

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLON VE REKTUM KANSERLERİNDE
ENDOSTATİN'İN
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-2 ÜZERİNE
GÖSTERDİĞİ ETKİNİN ARAŞTIRILMASI**

ZAHİDE ÇAVDAR

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2008

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLON VE REKTUM KANSERLERİNDE
ENDOSTATİN'İN
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-2 ÜZERİNE
GÖSTERDİĞİ ETKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

ZAHİDE ÇAVDAR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Gülgün Oktay

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2005.KBSAG020 sayı ile desteklenmiştir.)

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında, beni daima destekleyerek bilgi ve deneyimlerini aktaran değerli danışman hocam Prof. Dr. Gülgün Oktay'a, Değerli katkı ve önerileri ile çalışmamın tamamlanmasına yardımcı olan tez izleme komitesindeki değerli hocalarım Prof. Dr. Banu Önvural ve Prof. Dr. Meral Sakızlı'ya, Materyal sağlamamızda büyük katkıları olan Sayın Prof. Dr. Cem Terzi'ye, hastalara ait klinikopatolojik değişkenlerin düzenlenmesi ve istatistiksel analizlerin gerçekleşmesinde elinden gelen her yardımı esirgemeyen Sayın Uzman Dr. Emre Canda'ya, Laboratuvar olanaklarını kullanarak tezimin *in vitro* bölümünü Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirmemi sağlayan, bilimsel gelişimimde önemli katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. İsmet Gürhan Deliloğlu'na ve hücre kültür çalışmalarında bilgi ve deneyimlerinden yararlanmamı sağlayan Sayın Araş. Gör. Sultan Gülçe İz'e, *In vitro* deneylere ait bulguların istatistiksel analizlerin gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Gül Saatli'ye, Bilgi ve deneyimlerini her fırsatta paylaşan, Sayın Doç. Dr. Şermin Genç, Sayın Doç. Dr. Kürşad Genç ve Uzman Dr. Mehtap Yüksel Eğrilmez'e, Deneysel çalışmalarım sırasında ARLAB olanaklarından yararlanmamı sağlayan Sayın Doç. Dr. Halil Resmi'ye, Dr. Memduh Bülbül ve tüm ARLAB çalışanlarına,

Ve yeniden Dokuz Eylül Üniversitesi'ndeki tüm eğitimim boyunca Biyokimya'ya ilgi duymamı sağlayan, bana her türlü mesleki bilgi-deneyimlerini aktaran, bilimsel motivasyonumu sağlayan ve destekleyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. Banu Önvural ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü ve ARLAB Yöneticisi Sayın Hocam Prof. Dr. Gül Güner'e ve diğer tüm hocalarıma,

Doktora eğitimim süresince sabır ve özveri ile her zaman desteğini hissettiğim değerli eşime ve doktora eğitimim ile beraber büyüyen canım oğlum Arman'a sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Zahide Çavdar

İzmir, 2008

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi	vii
Şekil Listesi	ix
Kısaltmalar	xi
Türkçe Özet	xiii
İngilizce Özet.....	xvi

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
------------------------	---

İKİNCİ BÖLÜM

2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ekstrasellüler Matriks.....	3
2.1.1. Bazal Membran.....	4
2.2. Ekstrasellüler Matriks Proteolizi	
2.2.1. Matriks Metalloproteinazlar	5
2.2.1.1. Genel Yapısal Özellikleri	5
2.2.1.2. Matriks Metalloproteinazların Biyolojik Rollerini.....	5
2.2.1.3. Matriks Metalloproteinazların Sınıflandırılması	5
2.2.1.3.1. Jelatinazlar: MMP-2 ve MMP-9.....	5
2.2.1.3.1.1. Jelatinazların Regülasyonu.....	9
2.2.1.3.1.2. Endojen MMP-2 Aktivatör Proteini:	
MT-1 MMP	11
2.2.1.3.1.3. Endojen MMP-2 Doku İnhibitör Proteini:	
TIMP-2	11
2.2.1.3.1.3.1. TIMP-2 Bağımlı MT-1 MMP	
aracılı ProMMP-2 Aktivasyon	
Mekanizması	12
2.3. Endostatin: Anjiogenez İnhibitörü.....	13
2.3.1. Endostatinin Yapısal Özellikleri.....	13
2.3.2. Endostatinin Hücre Yüzey Reseptörleri	14
2.3.3. Endostatinin Etki Mekanizması.....	14

2.4. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü: Anjiogenez Stimülatörü.....	16
2.4.1. VEGF Ailesi.....	16
2.4.2. VEGF Reseptörleri.....	17
2.4.3. VEGF Ekspresyonunun Regülasyonu.....	17
2.5. Tümör Hücre İnvazyonu ve Metastaz Oluşumu.....	19
2.5.1. Tümör-Stroma Etkileşimi ve Matris Metalloproteinazların Sekresyonu.....	20
2.6. Kolorektal Kanser.....	22
2.6.1 Kolorektal Karsinomların Evrelendirilmesi.....	22

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	24
3.1 DOKU ÇALIŞMALARI.....	24
3.1.1 MATERYAL.....	24
3.1.1.1 Kolon ve Rektum Doku Örneklerinin Eldesi.....	24
3.1.1.2 Hasta Bilgileri.....	24
3.1.2 YÖNTEMLER.....	24
3.1.2.1 MMP-2, TIMP-2 ve MT-1 MMP İle İlişkili Analizler.....	24
3.1.2.1.1 Dokuların Hazırlanması.....	24
3.1.2.1.2 Protein Analizi.....	27
3.1.2.1.3 Jelatin Zimografi.....	27
3.1.2.1.4 TIMP-2 Analizi.....	30
3.1.2.1.5 MT-1 MMP Analizi.....	33
3.1.2.2 Endostatin İle İlişkili Analizler.....	34
3.1.2.2.1 Dokuların Hazırlanması.....	34
3.1.2.2.2 Protein Analizi.....	35
3.1.2.2.3 ELISA Analizi.....	35
3.1.2.2.4 Western Blot Analizi.....	37
3.1.2.2.4.1 SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması.....	37
3.1.2.2.4.2 Örneklerin Hazırlanması.....	38
3.1.2.2.4.3 Jelin Yüklenmesi.....	38
3.1.2.2.4.4 Elektroforetik Yürütme.....	38
3.1.2.2.4.5 Proteinlerin Membrana Transferi.....	40

3.1.2.2.4.6 İlgili Proteinin Görünür Hale Getirilmesi.....	41
3.1.2.3 VEGF Analizi.....	43
3.1.2.4 İstatistiksel Analiz.....	45
3.2 İN VİTRO DENEYLER.....	46
3.2.1 MATERYAL.....	46
3.2.1.1 Besi Ortamı Hazırlanması.....	46
3.2.1.2 Fetal Sığır Serumun (FBS) İnaktive Edilmesi.....	46
3.2.2 YÖNTEMLER.....	46
3.2.2.1 Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi.....	46
3.2.2.2 Hücre Sayımı ve Tripan Mavisi Canlılık Testi.....	47
3.2.2.3 Hücrelerin Pasajlanması.....	49
3.2.2.4 Hücrelerin Dondurulması.....	49
3.2.2.5 Rekombinant Endostatinin Hazırlanması.....	50
3.2.2.6 Hücrelerin Analiz İçin Hazırlanması.....	50
3.2.2.6.1 MTT Testi.....	52
3.2.2.6.2 Protein Analizi.....	53
3.2.2.6.3 Jelatin Zimografi Analizi.....	53
3.2.2.6.4 TIMP-2 Analizi.....	53
3.2.2.6.5 MT-1 MMP Analizi.....	53
3.3.2.6.6 İnvazyon Analizi.....	54
3.3.2.6.6 İstatistiksel Analiz.....	56

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4. BULGULAR.....	57
4.1. DOKU ÇALIŞMALARI.....	57
4.1.1. MMP-2, TIMP-2 ve MT-1 MMP Analizlerine İlişkin Sonuçlar.....	57
4.1.1.1. Kolon ve Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularında Protein Düzeyleri.....	57
4.1.1.2. Jelatinaz Aktivite Düzeyleri.....	58
4.1.1.2.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Jelatinaz Aktivite Düzeyleri.....	58
4.1.1.2.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Jelatinaz Aktivite Düzeyleri.....	60

4.1.1.3. TIMP-2 Düzeyleri	61
4.1.1.3.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda TIMP-2 Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	62
4.1.1.3.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda TIMP-2 Düzeylerinin Karşılaştırılması	62
4.1.1.4. MT-1 MMP Düzeyleri.....	63
4.1.1.4.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda MT-1 MMP Düzeylerinin Karşılaştırılması	63
4.1.1.4.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda MT-1 MMP Düzeylerinin Karşılaştırılması	64
4.1.1.5. TIMP-2/MT-1 MMP Oranları	64
4.1.1.5.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda TIMP-2/MT-1 MMP Oranları	64
4.1.1.5.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda TIMP-2/MT-1 MMP Oranları	65
4.1.2. Endostatin Düzeylerine İlişkin Sonuçlar	65
4.1.2.1. Kolon ve Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Protein Düzeyleri.....	65
4.1.2.2. ELISA Sonuçları	66
4.1.2.2.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Endostatin Düzeylerinin Karşılaştırılması	67
4.1.2.2.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Endostatin Düzeylerinin Karşılaştırılması	68
4.1.2.3. Endostatin Protein Ekspresyonunun Western Blot İle Gösterilmesi.....	68
4.1.2.3.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Endostatin Protein Ekspresyonu	68
4.1.2.3.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Endostatin Protein Ekspresyonu	69
4.1.3. VEGF Düzeyleri	71
4.1.3.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda VEGF Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	71

4.1.3.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda VEGF Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	72
4.1.4. Klinikopatolojik Değişkenler İle Biyokimyasal Parametreler Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi.....	72
4.1.4.1. Kolon Kanseri Klinikopatolojik Değişkenler İle Biyokimyasal Parametrelerin Anlamlı İlişkileri.....	72
4.1.4.2. Rektum Kanseri Klinikopatolojik Değişkenler İle Biyokimyasal Parametrelerin Anlamlı İlişkileri.....	73
4.2. İN VİTRO DENEY SONUÇLARI.....	77
4.2.1. HT-29 Hücrelerinin Morfolojileri ile İlgili Gözlemler.....	77
4.2.2. <i>Rekombinant Endostatinin HT-29 Hücre Canlılığına Etkisi</i>	77
4.2.3. <i>Rekombinat Endostatinin HT-29 Hücre Dizisinde MMP-2 ve TIMP-2 Üzerine Etkisi</i>	79
4.2.3.1. Hücre Kültür Ortamı Protein Düzeyleri.....	79
4.2.3.2. Rekombinant Endostatinin HT-29 Hücre Dizisinde MMP-2 Jelatinolitik Aktivitesine Etkisi.....	81
4.2.3.3. Rekombinant Endostatinin HT-29 Hücre Dizisinde TIMP-2 Düzeyine Etkisi.....	83
4.2.4. Rekombinat Endostatinin HT-29 Hücre Dizisinde MT-1 MMP Üzerine Etkisi.....	84
4.2.4.1. Protein Düzeyleri.....	84
4.2.4.2. Rekombinant Endostatinin MT-1 MMP Aktivitesine Etkisi.....	86
4.2.5. Rekombinant Endostatinin HT-29 Hücre Dizisinde TIMP-2/MT-1 MMP Oranına Etkisi.....	87
4.2.6. Rekombinant Endostatinin HT-29 Hücre İnvazyonuna Etkisi.....	88
4.2.7. Biyokimyasal Parametreler Arasındaki Korelasyonlar.....	91
4.2.7.1. ProMMP-2 Jelatinolitik Aktivite Düzeyi ile Hücre Canlılığı Arasındaki Korelasyon.....	91
4.2.7.2. Aktif MT-1 MMP Düzeyi ile İnvazyon Arasındaki Korelasyon.....	92
4.2.7.3. TIMP-2/MT-1 MMP Oranı ile İnvazyon Arasındaki Korelasyon.....	92

BEŞİNCİ BÖLÜM

5. TARTIŞMA VE SONUÇ94

ALTINCI BÖLÜM

6. KAYNAKLAR111

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: MMP'lerin substratlarına göre sınıflandırılması.....	7
Tablo 2: Kolorektal karsinomların Duker evrelendirme sistemi.....	23
Tablo 3: Kolorektal karsinomların TNM evrelendirme sistemi	23
Tablo 4: Kolon tümörlü hastaların klinikopatolojik özellikleri.....	25
Tablo 5: Rektum tümörlü hastaların klinikopatolojik özellikleri	26
Tablo 6: Jelatin Zimografi yönteminde poliakrilamid jellerin hazırlanması.....	29
Tablo 7: Jelatin Zimografi yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	31
Tablo 8: SDS-PAGE yönteminde ayırıcı jelin hazırlanması.....	39
Tablo 9: SDS-PAGE yönteminde paketleyici jelin hazırlanması.....	39
Tablo 10: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında protein düzeyleri	57
Tablo 11: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında protein düzeyleri.....	58
Tablo 12: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında jelatin zimografi sonuçları	59
Tablo 13: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında jelatin zimografi sonuçları.....	61
Tablo 14: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında TIMP-2 protein düzeyleri.....	62
Tablo 15: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında TIMP-2 protein düzeyleri.....	62
Tablo 16: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında MT-1 MMP düzeyleri	63
Tablo 17: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında MT-1 MMP düzeyleri	64
Tablo 18: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında TIMP-2/MT-1 MMP oranları.....	64
Tablo 19: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında TIMP-2/MT-1 MMP oranları....	65
Tablo 20: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında protein düzeyleri	66
Tablo 21: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında protein düzeyleri.....	66
Tablo 22: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında endostatin düzeyleri	67
Tablo 23: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında endostatin düzeyleri.....	68
Tablo 24: Kolorektal kanserli hastalarda klinikopatolojik değişkenler ile endostatin ekspresyonu arasındaki ilişki	70
Tablo 25: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında VEGF düzeyleri	71
Tablo 26: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında VEGF düzeyleri.....	72
Tablo 27: Kolon tümör aktif MMP-9 düzeyi ile tümör invazyon derinliği arasında saptanan ilişki... ..	73
Tablo 28: Kolon tümör aktif MMP-9 düzeyi ile uzak metastaz arasında saptanan ilişki....	73

