc ve SPSS programları ile belirlenmiştir (Çizelge4.4.).

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlarla, MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin gastrointestinal kanser hastaları için bir belirteç olarak kullanılabilirliği analiz edilmiştir. Yapılan çalışma sonucu bu iki enzim aktivasyonunun gastrointestinal

kanser hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık gösterdiği saptanmıştır. MMP-2 enzimi istatistiksel olarak iki enziminde anlamlı sonuç vermesine rağmen güven aralıkları göz önüne alındığında daha anlamlı bir sonuç verdiği görülmüştür. Ayrıca yapılan hassaslık ve özgüllük testine göre de her iki enzimin güvenilirliği yüksek olarak analiz edilmiştir. Bu tez çalışması ışığında bundan sonra yapılacak çalışmalarda hasta ve kontrol gruplarındaki birey sayıları arttırılarak çok geniş kapsamlı bir metalloproteinaz belirteç çalışması gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca literatürde yapılan çalışmalar da göz önüne alınarak MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin aktivasyonları sadece zimografi yöntemi ile değil buna ek olarak mRNA ifadesinin kontrolü, ELISA gibi yöntemler kullanılarak karşılaştırmalı bir deney sistemi ile yanlış pozitiflik oranını azaltabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Barrett, A.J., 1966, Chondromucoprotein-degrading enzymes, *Nature* 211:1188-1190.
- Benbow, U., Brinckerhoff, CE., 1997, The Ap-1 site and mmp gene regulation: what is all the fuss about?, *Matrix Biol*, 15:519-26.
- Birkedal-Hansen, H., 1995, Proteolytic remodeling of extracellular matrix, *Curr Opin Cell Bio*,7: 728-35.
- Bogenrieder, T., Herlyn, M., 2003, Axis of evil: Molecular mechanisms of cancer metastasis, *Oncogene* 22: 6524-6536.
- Boyle, P., Levin, B.,2008, Dünya kanser raporu 2008, WHO press, 503p.
- Chambers, A.F. et al., 2002, Dissemination and growth of cancer Cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2: 563-572.
- Chen, C.H. et al.,2005, Serum matrix Metalloproteinases and Tissue inhibitors of Metalloproteinases in ankylosing spondylitis: mpp-3 is a reproducibly sensitive and specific biomarker of disease activity, *Advance Access Pub*, 45: 414-420.
- Christiansen, J.J., Rajasekaran, A.K., 2006, Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis, *Cancer Res* 66: 8319-8326.
- Duffy, M. J. et al, 2008, Cancer invasion and metastasis: changing views, *J Panthol* 214 : 283-293.
- Ellerbroek, S.M., Stack, M.S., 1999, Membrane associated matrix Metalloproteinases in metastasis, *Bioessays*, 21 : 940-9.
- Elshimali, Y.I. and Grody, W.W., 2006, The clinical significance of circulating tumor cells in the peripheral blood, *Diagn. Mol. Pathol*, 15: 187-193.
- Emara, M. et al., 2009, Serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 conventional Tumor markers in patients with colorectal and gastirc cancers, *Clin Chem Lab Med*, 47: 993-1000.
- Engbring, J.A., Kleinman, H.K., 2003, The basement membrane matrix in malignancy, *J Pathol* 200: 465-470.
- Feitosa, L. et al., 1998, Detection and characterization of Metalloproteinases with gelatinolytic activities in Brown spider venom. *Texicon* 36: 1039-1051.
- Fidler, I.J. et al., 2000, Critical determinants of neoplastic angiogenesis, *Cancer J* 6 Suppl 3, Huston, U.S.A.: S225-S236.
- Fidler, I.J., 2003, The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited, *Nat Rev Cancer* 3: 453-458.

- Gialeli, C. et al., 2010, Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting, *FEBS Journal* 278: 16-27.
- Glukhova, M., Deugnier, M.A., Thiery, J.P., 1995, Tumor progression: the role of cadherins and integrins, *Mol Med Today* 1: 84-89.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, Department of Biochemistry, San Francisco, 100:57-50.
- Holmbeck, K. et al., 1999, Mmp-1-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover, *Cell*, 99: 81-92.
- Itoh, Y. et al., 1998, Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface, *J. Biol. Chem.* 273:24360-24367.
- Jain, A. et al., 2001, Production of cytokines, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 by tenosynovium demonstrates its potential for tendon destruction in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum*, 44: 1754-1760.
- Jeziarska, A. et al., 2009, Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review, *Med Sci Monit* 15:RA32-40.
- Jodele, J. Et al., 2006, Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix Metalloproteinases in cancer progression, *Cancer Metastasis Rev* 25: 35-43.
- John, A., Tuszynski, G., 2001, The role of matrix Metalloproteinases in Tumor angiogenesis and metastasis, *Pathology Oncology Research*, 7: 14-23.
- Kahari, V.M., Saarialho-Kere, U., 1999, Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in Tumor growth and invasion, *Ann Med* 1999;31: 34-45.
- Kazerounian, S., Yee, K.O., Lawler, J., 2008, Thrombospondins: from structure to therapeutics thrombospondins in cancer, *Cell Mol Life Sci* 65:700-712.
- Kjeldsen, L. et al., 1993, Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase, *J. Biol Chem* 268: 10425-10432.
- Klug, W.S., Cummings M.R., Spencer C.A., 2006, *Concepts of Genetics*, 8th edition, Pearson Education, ISBN: 0-13-191833-8, 677p.
- La Rocca, G. et al., 2004, Zymographic detection and clinical correlations of mmp-2 and mmp-9 in breast cancer sera, *British Journal of Cancer*, 90: 1414-1421.
- Leber, T.M., Balkwill, F.R., 1997, Zymography: a single step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels, *Anal Biochem* 249:24-28.
- Lei, H. et al., 1996, A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor, *J. Clin Invest*, 98:1971-1978.