Tablo 29: Rektum tümör MMP-9, rMMP-9 ve rMMP-2 değerleri ile tanı anı metastaz arasında saptanan ilişki.....	74
Tablo 30: Rektum tümör proMMP-9 ve proMMP-2 ile lenf nodu metastazı arasında saptanan ilişki.....	74
Tablo 31: Rektum tümör aktif MMP-9 ve VEGF düzeyleri ile perinöral invazyon arasında saptanan ilişki.....	75
Tablo 32: Rektum tümör TIMP-2 düzeyleri ile nüks arasında saptanan ilişki.....	75
Tablo 33: Kontrol ve deney gruplarında canlılık yönünden anlamlılık düzeyleri.....	78
Tablo 34: Kontrol ve deney gruplarının ortalama protein düzeyleri.....	80
Tablo 35: Kontrol ve deney gruplarında proMMP-2 jelatinolitik aktivite düzeyleri yönünden anlamlılık düzeyleri.....	83
Tablo 36: Kontrol ve deney gruplarında hücre lizati ortalama protein düzeyleri.....	85

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: MMP'lerin yapılarına göre sınıflandırılması	6
Şekil 2: Jelatinazların transkripsiyonel düzeyde regülasyonu.....	9
Şekil 3: Pro-enzim aktivasyon mekanizması.....	10
Şekil 4: MMP aktivasyon kaskadı.....	10
Şekil 5: TIMP-2 bağımlı MT-1 MMP aracılı MMP-2 aktivasyon mekanizması	12
Şekil 6: Kollajen XVIII'in yapısı ve endostatin oluşumu	13
Şekil 7: Endostatinin etki mekanizmaları.....	15
Şekil 8: VEGF reseptörleri ve etki mekanizmaları.....	18
Şekil 9: VEGF ekspresyonunun regülasyonu.....	19
Şekil 10: Tümör hücre invazyonu ve metastazı.....	20
Şekil 11: Tümör stroma etkileşimi	21
Şekil 12: Doku çalışmaları ile ilgili deney akış çizelgesi.....	28
Şekil 13: TIMP-2 için ELISA ile ölçüm yöntem şeması.....	32
Şekil 14: MT-1 MMP ölçümü için kullanılan yöntem şeması	33
Şekil 15: Endostatin için ELISA ile ölçüm yöntem şeması.....	35
Şekil 16: Proteinlerin SDS ile denatüre edilerek negatif yüklenmesi	37
Şekil 17: Western Blot yönteminde yarı-kuru transfer sistemi	41
Şekil 18: Western Blot yönteminde ilgili proteinin görünür hale getirilmesinde izlenen aşamalar	43
Şekil 19: Bürker tip hemositometre.....	47
Şekil 20: İn vitro deneyler için akış çizelgesi.....	51
Şekil 21: İn vitro invazyon deneyi.....	55
Şekil 22: BSA standart kalibrasyon eğrisi.....	57
Şekil 23: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında jelatin zimogram görüntüsü.....	58
Şekil 24: Rektum tümör ve normal dokularında jelatin zimogram görüntüsü	60
Şekil 25: TIMP-2 standart kalibrasyon eğrisi.....	61
Şekil 26: MT-1 MMP standart kalibrasyon eğrisi.....	63
Şekil 27: BSA standart kalibrasyon eğrisi.....	65
Şekil 28: Endostatin standart kalibrasyon eğrisi.....	67
Şekil 29: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında endostatin ekspresyonu	68
Şekil 30: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında endostatin ekspresyonu.....	69

Şekil 31: VEGF standart kalibrasyon eğrisi	71
Şekil 32: Çoğalmakta olan HT-29 hücreleri.....	77
Şekil 33: Pasaja hazır HT-29 hücreleri.....	77
Şekil 34: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	78
Şekil 35: BSA standart kalibrasyon eğrisi.....	79
Şekil 36: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinde proMMP-2 jelatinolitik aktivitesi üzerine etkisinin jelatin zimografi yöntemi ile incelenmesi.....	81
Şekil 37: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinde proMMP-2 jelatinolitik aktivite düzeylerine etkisi.....	82
Şekil 38: TIMP-2 standart kalibrasyon eğrisi.....	83
Şekil 39: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinde TIMP-2 düzeylerine etkisi.....	84
Şekil 40: BSA standart kalibrasyon eğrisi.....	85
Şekil 41: MT-1 MMP standart kalibrasyon eğrisi	86
Şekil 42: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinde MT-1 MMP düzeylerine etkisi	87
Şekil 43: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinde TIMP-2/MT-1 MMP oranına etkisi	88
Şekil 44: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinin invazyonuna etkisi.....	89
Şekil 45: İnvazyon deneyinde kontrol ve deney gruplarına ait mikroskopik görüntüler	90
Şekil 46: ProMMP-2 aktivite düzeyi ve canlılık arasındaki korelasyon grafiği ve regresyon doğrusu	91
Şekil 47: MT-1 MMP aktivite düzeyi ile invazyon arasındaki korelasyon grafiği ve regresyon doğrusu	92
Şekil 48: TIMP-2/MT-1 MMP oranı ile invazyon arasındaki korelasyon grafiği ve regresyon doğrusu	93

KISALTMALAR

- ESM** : Ekstrasellüler matriks
- VEGF** : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
- MMP** : Matriks Metalloproteinaz
- MMP-2**..... : Matriks Metalloproteinaz-2
- MMP-9**..... : Matriks Metalloproteinaz-9
- MT-1 MMP** : Membrana bağlı Tip 1 Matriks Metalloproteinaz
- TIMP-2** : Matriks Metalloproteinaz-2 Doku İnhibitör Proteini
- HT-29** : İnsan kolon adenokarsinoma hücre dizisi
- Arg** :Arjinin amino asidi
- Gly** :Glisin amino asidi
- Asp** :Aspartat amino asidi
- RGD** : Arg-Gly-Asp
- PA**..... : Plasminojen Aktivatörü
- TIMP**..... : Metalloproteinaz Doku İnhibitörü
- EGF** : Epidermal Büyüme Faktörü
- TGF- α** : Transforme Edici Büyüme Faktörü- α
- TNF- α** : Tümör Nekroz Edici Faktör- α
- MAP Kinase** : Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)
- MAPKKK**..... : MAPK kinase kinases
- ERK** : Extracellular Signal-Regulated Kinase
- JNK** : c-Jun N-Terminal Kinase
- AKT** : Active serine/threonine kinase
- AP-1** : Aktivatör Protein-1
- ETS**..... : Transkripsiyon Faktörü
- NF- κ B** : Nuclear factor kappa β Transcription Factor
- EOMA**..... : Murine Hemanjiomaendotelyoma
- NC-1** : Non-Collagenous domain-1
- Src-kinaz**..... : Sinyal İleti Yolağı
- PIGF**..... :Plasental Büyüme Faktörü
- NRP-1**..... : Nöropilin-1
- NRP-2**..... :Nöropilin-2

PI3K..... : Fosfotidil İnozitol-3-Kinaz
Sp-1 : Spesifik protein-1 transkripsiyon faktörü
HIF-1..... : Hipoksi ile indüklenen transkripsiyon faktörü
Stat-3..... : Sinyal ileten ve aktivatör transkripsiyon faktör-3
TNM..... : Tumour, Node, Metastasis
BCA..... : Bicinchoninic Acide
Cu⁺² : Bakır elementi
BSA : Sığır Serum Albumin
SDS..... : Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE : Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
ELISA : Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
TMB..... : Tetrametilbenzidin
PMSF : Fenil Metil Sülfonil Florid (Serin proteaz inhibitörü)
APS..... : Amonyum persülfat
TEMED : Tetraetilmetildiamin
PVDF : Polivinildendiflorid
DMEM..... : Dulbecco's Modified Eagle's Media
FBS..... : Fetal Bovine Serum
MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
rMMP-2 : Aktif MMP-2/ProMMP-2 oranı
rMMP-9 : Aktif MMP-9/ProMMP-9 oranı

ÖZET

KOLON VE REKTUM KANSERLERİNDE ENDOSTATİN'İN MATRİKS METALLOPROTEİNAZ - 2 ÜZERİNE GÖSTERDİĞİ ETKİNİN ARAŞTIRILMASI

Zahide Çavdar

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
35340 Balçova-İzmir

Giriş: Kolorektal kanser, görülme sıklığı en yüksek olan kanserler arasındadır. Anjiogeneze bağımlı olan tümör metastazı ve progresyonu; bazal membran (BM) ve ekstrasellüler matriksin (ESM) degradasyonu, hücre adezyonunun değişmesi ve tümör hücresinin fiziksel hareketliliğini kapsar. Tüm bu aşamalar içinde; aşırı ESM yıkımı tümör metastaz ve progresyonunda önemli rollere sahiptir. ECM'in degradasyonunda birçok proteinaz sistemleri rol oynamakla birlikte matriks metalloproteinazlar (MMP) bunların başında yer alır. Yapılan deneysel kanser modellerinde ve hasta çalışmalarında MMP-2 ve MMP-9'un kolorektal kanser progresyonu, invazyonu ve metastazında rolleri olduğu bildirilmektedir. Bu enzimlerin aktiviteleri ekstrasellüler olarak regüle edilir ve regülasyonları pro-enzim aktivasyonu ile doku inhibitör proteinleri olan TIMP'ler arasındaki dengeye bağlıdır. Bundan başka MMP-2 ve MMP-9'un VEGF gibi proanjiogenik ve endostatin gibi antianjiogenik moleküllerin oluşumunda da rol aldığı bildirilmektedir. Bu nedenle bu enzim sisteminin aktivasyonu tümör progresyonunda farklı aşamalarda büyük önem taşımaktadır.

Amaç: Kolon ve rektum kanserlerinin gelişim mekanizmalarına ilişkin literatür incelediğinde bu mekanizmaların birbirinden farklı olduğunu bildiren çalışmalar ve bunların total kolorektal olarak değil homojen ayrı iki tip tümör grubu olarak çalışılmasını savunan görüşler vardır. Biz de bu görüşü savunarak, gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada kolorektal kanserleri kolon ve rektum tümörü olarak homojen ayrı iki grup olarak değerlendirdik. Bu araştırmanın temel amacı jelatinaz aktivasyon düzeylerini, MMP-2'nin endojen inhibitör proteini TIMP-2, aktivatör proteini MT-1 MMP ve anjiogeneze regülasyonunda rol oynayan anjiogenik potansiyeli yüksek olan VEGF ve anjiogeneze inhibitörü endostatin düzeylerini her iki tip tümör ve eşlenik normal dokularda ayrı ayrı araştırmak ve bu parametrelerin klinikopatolojik

değişkenler ile ilişkisini tanımlamaktır. Ayrıca *in vitro* koşullarda HT-29 kolon adenokarsinoma hücre dizinde rekombinant endostatinin hücre canlılığı, invazyonu, MMP sekresyonu ve aktivitesi üzerine etkilerini araştırmaktır.

Materyal ve Yöntem: Çalışma 50 kolon ve 34 rektum tümörlü hastadan alınan tümör ve eşlenik normal dokularda gerçekleştirildi. MMP-2, MMP-9 aktivasyon düzeyleri jelatin zimografi ile incelenmiştir. MT-1 MMP aktivite düzeyleri enzim aktivite ölçüm yöntemi ile analizlenmiştir. VEGF, endostatin ve TIMP-2'nin protein düzeyleri ise ELISA ile belirlenmiştir. Ayrıca tümör ve eşlenik normal dokulardaki endostatin ekspresyonu Western Blot yöntemi ile araştırılmıştır. *In vitro* deneylerde HT-29 hücrelerinin canlılığı MTT testi ile değerlendirildi. Hücrelerin invazyon yetenekleri, matrijel ile kaplanmış 8 µm büyüklüğünde por içeren hücre plaklarında değerlendirilmiştir.

Bulgular: Kolon tümör dokusunda MMP-2'nin pro ve aktif, MMP-9'un ise aktif formları eşlenik normal dokuya göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Kolon tümör ve eşlenik normal doku TIMP-2, MT-1 MMP, endostatin ve VEGF protein düzeylerinde anlamlı olarak farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Parametreler ile klinikopatolojik değişkenler incelendiğinde tümör dokusu aktif MMP-9 ile tümör invazyon derinliği pT1 vs pT3-4 ($p=0.011$) ve uzak metastaz varlığı arasında anlamlı ilişki saptandı. Rektum tümör dokusunda ise MMP-2 ve MMP-9'un hem pro hem de aktif formlarının aktivite düzeyleri, eşlenik normal doku aktivite düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$). Rektum tümör ve eşlenik doku TIMP-2, MT-1 MMP, endostatin ve VEGF protein düzeylerinde anlamlı olarak farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Parametreler ile klinikopatolojik değişkenler arasındaki ilişki incelendiğinde ise rektum tümör aktif MMP-9 ve aktif MMP-2/ProMMP-2 (rMMP-2) ile tanı anı metastaz arasında (sırasıyla; $p=0.002$ ve $p=0.006$); ve tümör aktif MMP-9 ile perinöral invazyon varlığı arasında ($p=0.042$); tümör proMMP-9 ve proMMP-2 ile lenf nodu metastazı (sırasıyla; $p=0.012$, $p=0.021$); tümör TIMP-2 düzeyleri ile nüks arasında ($p=0.011$) ve tümör VEGF düzeyleri ile perinöral invazyon arasında anlamlı ilişki saptandı ($p=0.044$). Ayrıca rektum tümör çapı ile VEGF düzeyleri arasında anlamlı orta derecede pozitif korelasyon belirlendi ($p=0.009$ $r=0.454$). *In vitro* deneyler ile rekombinant endostatinin HT-29 hücre dizinde hücre canlılığını ve proMMP-2 aktivite düzeylerini anlamlı olarak azalttığı saptandı ($p<0.05$). Korelasyon analizi ile proMMP-2 aktivite düzeyleri ile hücre canlılığının olumlu orta derecede pozitif korele olduğu gösterildi ($p=0.007$ $r=0.423$). Rekombinant endostatinin MT-1 MMP aktivitesi ve invazyon üzerine azaltıcı etkisi olduğu gözlemlendi fakat aradaki fark,

anlamli olarak bulunmadı. Bununla birlikte TIMP-2/MT-1 MMP oranının endostatin eklenen deney gruplarında kontrol grubuna göre anlamli olarak arttığı saptandı ($p < 0.05$). İnvazyon ile MT-1 MMP arasında pozitif yönde çok güçlü pozitif ($p = 0.000$, $r = .991$) korelasyon saptandı. İnvazyon ile TIMP-2/MT-1 MMP oranı arasında ise ters yönde çok güçlü anlamli ($p = 0.00$, $r = -.962$) korelasyon bulundu.