- Li, F. et al., 2007, Beyond tumorigenesis: cancer stem Cells in metastasis, *Cell Res* New York, U.S.A.,17: 3-14.
- Li, J., et al., 2002, Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer, *Clin Chem*, Baltimore, U.S.A., 48:1296-1304.
- Liabakk, N. et al., 1996, Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer, *Cancer Res*. 1996;56: 190-6.
- Liu, Z. Et al., 1998, Gelatinase b-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid, *J Exp Med* 188: 475-82.
- Luzzi, K.J. et al., 1998, Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary Cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases, *Am J Pathol* 153: 865-873.
- Martignetti, J.A. et al., 2001, Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome, *Nat Genet*, 28: 261-5.
- Masson, R. et al., 1998, In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy, *J Cell Biol*, 140: 1535-41.
- Massova, I. et al., 1998, Matrix Metalloproteinases: structures, evolution and diversification, *FASEB J*. 12: 1075-1095.
- Matsuyama, A. et al., 2003, Matrix Metalloproteinases as novel disease markers in takayasu arteritis, *Circulation*, 108: 1469-1473.
- Merlo, L.M. et al., 2006, Cancer as an evolutionary and ecological process, *Nat. Rev. Cancer* U.S.A., 6: 924-935
- Morgunova, E. et al., 1999, Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed, *Science* 284: 1667-1670.
- Moschos, S.J, et al, 2007, Integrins and cancer, *Oncology*, Williston Park, 21: 13-20.
- Murnane, M.J. et al., 2009, Active mmp-2 effectively identifies the presence of colorectal cancer, *Int J Cancer*, 125: 2893-2902.
- Nagase, H., Woessner, J.F., 1999, Minireview: matrix Metalloproteinases, *J Biol Chem*, 274: 21491-21494.
- Nass, S.J., Moses, H.L., 2007, Cancer biomarkers: the promises and challenges of improving detection and treatment, *The National Academies Press*, Washington, D.C., ISBN: 0-309-66711-9, 250p.
- Nikkola, J. et al., 2005, High serum level of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma, *Clin Cancer Res* 11: 5158-5166.
- Olivier, M. et al., 2008, Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther Advance press*, Lyon, 16:1-12.

- Parks, W.C., Mecham, R.P., 1998, Matrix metalloproteinases, San Diego: Academic Press, 115-48.
- Parton, M., Dowsett, M., Smith, I., 2001, Studies of apoptosis in breast cancer, *BMJ* 332:1528-1532.
- Paterlini-Brechot, P., Benali, N., 2007, Circulating Tumor Cells (CTC) detection: clinical impact and future directions, INSERM, Paris, France, *Cancer Lett* 253: 180-204.
- Pepe, M.S. et al., 2001, Phases of biomarker development for early detection of cancer, *J Natl Cancer Inst* 93: 1054-1061.
- Reddel, R.R., 2000, The role of senescence and immortalization in carcinogenesis, *Carcinogenesis*, Children's Medical Research Institute, Sydney 21: 477-484.
- Reponen, P. et al., 1994, High expression of 92-kDa type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during Mouse development, *J Cell Biol*, 124:1091-1102.
- Ring, P. et al., 1997, Expression of Tissue inhibitor of Metalloproteinases TIMP-2 in human colorectal cancer: a predictor of tumor stage. *Br J Cancer* 1997;76:805-11.
- Schulz, W.A., 2005, Molecular biology of human cancers, an advance student's book, Springer, 529p.
- Schwab, M. 2008, Encyclopedia of Cancer (2nd edition), Springer-Verlag, ISBN: 978-3-540-36847-2, Berlin-Heidelberg, 3306p.
- Shay J.W. et al., 2006, Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nat. Rev. Drug Discov* 5 :577-584.
- Shiple, J.M. et al., 1996, Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 93: 3942-6.
- Srivastava, S., Wagner, P., 2007, Risk-based and diagnostics-linked personalized medicine for Cancer, *Personal Medicine* 4: 33-43.
- Surbone, A., 2001, Ethical implications of genetic testing for breast cancer susceptibility, *Crit. Rev. Onc./Hem.* 40:149-57.
- Thiery, J.P., Sleeman, J.P., 2006, Complex Networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions, *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 131-142.
- Tutton, M.G. et al., 2003, Use of plasma mmp-2 and mmp-9 levels as a surrogate for Tumor expression in colorectal cancer patients, *Int. J. Cancer*, United Kingdom: 107, 541-550.
- Varmus, H., Weinberg, R.A., 1993, Genes and the biology of cancer, New York, NY: Scientific American Library: 153p.
- Vihinen, P. et al., 2002, Matrix Metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets, *Int J Cancer*, 99: 157-66.