Sonuç: Kolon tümörlerinde aktif MMP-9 ile tümör invazyon derinliği “pT1 vs pT3-4” ve uzak metastaz varlığı arasında saptanan anlamli ilişki, kolon kanserinin agresif kliniğinde önemli rol oynayabilir. Rektum tümörlerinde MMP-2 ve MMP-9 aktivite seviyeleri, TIMP-2, VEGF seviyeleri ile tanı anı metastaz, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı ve nüks arasında saptanan anlamli ilişkilerin rektal kanser prognozuna yönelik ileri çalışmalar için katkısı olabileceğini düşünmekteyiz. Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinde hücre canlılığı ve MMP-2 sekresyonuna yönelik bulgularımızın da kolon kanserinde antikanser stratejilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar için yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Kolon kanseri, rektum kanseri, endostatin, matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2)

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ENDOSTATIN ON MATRIX METALLOPROTEINASE - 2 IN COLON AND RECTUM CANCERS

Zahide Çavdar

Dokuz Eylül University Health Sciences Institute
35340 Balçova-İzmir-TURKEY

Background: Colorectal cancer, one of the most prevalent cancers worldwide, is the second leading cause of cancer-related mortality in developed countries. Tumor metastasis and progression, which depend on angiogenic process, include the proteolytic degradation of the basement membrane (BM), and the extracellular matrix (ECM), altered cell adhesion and the physical movement of tumor cells. Among these steps, excessive degradation of the matrix is one of the hallmarks of this process. Many proteinases are capable of degrading ECM components, but the proteinase system primarily responsible for ECM degradation is matrix metalloproteinase (MMPs). MMP-2 and MMP-9 have been implicated to play a role in colorectal cancer progression, invasion and metastasis in animal models and patients. The enzyme activity is regulated extracellularly and its regulation is mainly based on the balance between pro-enzyme activation and inhibition by tissue inhibitors of MMPs (TIMPs). Furthermore previous studies have shown that MMP-2 and MMP-9 may directly regulate angiogenesis by generating pro-angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), as well as the anti-angiogenic factor endostatin. Hence the regulation of the activity of these proteinases appears to be of great importance in tumor progression at different stages.

Aim: Since observations support the theory that development of colon and rectal cancers may involve different mechanisms, we classified colorectal cancer into colon and rectal cancer. We focused on the activity level of MMP-2, MMP-9, TIMP-2, MT-1 MMP, VEGF and endostatin protein level between tumor areas compared with normal tissue specimens and investigated potential relationships between these parameters and clinicopathological variables in colon and rectal cancers. With *in vitro* experiments, we also examined how these MMP-2 secretion and activity may be regulated by recombinant endostatin and we also determined the possible role of endostatin on cell viability and invasion of human colorectal adenocarcinoma cell line, HT-29.

Material and Method: Tumor and normal tissue specimens were obtained from colon (n=50) and rectal carcinoma (n=34). MMP-2 and MMP-9 activity levels were examined using gelatin zymography. MT-1 MMP activity level was analysed by activity assay. TIMP-2, VEGF and endostatin protein levels were examined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Also the protein expression level of endostatin was assessed by Western Blotting. The *in vitro* invasion assay was carried out using Transwell chamber with 8 μ m diameter polycarbonate membrane precoated with Matrigel.

Results: In colon tumors activity levels of pro and active MMP-2 and also active MMP-9 were significantly higher than in the corresponding normal tissue ($p < 0.05$). The protein levels of TIMP-2, MT-1 MMP, VEGF and endostatin did not reach a statistically significant difference between tumor and normal tissue. Significant relationships were found between colon tumor active MMP-9 and tumor invasion depth “pT1-2 vs pT3-4” ($p = 0.011$) and distant metastase. ($p = 0.047$). However, MMP-2 activity in colon tumor tissue did not correlate with any of the clinicopathological parameters investigated. In rectal tumors, the activity levels of both pro and active MMP-2 and MMP-9 were significantly higher than those in normal tissues, the differences being significant for all ($p < 0.05$). No significant differences between tumor and normal tissue were found for the protein level of TIMP-2, MT-1 MMP, VEGF and endostatin. Tumor active MMP-9 levels and the ratio between active and proMMP-2 (rMMP-2) showed statistically significant relationships with metastatic disease during the diagnosis ($p = 0.002$, $p = 0.006$, respectively) and also tumor active MMP-9 level showed a significant relationship with perineural invasion ($p = 0.042$). Also we found statistically significant relationship between tumor proMMP-9, proMMP-2 activity levels and lymph node metastasis ($p = 0.012$, $p = 0.021$, respectively). Tumor TIMP-2 levels showed a significant relationship with recurrence ($p = 0.011$). The significant relation was found between tumor VEGF level and perineural invasion ($p = 0.044$). Also there was a statistically significant correlation between tumor VEGF and tumor size ($p = 0.009$ $r = 0.454$). Cell culture experiments revealed that recombinant endostatin decreased the cell viability of HT-29 cells. It was found that both proMMP-2 secretion and activity were significantly lower in endostatin treated groups than the control group ($p < 0.05$). There was a significant positive correlation between cell viability and proMMP-2 ($p = 0.007$ $r = .423$). In the study group, MT-1 MMP level and cellular invasion were found lower compared with the control group, but these differences were not statistically significant. However, the ratio between TIMP-2 and MT-1 MMP in

experiment groups were significantly higher than in the corresponding control group ($p < 0.05$). There was a very strong negative and statistically significant correlation between invasion and TIMP-2/MT-1 MMP ratio ($p = 0.00$, $r = -0.962$). Also the very strong positive and statistically significant correlation was found between invasion and MT-1 MMP level ($p = 0.000$, $r = 0.991$).

Conclusion: The significant relationships between the increased activity of MMP-9 and tumor invasion depth “pT1-2 vs pT3-4” and distant metastases reflect that MMP-9 may play a role in predicting the aggressive behavior of colon cancer. In addition, a number of significant relationships demonstrated between MMP-2, MMP-9 activity level, TIMP-2, VEGF levels and tumor pathology including metastatic disease during the diagnosis, perineural invasion, lymph node metastasis, recurrence might contribute to further investigation of possible prognostic significance in rectal cancer. Also the results of the cell culture experiments on the effect of recombinant endostatin on cell viability and MMP secretion of the HT-29 are expected to contribute to further investigation for anticancer strategies in colon cancer.

Keywords: Colon cancer, rectal cancer, endostatin, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Anjiogenez, tümör ilerlemesi ve metastazı için en temel mekanizmalardan biridir ve ekstrasellüler matriksin (ESM) yeniden modellenmesini gerektiren bir süreçtir (1). Endostatin, kollajen XVIII'den proteolitik bir işlem sonucu oluşan ve güçlü anjiogenez inhibitörü olarak tanımlanmış bir moleküldür (2). Endostatinin bu güçlü *in vivo* ve *in vitro* antianjiogenez etki mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir. Endostatinin antianjiogenik özelliğinin yanısıra matriks metalloproteinaz inhibitörü olma özelliğinin tanımlanmasına yönelik çalışmalar da devam etmektedir (3). Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ise tümör anjiogenezi için en güçlü stimulatördür (4). Matriks metalloproteinazlar (MMP), anjiogenez ve tümör metastazında önemli yeri bulunan endopeptidazlar olarak bilinmektedir. Bu endopeptidazlar endotel hücrelerinin migrasyonu ve invazyonu için zorunlu basamak olan ESM'nin seçici olarak proteolitik degradasyonunu gerçekleştirmektedirler. Substrat özgüllüklerine göre 6 sınıfta toplanmaktadırlar: İnterstisyel kollajenazlar, jelatinazlar (MMP-2, MMP-9), stromelizinler, matrilizinler, membran tip MMP'ler (MT1-MMP) ve diğerleri. Çalışmamızda odaklandığımız MMP-2 ve MMP-9, bazal membranın başlıca komponenti olan Tip IV kollajeni yıkabilme yeteneğindedirler. MMP-2'nin endojen inhibitör proteini ise TIMP-2 dir. Membran tip metalloproteinazlar grubunda yer alan MT-1 MMP, düşük TIMP-2 varlığında hem MMP-2'yi aktive eder hem de tüm ESM komponentlerini yıkabilme yeteneğindedirler (5, 6). Ayrıca MMP-9'un, ekstrasellüler matrikse VEGF salınımındaki rolü ile tümör anjiogenezinin düzenlenmesindeki rolleri yapılan çalışmalarda vurgulanmaktadır (7). MMP'lerin anjiogenik etkilerinin yanında endostatin oluşumunda rol alarak (8) gösterdikleri anti-anjiogenik etkileri, anjiogenez regülasyonunda proteinler arası etkileşimin karmaşıklığına dikkat çekmektedir.

Literatür incelendiğinde kolorektal kanserde; MMP-2, MMP-9 ve bunların regülasyonlarında görevli inhibitör proteinlerin TIMP-2, TIMP-1 ve aktivatör protein MT-1 MMP'nin ekspresyonlarına ve prognostik anlamları üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda jelatinazların ve ilgili düzenleyici proteinlerin mRNA, protein ve aktivite seviyelerinde incelenmek üzere farklı teknikler ile değerlendirildiği ve bu nedenle elde edilen veriler arasında uyumsuz sonuçlar bulunduğu görülmektedir (9, 10). Bununla birlikte, bu proteinazların fonksiyonel durumları, ilgili enzimlerin aktiviteleri ile ilişkilidir. ProMMP-2 ve

ProMMP-9'un aktivasyonlarını incelemeyi mümkün kılan tekniklerin başında Jelatin Zimografi analizi yer almaktadır. Diğer yandan kolon ve rektum kanserlerinin gelişim mekanizmalarına ilişkin literatür incelediğinde bu mekanizmaların farklı olduğunu bildiren çalışmalar (11, 12) ve bunların total kolorektal olarak değil homojen ayrı iki tip tümör grubu olarak çalışılmasını savunan görüşler vardır (13). Biz de bu görüşü savunarak, gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada 50 kolon ve 34 rektum tümörü teşhisi alan hastaları total kolorektal olarak değil, kendi içinde homojen olan ayrı iki grup olarak değerlendirdik.

Bu araştırmanın temel hipotezi, anjiogenez inhibitörü olan endostatinin matriks metalloproteinazlar üzerine inhibisyon etkisi aracılığı ile tümör hücre invazyonu üzerindeki olası azaltıcı etkisinin araştırılmasıdır. Hipotezimizi aydınlatmak amacıyla jelatinaz aktivasyon düzeylerini, MMP-2' nin endojen inhibitör proteini TIMP-2, aktivatör proteini MT-1 MMP ve anjiogenez regülasyonunda rol oynayan anjiogenik potansiyeli yüksek olan VEGF ve anjiogenez inhibitörü endostatinin protein düzeylerini her iki tip tümör ve eşlenik normal dokularda ayrı ayrı araştırarak bu parametrelerin klinikopatolojik değişkenler ile ilişkisi tanımlandı. Ayrıca *in vitro* koşullarda HT-29 kolon adenokarsinoma hücre dizisinde rekombinant endostatinin tümör hücre canlılığı üzerine etkisi incelendi ve tümör hücresinin invazyon yeteneği üzerine olası inhibisyon etkisinin, MMP-2 ve MT1-MMP aktivitesinde meydana getireceği inhibisyon özellikleri ile ilişkilendirerek tanımlandı.

İKİNCİ BÖLÜM

2. GENEL BİLGİLER

2.1. EKSTRASELLÜLER MATRİKS

Ekstrasellüler matriks (ESM), hücrelerarası boşluklarda özel bir ortam oluşturan doku bütünlüğü ve homeostazından sorumlu dinamik, interaktif bir yapıdır. ESM, hücre gelişimi, migrasyonu, proliferasyonu ve metabolik fonksiyonlar gibi bir hücreyi ilgilendiren olayların düzenlenmesinde, hücreleri yönlendirecek intrasellüler sinyalleme yolları ile direkt ya da indirekt olarak etkileşerek hücrelere pozisyonel ve çevresel bilgi aktarımında önemli rollere sahiptir (14, 15).

Matriksi oluşturan başlıca iki temel ekstrasellüler protein vardır. Bunlar kollajen ve proteoglikanlardır. Kollajen, ECM yapısında en fazla bulunan proteinler arasındadır. Genetik olarak birbirinden farklı 20 kollajen tipi tanımlanmaktadır. Total vücut proteinlerinin % 30, total vücut ağırlığının % 6'sını oluşturur. Kollajenin yapısında, yüksek oranda glisin (% 33) ve prolin (% 10) ile amino asit türevleri olan hidroksiprolin (% 10) ve hidroksilizin bulunmaktadır (% 1). Bazı kollajen molekülleri (Tip I, II, III, V ve XI) bir araya gelerek kollajen fibrilleri oluştururlar. Kollajen fibril oluşumu ekstrasellüler bir işlemdir ve terminal prokollajen peptidlerinin prokollajene spesifik metalloproteinazlar aracılığı ile yıkılmasıyla oluşur. Uzun kollajen fibrilleri matrikse destek verir ve organize olmasını sağlar. Bazı kollajen tipleri ise (Tip IV), ağısı bir yapı oluştururlar. Tip IV kollajen bazal membran yapısında yer alan başlıca proteinler arasındadır. Kollajen başlıca fibroblastlar, miyofibroblastlar, osteoblast ve kondrositler tarafından sentezlenmektedir. Proteoglikanlar, kovalent bağlı glikozaminoglikanlar içeren peptid zincirleridir. Yapılarında % 95 karbonhidrat, % 5 oranında protein içerirler. Hyalüronik asit, kondroitin sülfat, keratan sülfat I, ve II, heparin, heparan sülfat ve dermatan sülfat olmak üzere yedi çeşit glikozaminoglikan vardır. Proteoglikanlar, doku kompartmanları arasında besin, metabolit ve hormonların difüzyonunu mümkün kılan bir faz oluşturularak matriksin organizasyonunda önem taşırlar. Elastin ise diğer önemli lifsel proteinler arasında yer almaktadır. Elastin dokuların uzayıp, tekrar orijinal şekline geri dönmesinden yani esnekliğinden sorumlu olan ekstrasellüler matriks proteinidir (16).