- Vorovich, E. et al., 2008, Comparison of mmp-9 and bnp as clinical biomarkers in chronic heart failure, *Am Heart J.*, 155: 992-997.
- Vuoristo, M.S. et al., 2000, Serum matrix metalloproteinase-2 as a prognostic marker in advanced cutaneous melanoma, *Acta Oncol*, 39:877-9.
- Weinberg, R.A., 2007, *The biology of cancer*, ISBN:0-8153-4078-8, Garland Science, New York, 796p.
- Zankl, A. et al., 2005, Winchester syndrome caused by a homozygous mutation affecting the active site of matrix metalloproteinase 2, *Clinical Genetics*, 67:261-266.
- Zeng, Z.S. et al., 1999, Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of Metalloproteinases 2 and 9 during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 20: 749-55.
- Zeng, Z.S. et al., 2002, Matrix metalloproteinase: evidence for involvement of mmp-7 activation in human cancer metastases, *Clin Cancer Res* 8: 144-148.
- Zucker, S., Cao, J., 2005, Measurement of matrix metalloproteinases in serum of patient with melanoma: snarled in technical pitfalls, *Clin Cancer Res* 11: 5069-5070.

T.C. Sağlık Bakanlığı, 2005 yılı Türkiye kanser istatistikleri.

<http://www.who.int>

<http://www.globocan.iarc.fr>

<http://www.kanser.gov.tr>

<http://www.cancer.gov>

<http://www.atlasgeneticsoncology.org>

<http://www.arthritis-research.com>

<http://www.anaximperator.wordpress.com>


T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
ETİK KURUL TOPLANTI RAPORU

OTURUM NO : 109
OTURUM TARİHİ : 06 Mayıs 2008
OTURUM BAŞKANI : Prof. Tbp. Kd. Alb. Ali Uğur URAL
OTURUM SEKRETERİ : Doç. Dr. Ecz. Kd. Alb. Adnan ATAÇ


GATA Etik Kurulu'nun 06 Mayıs 2008 günü yapılan 109. oturumunda, GATA Gastroenteroloji BD'dan Uzm. Tbp. Yb. Zülfikar Polat'ın sorumlu araştırmacılığını yaptığı "**Gastrointestinal Kanser Hastalarında Tümör Belirteçlerinin Saptanmasında Metilasyon-Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MSP) ve Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemlerinin Karşılaştırılması**" başlıklı, çok merkezli, tanı geliştirme çalışması olan araştırma dosyası değerlendirildi.

Araştırma dosyasının amaç, yöntem ve yaklaşım bakımından etik ilkelere UYGUN olduğuna karar verildi.

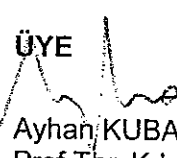
BAŞKAN


Ali Uğur URAL
Prof.Tbp.Kd.Alb.


ÜYE


Ali İhsan UZAR
Prof.Hv.Tbp.Kd.Alb.

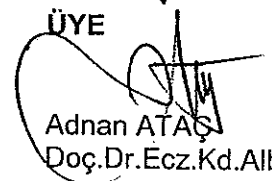
ÜYE


Ayhan KUBAR
Prof.Tbp.Kd.Alb.

ÜYE


Tunçer HAZNEDAROĞLU
Prof.Dz.Tbp.Alb.

ÜYE


Adnan ATAÇ
Doç.Dr.Ecz.Kd.Alb.


ÜYE


Mükerrerem SAFALI
Doç.Tbp.Kd.Alb.


ÜYE


K. Melih AKAY
Doç.Tbp.Kd. Alb.

ÜYE


Mustafa ÖZER
Doç.Tbp.Alb.

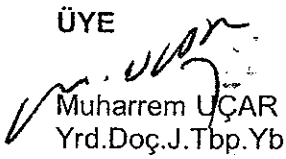
ÜYE


Ergun TOZKOPARAN
Doç. Tbp. Alb.

ÜYE

Toplantıda Raportör
Nalan AKBAYRAK
Prof. Dr. Sağ. Yb.

ÜYE


Muharrem UÇAR
Yrd.Doç.J.Tbp.Yb.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ömer Kerem SELÇUK

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1986

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise 2001-2004 Ankara Anadolu Lisesi

Lisans 2004-2009 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil İngilizce