Glikoprotein yapısında olan fibronektin ve laminin de önemli role sahip ESM temel proteinleri arasında yer almaktadır. Fibronektin C-terminalinden iki disülfid köprüsüyle bağlı

iki aynı polipeptid zincirinden oluşmuş bir dimerdir. İki temel formda bulunur. Çözünür dimerler olarak çeşitli vücut sıvılarında, plazmada ve çözünmez fibriler formda mezenkimal dokularda, arter ve ven duvarlarında, böbrek, dalak, akciğer stromasında bulunur. Çözünmez fibriler fibronektin embriyonik gelişimde oldukça önemlidir. Çünkü embriyonik hücrelerin fibronektine adezyonu hücre migrasyonu için gerekli basamaklardandır. Fibronektinler, Arg-Gly-Asp (RGD) dizilimleri aracılığı ile integrinlerle de etkileşim içindedirler (17). ESM, tüm bu proteinlerin yanında glikozaminoglikan yapısında olan hyaluronan proteini de içermektedir. Hyaluronan, [D-glukronik asit (1-β-3) N-asetil-D-glukozamin (1-β-4)] tekrarlayan disakkarid ünitelerinden oluşmaktadır. Başlıca fibroblast ve diğer stromal hücrelerden salgılanan hyaluronan, sinyal ileti ve adhezyon gibi birçok hücre fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamaktadır. ESM, yapısını oluşturan tüm bu komponentlerle birlikte doku bütünlüğünü koruyan, destekleyen bir yapı oluşturarak, hücre homeostazının sağlanması, hücrelerarası sinyal iletimi, hücre büyüme ve çoğalmasının regülasyonu ve nörotransmisyon gibi dinamik olaylarda önemli rollere sahiptir (18).

2.1.1. BAZAL MEMBRAN

Yoğun ESM tabakası olarak tanımlanan bazal membran, epitel ve endotel hücreleri yanı sıra, kas, adipositler ve periferik sinir aksonlarını doku stromasından ayıran bir bariyer görevi görür. Bazal membran, hücreye yapısal bir destek sağlamakla birlikte hücre davranışının düzenlenmesinde de önemli roller üstlenir. Tüm hücre tiplerinin; başlıca tip IV kollajen, laminin, heparan sülfat ve proteolitik komponentlerinden oluşmuş bazal membrana sahip oldukları bilinmektedir. Minör komponentleri arasında Tip XV ve Tip XVIII kollajen, agrin ve fibulin yer almaktadır. Bazal membran içeriği dokudan dokuya değişir ve bu farklılığın da doku spesifitesinde önemli olduğu bilinmektedir (19).

2.2. EKSTRASELLÜLER MATRİKS PROTEOLİZİ

Doku morfogenez, anjiyogenez, kemiğin yeniden modellenmesi, yara iyileşmesi, trofoblast implantasyonu gibi fizyolojik olaylar, ESM'nin yeniden modellenmesi ile koordinasyon gerektirir. ESM'nin yeniden-modellenmesi; komponentlerinin yıkımı ve sentezi aşamalarından oluşmaktadır. ESM'nin proteolitik degradasyonundan sorumlu çok sayıda proteaz sistemleri tanımlanmış olmakla birlikte başlıca proteazlar; serin proteazlar

(Plasminojen aktivatör (PA) - Plasmin Sistemi) ve matriks metalloproteinazlar olmak üzere iki ana sınıfta incelenmektedir (20).

2.2.1. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

2.2.1.1. GENEL YAPISAL ÖZELLİKLERİ

Matriks metalloproteinazlar (MMP), çinko metalloproteaz ailesinin “matriksin” olarak tanımlanan alt grubunda sınıflandırılmaktadırlar. Bugüne kadar tanımlanmış 28 üyesi vardır (21). Sekrete edildiklerinde inaktif zimojen formda bulunan MMP’ler, çeşitli ortak özelliklere sahiptirler: Tüm MMP ler pre-, pro-, katalitik ve hemopeksin benzeri bölgeler içerirler. Pre-domain, sekretuar yolak için gerekli olup hücreler olarak MMP’lerin lokalizasyonunda rol almaktadır. Pro-domain enzim latentliğinden sorumludur ve enzimin aktivasyonu sırasında kaybolur. MMP’ler katalitik bölgelerinde Zn^{+2} iyonu içerirler. Hemopeksin benzeri bölge ise substrat özgüllüğünden ve endojen doku inhibitör proteinlerin (TIMP) bağlanmasından sorumludur (22).

2.2.1.2 MMP’LERİN BİYOLOJİK ROLLERİ

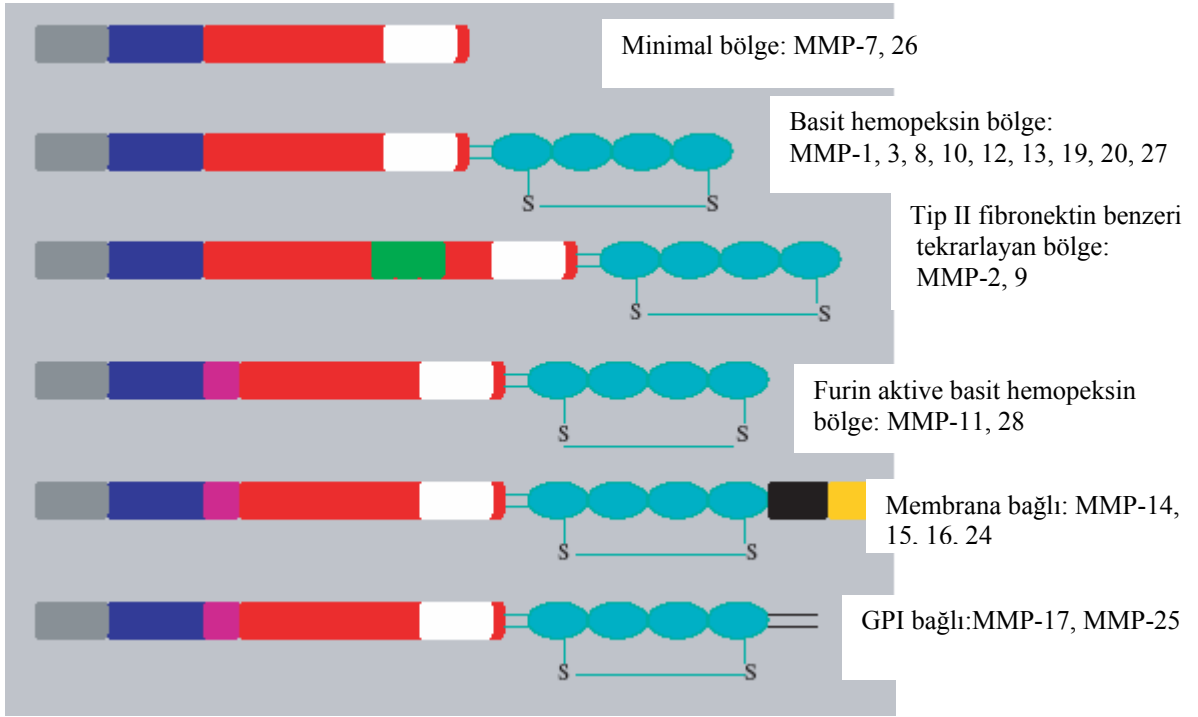
MMP’lerin başlıca fonksiyonları ECM moleküllerinin degradasyonudur. ECM moleküllerinin dışında non-ECM molekülleri de MMP’lerin hedefleri arasında yer almaktadır. Örneğin, EGF, $TGF\alpha$, $TNF\alpha$ gibi birçok büyüme faktörü inaktif formda salgılanırlar. MMP’ler bunların aktivasyonlarını sağlayarak biyoaktif forma dönüştürürler (10).

2.2.1.3 MMP’LERİN SINIFLANDIRILMASI

MMP’ler içerdikleri yapısal organizasyonlarına (Şekil 1) (16) ve substrat spesifitelerine (Tablo 1) (23) göre Kollajenazlar, Jelatinazlar, Stromelisinler, Matrilizinler, Membran tip MMP, diğer MMP’ler olmak üzere 6 ayrı alt grupta sınıflandırılmaktadırlar.

2.2.1.3.1 JELATİNAZLAR: MMP-2 ve MMP-9

Diğer MMP’lerden yapısal olarak katalitik bölge içinde 3 adet fibronektin tip II benzeri tekrar içeren ilave bir bölge bulundurulur. Bu kısım jelatinazların jelatin ve kollajene yüksek afinite ile bağlanmalarını sağlar, proteolitik aktivitelerini artırır.



Şekil 1: MMP'lerin yapılarına göre sınıflandırılması

Tablo 1: MMP'lerin substratlarına göre sınıflandırılması

ALT GRUP	MMP	İSİM	SUBSTRAT
1. Kollajenazlar	MMP-1 MMP-8 MMP-13	Kollajenaz-1 Kollajenaz-2 Kollajenaz-3	Kol I, II, VII, VIII, X, Jelatin Kol I, II, III, VII, VIII, X Kol I, II, III, IV, IX, X, IV
2. Jelatinazlar	MMP-2 MMP-9	Jelatinaz- A Jelatinaz -B	Jelatin, Kol I, II, III, IV, VII, X Jelatin, Kol IV, V
3. Stromelizinler	MMP-3 MMP-10 MMP-11	Stromelizin-1 Stromelizin-2 Stromelizin-3	Kol II, IV, IX, X, XI, Jelatin Kol IV, Laminin, Fibronektin Kol IV, Laminin, Elastin
4. Matrilizinler	MMP-7 MMP-26	Matrilizin-1 Matrilizin-2	Fibronektin, Laminin Fibrinojen, Fibronektin
5. MT-MMP	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-24 MMP-25	MT-1 MMP MT-2 MMP MT-3 MMP MT-4 MMP MT-5 MMP MT-6 MMP	Jelatin, Fibronektin, Laminin Jelatin, Fibronektin, Laminin Jelatin, Fibronektin, Laminin Fibrinojen, Fibrin Jelatin, Fibronektin, Fibrin Jelatin
6. Diğerleri	MMP-12 MMP-19 MMP-20 MMP-21 MMP-23 MMP-27 MMP-28	Makrofaj metalloelastaz Enamelizin XMMP CMMP Epilizin	Elastin, Fibronektin, Kol IV Agrekan, Elastin, Fibrillin Agrekan Agrekan Jelatin, Kazein, Fibronektin Bilinmiyor Bilinmiyor

2.2.1.3.1.1. JELATİNAZLARIN REGÜLASYONU

MMP'lerin yapısal gen ekspresyonu normal koşullarda düşük olarak bildirilmektedir. Bununla birlikte ECM'nin yeniden modellenmesini gerektiren fizyolojik veya patolojik koşullarda ekspresyonları indüklenmektedir. MMP'lerin regülasyonu transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyede düzenlenmektedir.

Transkripsiyonel Düzeyde MMP Regülasyonu

MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu düzenleyen sinyal ileti yolları, p38 kinaz, c-Jun N-terminal Kinaz (JNK), ve ERK yolağı (Extracellular signal-regulated kinase) olmak üzere

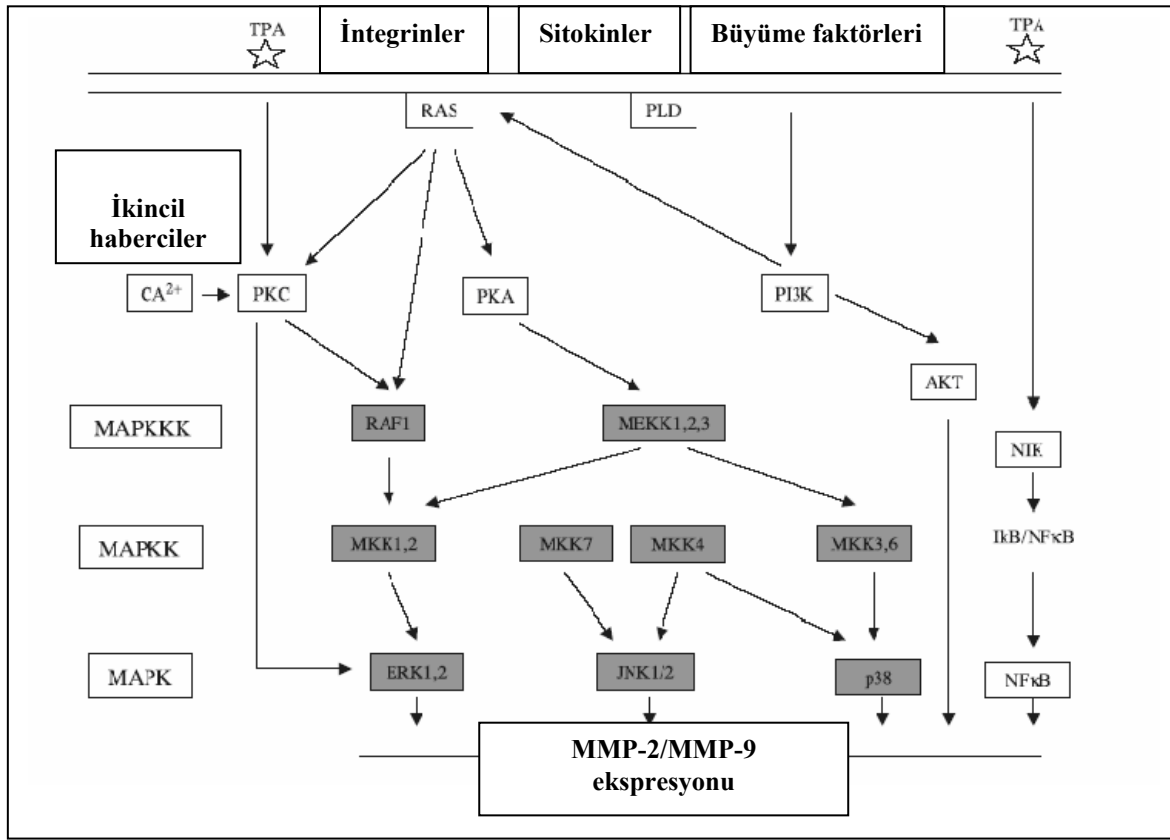
üç MAP-kinaz (Mitogen-activated protein kinase) yolağından oluşmaktadır. p38 ve JNK yolağı inflamatuvar sitokinler, ozmotik stres ve apoptotik sinyallere yanıt olarak aktive olurken; ERK yolağı sitokinler, büyüme faktörleri ve forbol esterlere yanıt olarak aktive olur. Sonuç olarak bir grup protein kinazlar, MAP-kinazı aktive ederler. Aktif MAP-kinazlar nükleusa transloke olurlar ve MMP gen ekspresyonu ile ilgili transkripsiyon faktörlerinin aktive olmasını sağlarlar. MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonu ile ilişkili sinyal ileti yolları Şekil 2’de şematize edilmektedir.

İnsan MMP gen promotör sekans analizleri ile “Aktivatör protein-1 (AP-1)” bağlanma bölgelerinin transkripsiyonel aktivasyonda önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. AP-1 bağlanma bölgelerini tanıyan ve etkileşime giren transkripsiyon faktörleri Jun ve Fos ailesi içinde yer almaktadır. Ayrıca AP-1 transkripsiyon faktörlerinin yanında ETS transkripsiyon faktörlerinin de MMP ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilişkili olabileceği gösterilmiştir (10).

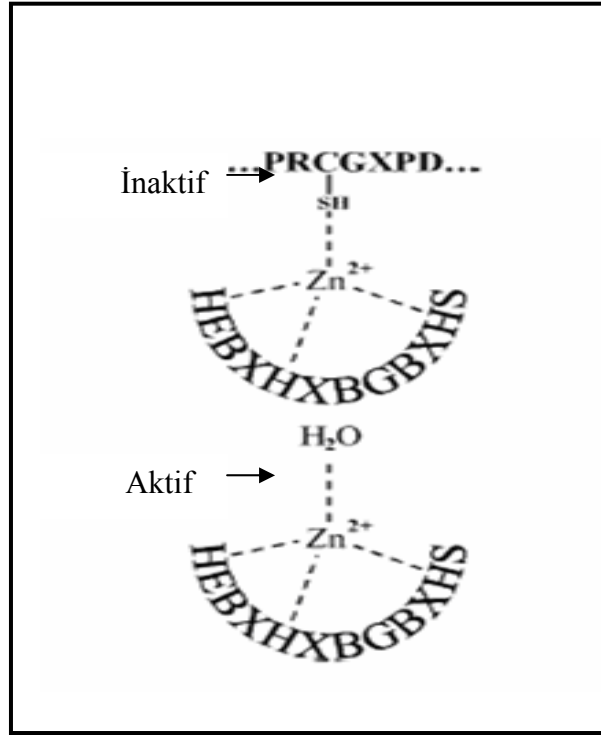
MMP-9 ve MMP-2 nin ekspresyonları birbirinden farklı şekilde düzenlenmektedir. Bu farklılık promotör bölgelerinin farklılığından kaynaklanmaktadır. MMP-9 promotör bölgesi AP-1, AP-2, nükleer faktör kappa B (NFkB) ve ETS gibi birçok transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgeleri içermektedir. MMP-9 ekspresyonu, promotör bölgesinin bu özelliği ile değişik uyarılara karşı indüklenebilir özellik göstermektedir. MMP-2 promotör bölgesi ise AP-1 ve ETS gibi transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgelerinden yoksun olduğu için, MMP-2 ekspresyonun yapısal olduğu bildirilmektedir (24).

Posttranskripsiyonel Düzeyde MMP Regülasyonu

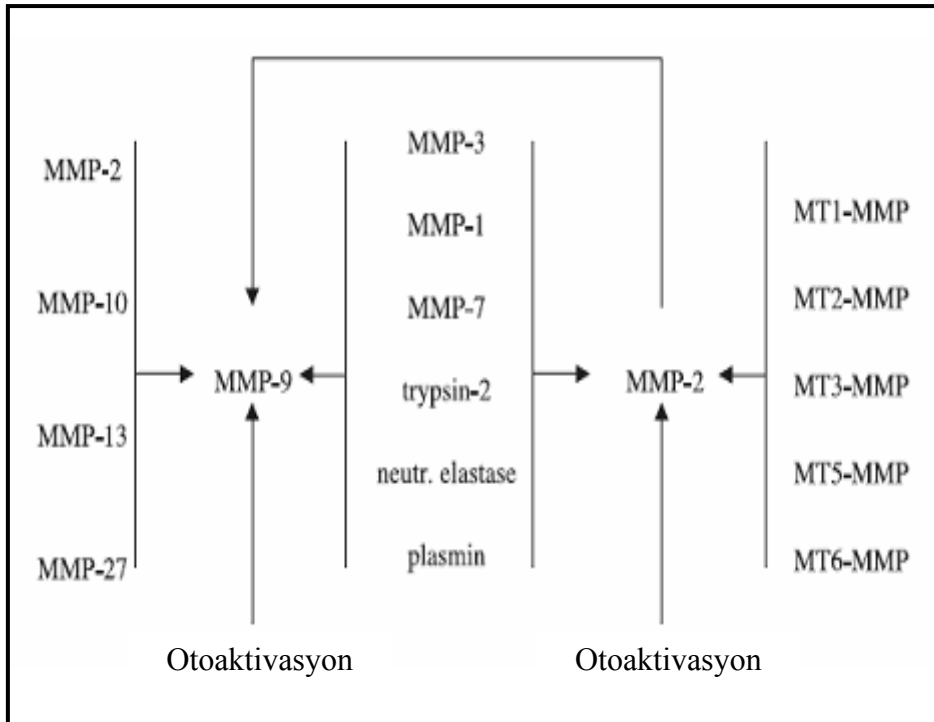
MMP’lerin posttranskripsiyonel (protein) düzeyindeki regülasyonları ise aktivasyonlarına bağlıdır. İnaktif zimojen formda sekrete edilen MMP’ler, pro bölgelerini “sistein switch” olarak tanımlanan aşamalı aktivasyon mekanizması ile kaybederler ve böylece aktif forma dönüşürler. Bu aktivasyon mekanizmasının aşamaları, pro bölgede bulunan sistein rezidüsü ile aktif bölgede yer alan Zn^{+2} arasında bulunan sistein bağının kopmasına dayanmaktadır (Şekil 3). Bazı MMP’ler için bu aktivasyon mekanizmasına plasmin, ürokinaz plasminojen aktivatör (uPA) ve diğer aktif formdaki MMP’ler aracılık edebilir (Şekil 4) (25, 26).



Şekil 2: Jelatinazların transkripsiyonel düzeyde regülasyonu



Şekil 3: Pro-enzim aktivasyon mekanizması



Şekil 4: MMP aktivasyon kaskadı

2.2.1.3.1.2. ENDOJEN MMP-2 AKTİVATÖR PROTEİNİ: MEMBRAN TİP-1 MMP (MT-1 MMP)

Membran tip MMP'ler (MT-MMP) integral membran proteinleridir. Şekil 1'de açıklandığı üzere MT-1, MT-2, MT-3, MT-4, MT-5, MT-6 MMP olmak üzere tanımlanmış 6 üyesi vardır. Tüm MMP'ler de olduğu gibi MT-1 MMP'nin de hücre yüzeyinde proteolitik olarak fonksiyon gösterebilmesi için propeptid bölgesinin yapısından kopması gerekmektedir. Propeptid bölgesinin C-terminal ucunda yer alan bazik aminoasit motifi (RXKR) serin proteaz grubu enzimlerden pro-protein konvertaz (örneğin; furin veya furin ilişkili) enzimleri aracılığıyla koparak aktif form meydana gelmektedir. Hücre içinde gerçekleşen bu aktivasyon işleminden sonra aktif MT-1 MMP hücre yüzeyine transfer olmaktadır. Bununla birlikte, pro-MT-1 MMP'de konvertaz-tanım bölgeleri içeren ikinci bazik motiflerin yer aldığı böylece alternatif aktivasyon yollarının da mevcut olabileceği yapılan sekans çalışmalarıyla gösterilmiştir. Ancak latent MT-1 MMP'nin aktivasyonun veya enzimatik aktivitesinin fizyolojik olarak nasıl regüle edildiği tam olarak bilinmemektedir. Aktifleşen MT-1 MMP, TIMP-2 bağımlı pro-MMP-2 aktivasyonunda rol almakla birlikte (Bölüm 2.1.3.1.3.1); fibronektin, vitronektin, laminin-1, laminin-5 fibrin, dermatan sülfat proteoglikanların, jelatin, kazein, elastin, kollajen Tip I, II ve III gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin degradasyonunda görev almaktadır. Ayrıca non-ESM proteinleri içinde yer alan başlıca hyaluronan reseptörü olan CD44, proalfa V integrin ve fibronektine bağlanan doku transglutaminaz gibi hücre adezyon moleküllerinin de yıkımında görev almaktadır (27, 28).

2.2.1.3.1.3. ENDOJEN MMP-2 DOKU İNHİBİTÖR PROTEİNİ: TIMP-2

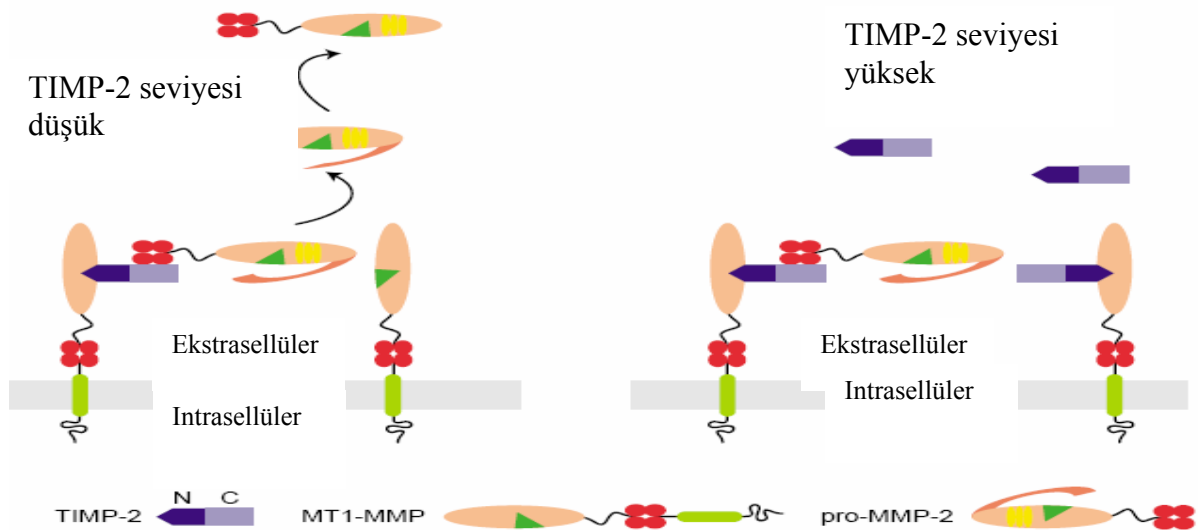
MMP'lerin katalitik aktivitesi MMP'lerin doku inhibitörleri (TIMP) tarafından inhibe edilir. TIMP'ler bu fonksiyonlarını metalloproteinazlar ile 1:1 oranında kompleks oluşturarak gösterirler. Bu inhibitör etkinin oluşmasında TIMP moleküllerinin N-terminal bölgesi önemli role sahiptir. MMP aktivitesinin ESM substratları üzerine etkisi enzimler ve inhibitörleri arasındaki dengeye (MMP aktivitesi/TIMP) bağlıdır. Bu denge birçok fizyolojik ve patolojik olayda merkezi rol oynamaktadır. Malignite, invazyon ve metastazda bu denge bozulmaktadır.

Tanımlanmış dört ailesi vardır (TIMP-1, 2, 3, 4). Her biri farklı MMP türlerine spesifiktir. TIMP-1, 184 amino asit içeren 28 kDa ağırlığında glikoproteindir. Tüm MMP'leri inhibe edebilir fakat MMP-9'a afinitesi daha fazladır. TIMP-2 ise MMP-2'ye spesifik

inhibitör proteindir. 194 aminoasit içeren 21 kDa'lık glikozillenmiş bir proteindir. TIMP-1 ile %40 sekans homolojisi göstermektedir. Hücre yüzeyine aktif olarak yerleşen MT-1 MMP'nin enzimatik aktivitesi de spesifik olarak TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 tarafından inhibe edilmektedir (21)

2.2.1.3.1.3.1. TIMP-2 BAĞIMLI MT-1 MMP ARACILI PROMMP-2 AKTİVASYON MEKANİZMASI

MMP-2'nin aktivasyon mekanizması, diğer MMP'lerden farklı olarak hücre yüzeyinde TIMP-2 bağımlı MT-1 MMP aracılı mekanizma ile gerçekleşmektedir. MMP-2'nin endojen inhibitör proteini olarak tanımlanan TIMP-2, aynı zamanda MT-1 MMP aracılı MMP-2 aktivasyonunda rol oynar. Düşük seviyede bulunan TIMP-2, N-terminal bölgesinden MT-1 MMP'nin aktif bölgesine bağlanır. Bu ikili kompleks proMMP-2'nin bağlanması için reseptör görevi görür: TIMP-2, C-terminalinden proMMP-2'nin C terminaline bağlanır. Serbest MT-1 MMP molekülü proMMP-2'nin propeptid bölgesini koparır, ara ürün oluşur. Daha ileri proteoliz işlemi ile MMP-2 tamamen aktif MMP-2 formuna dönüşür. İleri proteoliz ya otokatalitik (26) bir proteoliz ile ya da plasminojen (plasmin) sisteminin devreye girmesiyle oluşur (29). TIMP-2 yüksek seviyede bulunduğu zaman ise fazla TIMP-2'ler MT-1 MMP'lere bağlanarak proMMP-2 aktivasyonunu engeller (30). TIMP-2 bağımlı MT-1 MMP aracılı MMP-2 aktivasyon mekanizması Şekil 5'te gösterilmektedir.



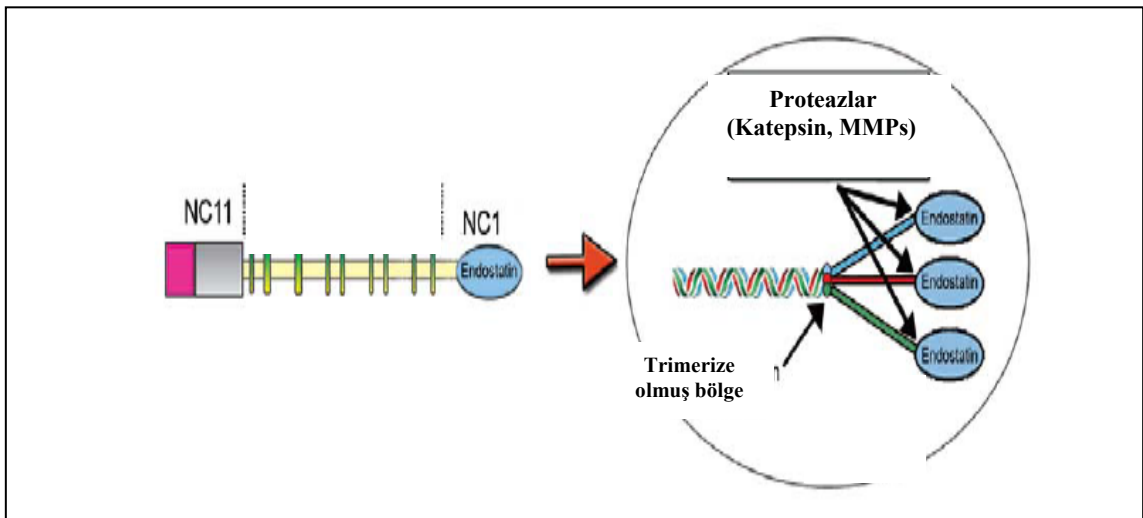
Şekil 5: TIMP-2 bağımlı MT-1 MMP aracılı MMP-2 aktivasyon mekanizması

2.3. ENDOSTATİN: ANJİOGENEZ İNHİBİTÖRÜ

Endostatin ilk kez 1996 yılında murine hemanjiendotelyoma (EOMA) hücre hattının ortamından izole edilmiştir. Sekans analizi ile Tip XVIII kollajenin NC-1 bölgesine ait 20 kDa ağırlığında bir fragman olduğu gösterilmiştir (2).

2.3.1.YAPISAL ÖZELLİKLERİ

Endostatin Tip XVIII kollajenin trimerize olmuş C-terminalinin parçalanması ile oluşmaktadır (Şekil 6). Bu parçalanmanın sistein proteinaz grubu enzimlerden Katepsin L, serin proteinaz elastaz ve MMP'ler aracılığı ile olabileceği gösterilmiştir. MMP'ler dışında da diğer proteazlar endostatinin hem oluşumunda hem de stabilitesini sağlamada görev alırlar (31, 8). Endostatin; heparan sülfat proteoglikan ve perlekan ile birlikte vasküler bazal membranda lokalize olmaktadır (32). Endostatin kompakt globüler bir yapıya sahiptir ve heparine bağlanmada fonksiyonel 11 arjinin rezidüsü ile karakterizedir. Endostatinin N-terminalinde bir Zn^{+2} atomu yer almaktadır; bu Zn^{+2} atomunun endostatinin biyolojik etkisi için fonksiyonel olmadığı, fakat intramoleküler disülfid köprülerinin stabilizasyonunda gerekli olduğu gösterilmiştir (33). Tip XVIII kollajen ile Tip XV kollajenin NC-1 bölgeleri % 60 sekans benzerliğine sahiptir. Tip XV kollajenin NC-1 bölgesinin de proteolitik fragmanının anti-anjiyogenik aktiviteye sahip olduğu fakat etkisinin endostatinden daha az olduğu gösterilmiştir. Tip XV kollajenin NC-1 bölgesine ait bu proteolitik fragmanlar Zn^{+2} ve heparin bağlanma bölgeleri içermeyip "restin" olarak adlandırılmaktadır (32).



Şekil 6: Kollajen XVIII'in yapısı ve endostatin oluşumu

2.3.2. ENDOSTATİNİN HÜCRE YÜZEY RESEPTÖRLERİ

Endostatin için tanımlanmış reseptörler mevcuttur. Endostatin, hücre adezyonunu $\alpha 5\beta 1$ integrinler aracılığı ile gösterdiği bildirilmektedir. Endostatin ve $\alpha 5\beta 1$ integrin arasındaki etkileşimin bloke edildiği bir çalışmada endostatin ile indüklenen hücre migrasyonunun kaybolduğu gösterilmiştir. Bunun sonucunda da $\alpha 5\beta 1$ integrinin endostatin için fonksiyonel bir reseptör olduğu kabul edilmiştir (34).

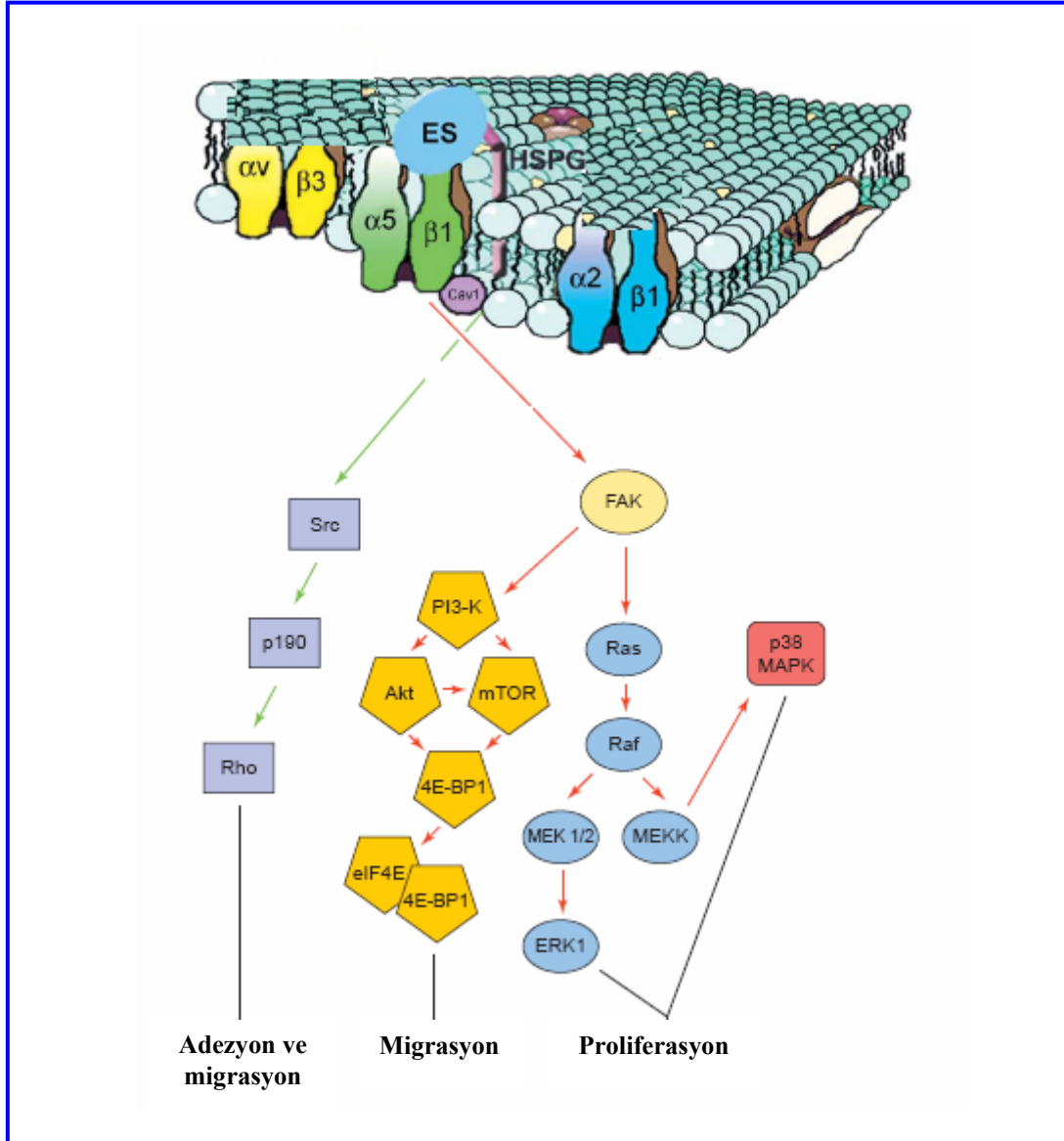
Endostatin aynı zamanda heparine bağlanan bir proteindir. Arjinin rezidüsünde meydana gelen nokta mutasyonunun heparine bağlanmayı engellediği ve dolayısıyla endostatin fonksiyon kaybının meydana geldiği gösterilmiştir. Endostatinin düşük afinite ile endotel hücrelerinde eksprese edilen hücre yüzey heparan sülfat proteoglikanlarından glikan 1 ve 4'e de bağlandığı bildirilmektedir. Endostatin glikozaminoglikanlar için de oldukça spesifik tanıma motiflerine sahiptir. Bu durumda endostatinin hangi hücre spesifik yüzey proteoglikan türlerine bağlanacağı afinitesi ile ilişkilidir. Endostatin, ayrıca VEGF-2 reseptörüne yarışmalı olarak bağlanarak reseptör aktivitesinde inhibisyon oluşturur (35).

2.3.3. ENDOSTATİNİN ETKİ MEKANİZMASI

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar ile rekombinant endostatinin tümör büyümesini ve anjiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Down sendromlu bireylerde endostatinin dolaşımdaki seviyesi yüksek olarak saptanmış ve bu yüksekliğin bu bireylerde KOL18A1 geninin 3 kez fazla kopyalanmasıyla meydana gelen anomali ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Bu kişilerde solid tümör insidansının düşük olması da bu KOL18 geninde görülen bu anomali ile ilişkilendirilmektedir (36).

Endostatinin antianjiojenik etkisinin temelinde yer alan biyolojik mekanizmalar arasında endotel hücre migrasyonunun inhibisyonu, hücre döngüsünün duraklaması ve apoptosiz indüksiyonu yer almaktadır. Endotel hücrelerinde endostatinin $\alpha 5\beta 1$ integrine bağlanması ile Src-kinaz sinyal ileti yolağının aktive olduğu gösterilmiştir. Ayrıca endostatinin integrinler aracılığı ile RhoA GTPaz aktivitesini baskıladığı ve Ras ve Raf ailesine ait sinyal ileti yollarını da inhibe ettiği bildirilmektedir (Şekil 7). Bu etkiler sonucunda endostatinin hücre iskeletinin organizasyonunda yer alan aktin monomerlerinin birbirinden ayrılmasına, hücre-matriks etkileşimlerinin bozulmasına ve endotel hücre

migrasyonunun yavaşlamasına neden olduğu, bunlara bağlı olarak da anjiogenezi baskıladığı gösterilmiştir (35, 37, 38).



Şekil 7: Endostatinin etki mekanizmaları

Tüm bu anti-migrasyon ve anti-anjiogenik etkilerine ek olarak endostatinin bir proteinaz inhibitörü gibi davranabildiği de gösterilmiştir. Endostatinin MMP-2'nin katalitik bölgesine bağlanarak MMP-2 aktivitesini inhibe ettiği bildirilmektedir. Endostatinin MMP-2'ye bağlanma afinitesinin MMP-2'nin doğal inhibitör proteini olan TIMP-2'den daha zayıf

olduğu da gösterilmiştir. MMP-9 ve MMP-13 aktivitelerinin de yine endostatin tarafından inhibe edildiği bildirilmektedir. Buna zıt olarak MMP-9 ve diğer MMP'lerin (MMP-3, MMP-7 ve MMP-13) "Endostatin" oluşumunda önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Yine MMP-2, MMP-3, ve MMP-13'ün anjiogenez inhibitörlerinden "Tumstatin" oluşumunda rol oynadığı saptanmıştır. Endostatinin MMP inhibitörü olarak davranması yanında, endostatin oluşumunda MMP'lerin rol almaları, MMP'lerin anjiogenik etkilerinin yanında anti-anjiogenik etkileri ile anjiogenez regülasyonundaki rollerine de dikkat çekmektedir (8, 38).

2.4. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ: ANJİOGENEZ STİMÜLATÖRÜ

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ilk olarak 1983 yılında karakterize edildiğinde vasküler permeabilite faktörü (VPF) olarak tanımlanmıştır. 1989 yılında ise başka bir grup araştırmacı tarafından endotel hücreleri için mitojenik özelliğe sahip heparine afinitisi yüksek olan yeni bir protein, VEGF olarak tanımlanmıştır. Daha sonra ise bu iki proteinin aslında tek bir genden eksprese edilen aynı protein olduğu kanıtlanmıştır (4).

2.4.1. VEGF AİLESİ

VEGF ailesi VEGF veya VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasenta büyüme faktörü olarak adlandırılan PlGF'den oluşmaktadır. İnsan VEGF geni sekiz ekzon ve yedi intron bölgesi içermektedir. Bu genin; VEGF-121, VEGF-145, VEGF-165, VEGF-189 ve VEGF-206 olmak üzere amino asit sayıları birbirinden farklı beş farklı ürünü vardır. VEGF proteinlerinin heparin ve heparin sülfata bağlanma afinitelerine göre farklı izoformları vardır. VEGF 121 ve VEGF 165, çoğu hücrede en fazla eksprese edilen proteinler arasındadır. VEGF-B yapısal olarak VEGF'e çok benzer. 167 aminoasitten oluşan ve uygun reseptörüne bağlanan form ve 186 aminoasitten oluşan çözünür form olmak üzere iki farklı tipi vardır. VEGF-B'nin her iki izoformu da VEGF-A ve diğer büyüme faktörleri ile bir araya gelerek heterodimer oluşturabilirler. VEGF-C, ilk kez prostat karsinoma hücrelerinden klonlanmıştır. Matür formu, VEGF homoloji bölgesi içerir ve VEGF-165 ile % 30 benzerlik gösterir. VEGF-C, pre-protein olarak sentezlenir ve ardışık proteolitik işlemlerle hem reseptörüne bağlanmak için hem de biyoaktivitesi için en uygun formu alır. VEGF-D,

VEGF-C ile % 60 sekans benzerliğine sahiptir. VEGF-E ise Paropox virüs den izole edilmiştir. PIGF, insan plasenta kaynaklı olup, VEGF ile % 50 homoloji gösterir (4).

2.4.2. VEGF RESEPTÖRLERİ

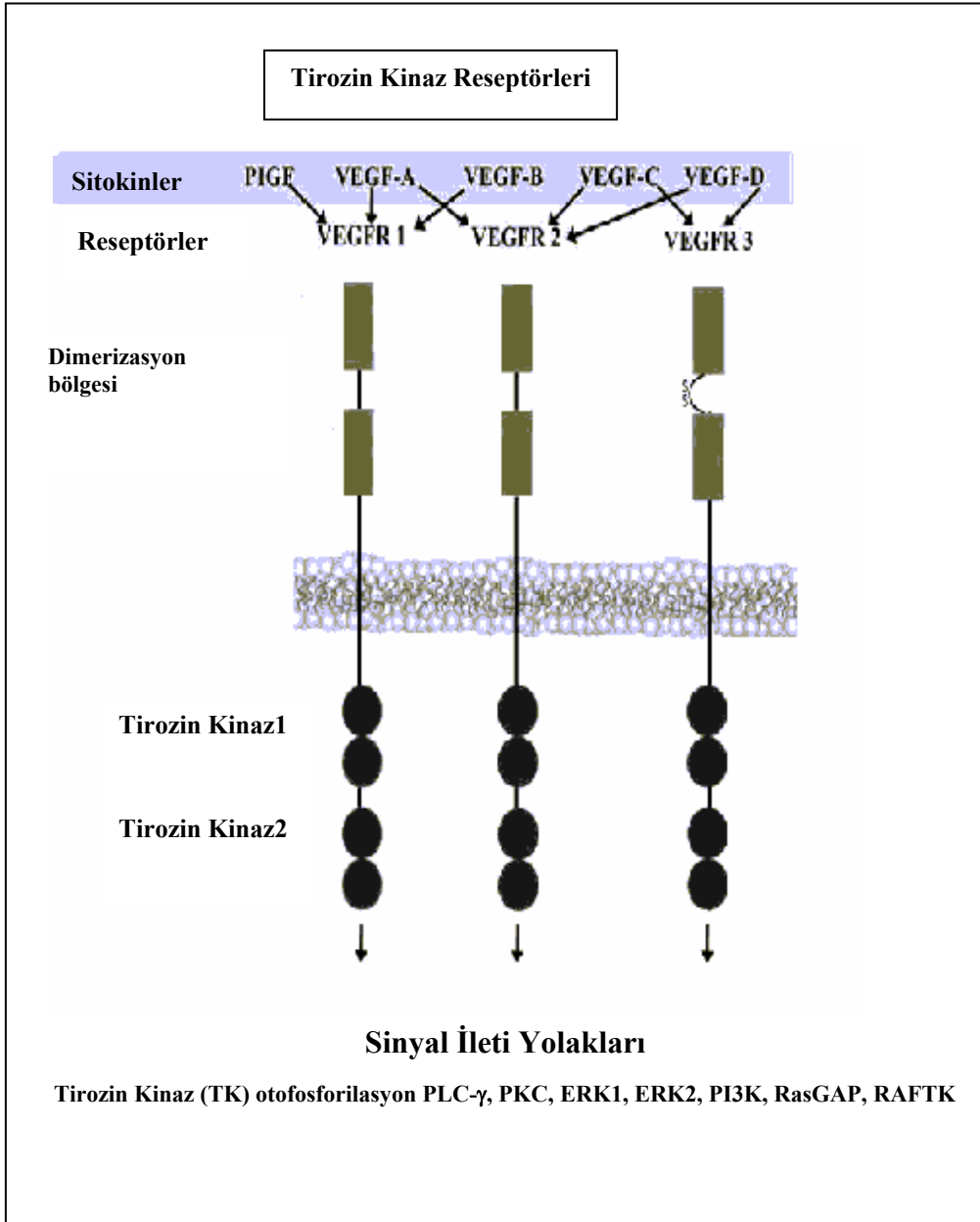
Tirozin kinaz ailesinden VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3, VEGF için afiniteleri yüksek reseptörlerdir. VEGFR-1, VEGF-A, VEGF-B ve PIGF için uygundur. VEGF-A, VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR-2 ye bağlanır. VEGFR-3 ise VEGF-C ve VEGF-D'yi bağlar. Reseptörlerin ekspresyon yerleri birbirinden farklıdır. Örneğin, VEGFR-3, başlıca lenfatik endotelde ekspresse edilirken, kan damarları endotelinde de ekspresse edilir. Bir diğer reseptör grubu ise Nöropilin-1 (NRP-1) ve Nöropilin-2 (NRP-2) olarak tanımlanan non-tirozin kinaz grubu reseptörlerdir. Bunlar VEGF-A, -B, -E ve PIGF'yi bağlama yeteneğindedirler. NRP-1, vasküler endotelde, nöronlarda ve bazı tümör hücrelerinde ekspresse edilir ve VEGFR-1 ve VEGFR-2 ile de birlikte ekspresse edilir. NRP-2 ise VEGF-C'ye bağlanır, endotel ve lenfatik damarlarda VEGFR-3 ile birlikte ekspresse edilirler.

VEGF (VEGF-A) çoğunlukla homodimerler halinde bulunur ve aktif formu 45 kDa ağırlığındadır. Reseptörüne bağlandıktan sonra, öncelikle reseptör dimerizasyonu olur. Her reseptör tirozin kinaz bölgelerinde otofosforilasyona uğrayarak aktif forma dönüşür. Bu aktivasyonu, sinyal ileti yollarında görevli fosfolipaz C- γ /protein kinaz C (PKC), ras proteinleri, fosfotidilinozitol-3-kinaz (PI3K), Mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) proteinlerinin aktivasyonu izler ve vasküler permeabilite, hücre canlılığı, proliferasyonu ve migrasyonun artışı ile sonuçlanır (Şekil 8) (39).

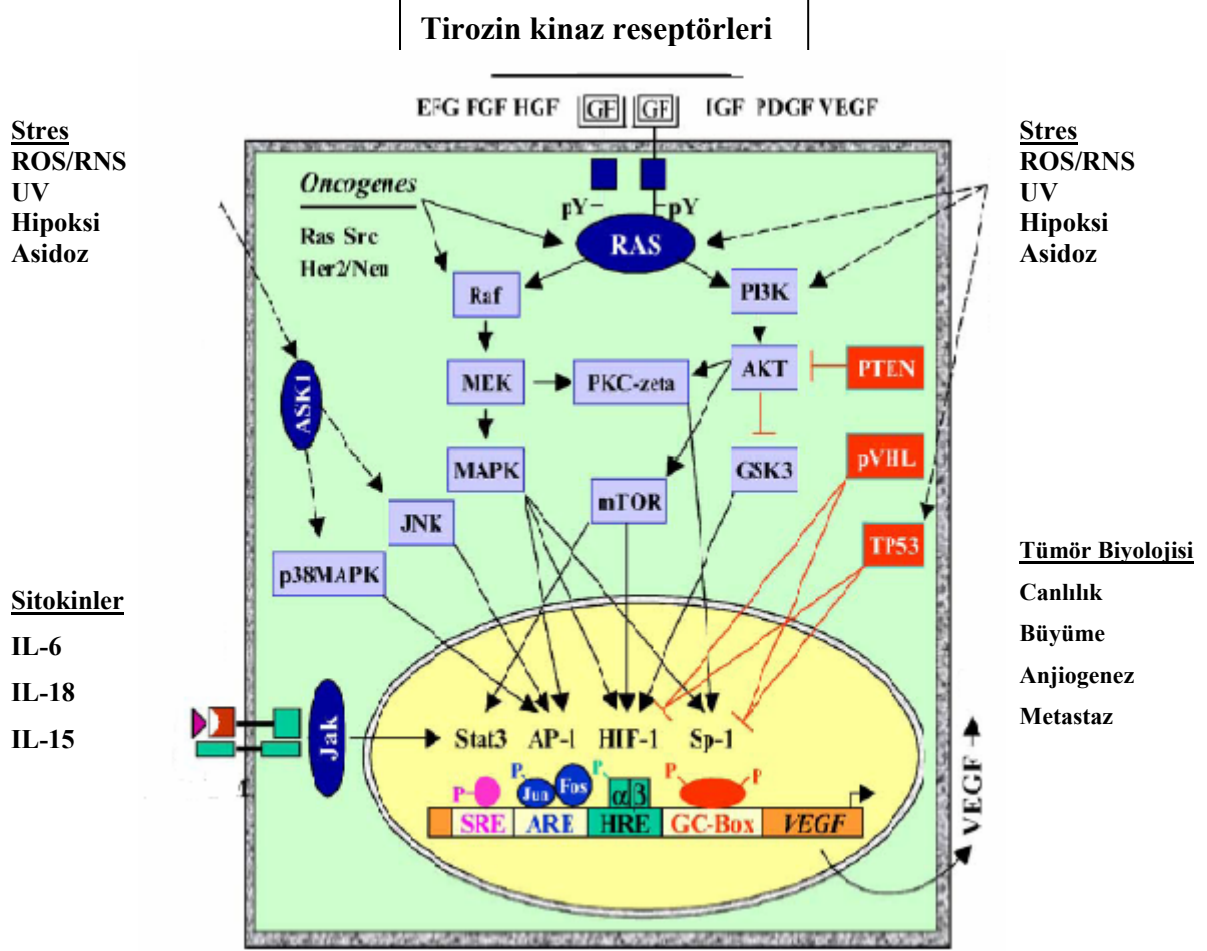
2.4.3. VEGF EKSPRESYONUNUN REGÜLASYONU

VEGF ekspresyonunun regülasyonu, transkripsiyon, translasyon ve posttranslasyon seviyesinde düzenlenir. Transkripsiyonel düzeyde VEGF regülasyonu çok iyi çalışılmış ve VEGF geni promotör bölgesinin özellikleri sekans analizleri ile aydınlatılmıştır. Promotör bölgeye bağlanan, spesifik protein-1 (Sp-1), hipoksi ile indüklenen faktör-1 (HIF-1), sinyal ileten ve aktivatör transkripsiyon faktör-3 (Stat-3), aktivatör protein-1 (AP-1), aktivatör protein-2 (AP-2) gibi birçok transkripsiyon faktörü bulunmaktadır. Bu çok sayıdaki transkripsiyon faktörleri, VEGF regülasyonunun kompleksliğine işaret etmektedir.

Tümör hücreleri, VEGF transkripsiyonunu etkileyen regülatör proteinlerle yapısal VEGF eksprese ederken diğer yandan VEGF ekspresyonu hipoksi, asidoz, oksidatif stres, regülasyon düzenleri bozulmuş çeşitli büyüme faktörü ve sitokinleri kapsayan tümör mikroçevre koşullarından etkilenerek indüklenebilir. VEGF ekspresyon regülasyonunun düzenlenmesinde görevli sinyal ileti yolları Şekil 9’da gösterilmektedir (4, 40).



Şekil 8: VEGF reseptörleri ve etki mekanizmaları

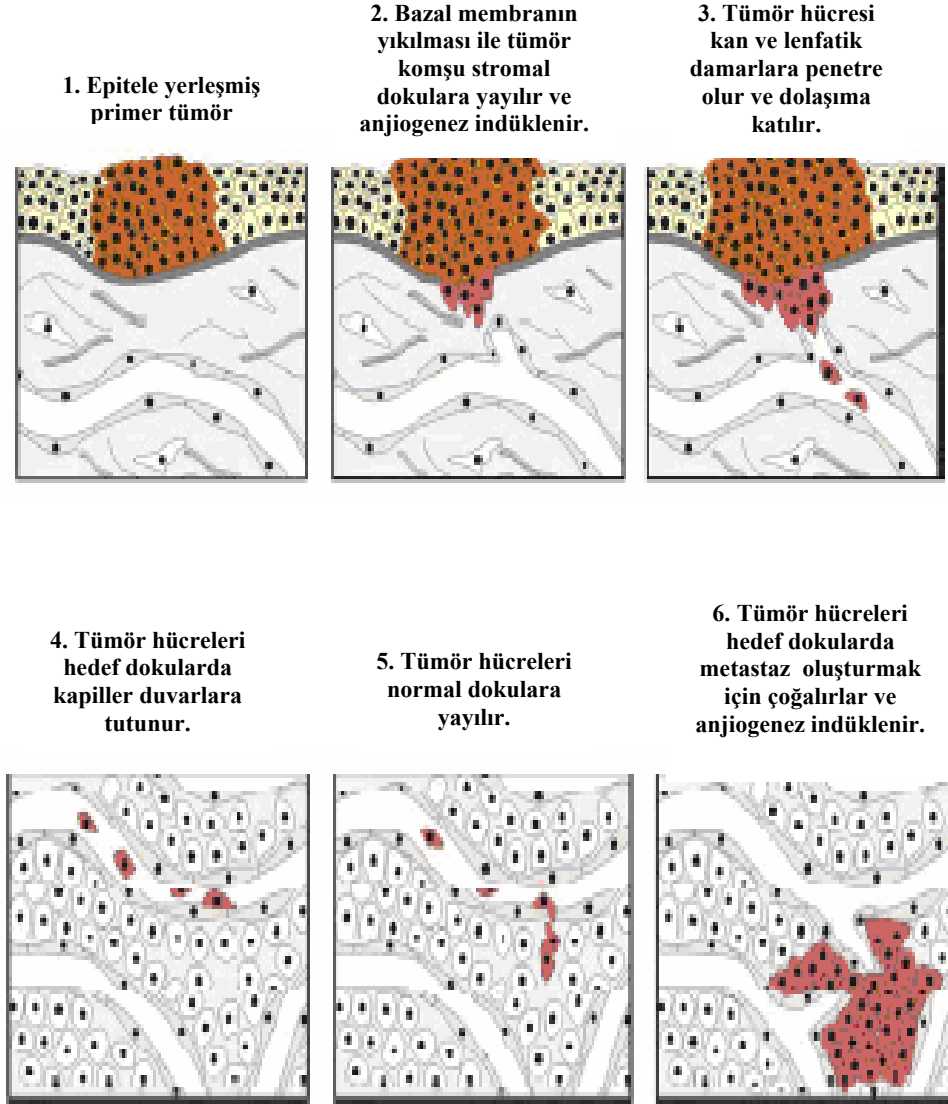


Şekil 9: VEGF ekspresyonunun regülasyonu

2.5. TÜRÖR HÜCRE İNVAZYONU VE METASTAZ OLUŞUMU

Malign tümör gelişimi kompleks ve çok aşamalı bir süreçtir. Tümör hücrelerinin invazyonu bazal membran bütünlüğünün bozulmasıyla başlayan 3 aşamada gelişir. İlk olarak neoplastik hücreler bazal membran üzerinde bir araya gelirler, bazal membran bütünlüğünü bozan proteolitik enzimler üretirler ve bazal membrandan geçerek komşu stromal bağ dokusuna doğru yayılırlar (Şekil 10). Bu aşamalar tümör gelişimi ve yayılması süresince defalarca tekrarlanır. Tümör hücreleri kan ve lenf dolaşımına girerek bulunduğu yerden diğer

organlara da yerleşirler. Tümör büyümesi için angiogenez zorunlu bir basamaktır. Angiogenez, ESM'nin yeniden modellenmesini gerektiren bir süreçtir (41).

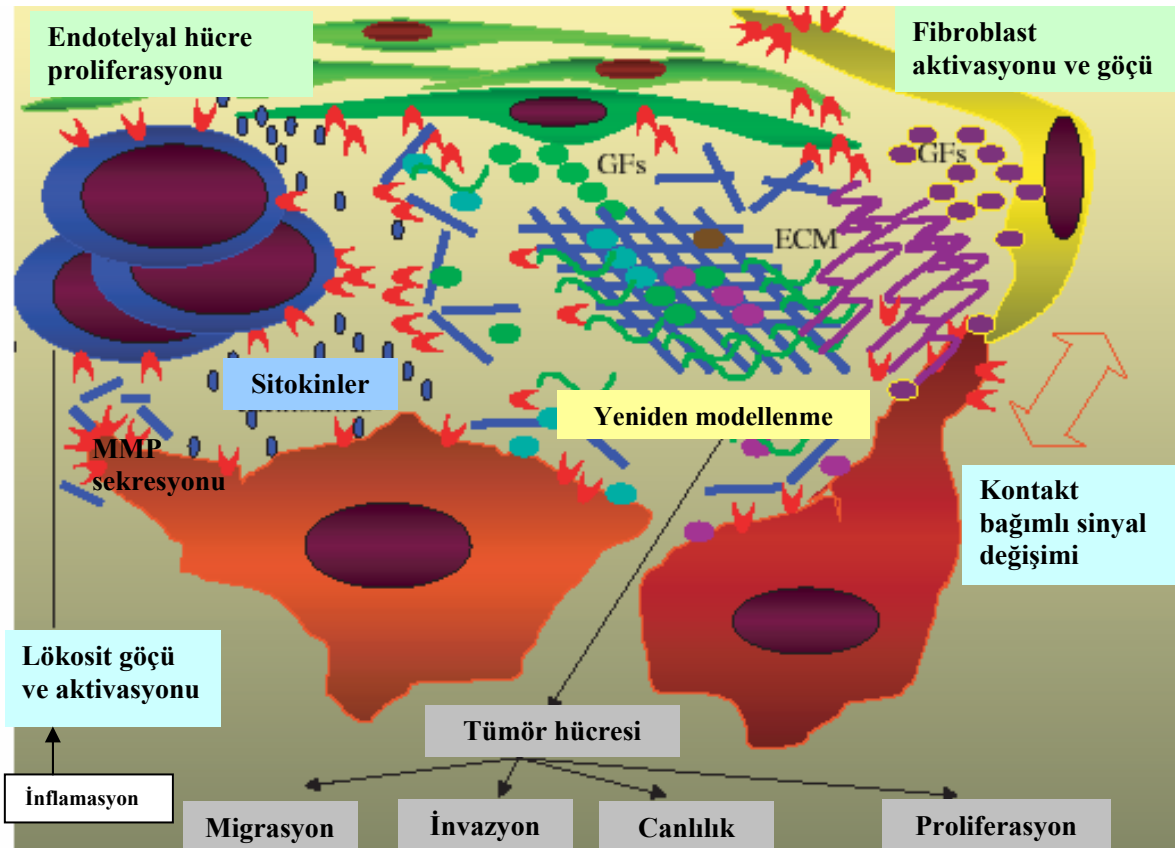


Şekil 10: Tümör hücre invazyonu ve metastazı

2.5.1. TÜMÖR-STROMA ETKİLEŞİMİ VE MMP'LERİN SEKRESYONU

Tümör hücrelerinin gelişimi ve ilerlemesi hem tümör hücresine hem de tümör hücresinin diğer komşu hücreler (fibroblast, inflamatuvar hücreler vb) ile olan etkileşimine

bağlıdır. Stromal hücreler ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimin tümör invazyonu ve metastazı için çok önemli olduğu bilinmektedir. Tümör hücreleri, salgıladıkları faktörler, hücre-hücre veya hücre-matriks iletişimi ile bulunduğu mikroçevre ile etkileşim içindedirler. Tümör hücrelerinden kemotaktik faktörlerin salınımı, mikroçevrede bulunan inflamatuvar hücrelerin tümör bölgesine gelmesini ve bu bölgede makrofaj ve monosit gibi inflamatuvar hücrelerden salınan büyüme faktörü ve sitokinlerin artışına yol açmaktadır. İnflamatuvar hücrelerden salgılanan sitokinler de stromal hücrelerden ESM'yi yıkan proteaz salınımını indüklerler (16, 42) (Şekil 11). Aşırı MMP ekspresyonu ile ilişkili kanser gelişiminin aynı zamanda kalıcı bir inflamasyon gelişimiyle de ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Böylece bir tümör hücresinin temel ilkesi, konakçının olanaklarını kullanarak kendi metabolizmasını daha ekonomik hale getirmek olur (43).



Şekil 11: Tümör-stroma etkileşimi

2.6. KOLOREKTAL KANSER

4/5'i kolonda 1/5'i rektumda meydana gelen kolorektal kanserler; başta endüstriyel batı toplumları olmak üzere, dünya genelinde akciğer, meme ve prostat kanserlerinden sonra en sık görülen kanserdir. Kanserden ölümler sıralamasında ise kolorektal kanser nedeniyle ölümler ikinci sırada yer almaktadır. Görülme yaşına bakıldığında, 50 yaş ve üzeri bireylerde, kolorektal kanser gelişim riski, gençlere göre anlamlı bir şekilde yüksektir. Diyetel risk faktörleri arasında ise kolonda anaerobik fekal floranın baskın üremesi için zemin hazırlayan sığır etinin ve hayvansal yağların aşırı tüketimi önemlidir. Anaerobik mikroorganizmalar, kolonda yağ asitlerinin ve safra asitlerinin etki düzeyini arttırmaktadırlar. Bu maddeler, hem kolon mukozasına zarar vermekte hem de diğer zararlı bileşiklerin kolon mukozası üzerindeki etkilerini güçlendirmektedirler. A, C ve E vitaminlerinden yoksun beslenme de bir diğer diyetel risk faktörüdür. Ailesel risk açısından değerlendirmelerde ise kolorektal karsinomlu hastaların, birinci dereceden akrabalarındaki kolorektal kanser gelişim riski, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, üç kat artmış olarak bulunmaktadır (44)

2.6.1 KOLOREKTAL KARSİNOMLARIN EVRELENDİRİLMESİ

Kolorektal kanserlerin evrelendirilmesinde; tümör büyüklüğü, yerleşimi, basit, kompleks ya da tübül yapısı, invazyon derinliği, lenf düğümü ve uzak organ metastazı, tümör yayılım şekli, peritona yayılım, lenfositik infiltrasyon, venöz ya da lenfatik invazyon, fibrosis miktarı ve cerrahi çıkarılabilirlik dikkate alınan kriterler arasındadır. Bu kriterlerden tümör yayılım şekli, venöz ve lenfatik invazyon ile lenfositik infiltrasyon klinik gidişi direkt olarak etkileyen faktörlerdir. Karaciğer, kolorektal karsinom hücrelerinin kan yoluyla metastazının ilk hedefidir. Akciğer, beyin ve kemik iliği ise diğer metastaz odakları arasındadır.

Kolorektal kanserlerin evrelendirilmesinde kullanılan Dukes Evrelendirmesi yaklaşık 70 yıl önce tanımlanmış olup, halen klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. 1986 yılında ise Hutter ve Sobin "Universal Staging System for Cancer of Colon and Rectum" adlı evrelendirme sistemini ileri sürdüler. Bu sisteme göre Dukes evreleri, klinik ve patolojide yaygın olarak kullanılan "Tumour, Node, Metastasis (TNM)" sistemine adapte edilerek güncellenmiştir (Tablo 2). Ancak klinik uygulamada TNM evrelendirme sistemi, diğer kanser tiplerinde olduğu gibi daha yaygın olarak kullanılmaktadır (45, 46) (Tablo 3).

Tablo 2: Kolorektal karsinomların DUKES evrelendirme sistemi

DUKES EVRESİ	TNM	HİSTO/PATOLOJİK ÖZELLİKLER
Dukes A (Evre I)	T1 T2	Submukozaya invazyon Musküler duvara invazyon
Dukes B (Evre II)	T3 T4	Muskularis propria yoluyla subseroza ve perikolik dokulara invazyon Visseral periton yoluyla diğer organlara invazyon
Dukes C (Evre III)	N1 N2	1-3 lenf düğümüne invazyon 4 ve daha fazla lenf düğümüne invazyon
Dukes D (Evre IV)	M1	Karaciğer, akciğer, periton ve overlere metastaz

Tablo 3: Kolorektal karsinomların TNM evrelendirme sistemi

Evre TX TO Tis T1 T2 T3 T4	T: Primer Tümör Primer tümör değerlendirilemez. Primer tümör yok. Karsinoma in situ: İntraepitelyal veya lamina propria'ya invazyon Submukoza'ya invazyon Muskularis propria'ya invazyon M. propria yoluyla subseroza veya non-peritoneal perikolik veya perirektal dokulara invazyon Diğer organlara veya peritona direkt invazyon ve/veya visseral periton proliferasyonu
Evre NX NO N1 N2	N: Bölgesel Lenf Düğümleri Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez. Lenf düğümü metastazı yok. 1-3 bölgesel lenf düğümüne metastaz 4 veya daha fazla lenf düğümüne metastaz
Evre MX MO M1	M: Uzak Metastaz Uzak metastaz değerlendirilemez. Uzak metastaz yok. Uzak metastaz var.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. DOKU ÇALIŞMALARI

3.1.1. MATERYAL

3.1.1.1. Kolon ve Rektum Doku Örneklerinin Eldesi

Araştırma materyali Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda cerrahi girişim uygulanan hastaların patolojik tanısı konmuş, kolon ve rektum tümör ve aynı zamanda eşlenik normal dokularından oluşmaktadır. Çalışmamızda, 50 kolon tümör ve 50 eşlenik normal doku ile 34 rektum tümör ve 34 eşlenik normal doku kullanılmıştır. Örnekler RPMI-1640 transport ortamı içerisinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırılmıştır.

3.1.1.2. Hasta Bilgileri

Çalışmamıza, TNM evrelendirme sistemine göre evrelendirilmiş Evre 1 ile 4 arasında yer alan 50 kolon kanseri ve 34 rektum kanseri tanısı almış hasta dahil edildi. Kolon kanserli hastaların ortalama yaşları 63 ± 13 (Minimum: 37 Maksimum: 85) ve tümör çap büyüklüğü ise ortalama 5.1 ± 1.9 cm (Min: 1.7 Maksimum: 10.0) idi. Rektum kanserli hastaların ortalama yaşları 63 ± 12 (Minimum: 39 Maksimum: 85) ve tümör çap büyüklüğü ise ortalama 4.25 ± 2.4 cm (Min: 1.0 Maksimum: 10.0) idi. Kolon ve rektum tümörlü hastaların klinikopatolojik özellikleri ayrıntılı olarak Tablo 4 ve Tablo 5'te gösterilmektedir.

3.1.2. YÖNTEMLER

3.1.2.1. MMP-2, TIMP-2 ve MT-1 MMP İle İlişkili Analizler

3.1.2.1.1. Dokuların Hazırlanması

Kolorektal kanser tanısı alan hastalardan alınan tümör ve normal doku örneklerinden 100 mg tartıldı. Doku örneklerine ağırlıklarının 10 katı hacminde (1 ml) ekstraksiyon ortamı (0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂ ve % 0.05 Brij 35 içeren 50 mM Tris-HCl pH 7.0) ilave edildi (47). Sonikatör (Sonics&Materials Inc, Danbury Connecticut USA) ile buz üzerinde homojenize edildi. 10 000xg de 10 dak. santrifüj edildikten sonra supernatantlar alındı ve

analiz süresine kadar –80 °C de saklandı. Doku çalışmaları ile ilgili deneyler Şekil 12’de özetlenmektedir.

Tablo 4: Kolon tümörlü hastaların klinikopatolojik özellikleri

Özellikler		Hasta	
		Sayı	%
Cinsiyet	Kadın	23	46.0
	Erkek	27	54.0
Histolojik Tip	Adenokarsinom	37	74.0
	Diğerleri	13	26.0
Diferansiasyon	Düşük	43	86.0
	Yüksek	7	14.0
Tümör yerleşimi	Alt	10	20.0
	Çıkan Kolon	4	8.0
	Transvers Kolon	3	6.0
	İnen Kolon	9	18.0
	Sigmoid	16	32.0
	Diğerleri	8	16.0
pT	pT1	2	4.0
	pT2	5	10.0
	pT3	18	36.0
	pT4	25	50.0
Evre	1	5	10.0
	2	20	40.0
	3	21	42.0
	4	4	8.0
N	pN0	26	52.0
	pN1	13	26.0
	pN2	11	22.0
Lenfatik İnvazyon	Var	28	44.0
	Yok	22	56.0
Vasküler İnvazyon	Var	17	34.0
	Yok	33	66.0
Perinöral İnvazyon	Var	15	70.0
	Yok	35	30.0
Uzak Metastaz	Yok	40	80.0
	Var	10	20.0

Tablo 5: Rektum tümörlü hastaların klinikopatolojik özellikleri

Özellikler		Hasta	
		Sayı	%
Cinsiyet	Kadın	20	58.8
	Erkek	14	41.2
Histolojik Tip	Adenokarsinom	32	94.1
	Diğerleri	2	5.9
Diferansiasyon	Düşük	30	88.2
	Yüksek	4	11.8
Tümör yerleşimi	Alt	12	35.3
	Üst	6	17.6
	Orta	16	47.1
pT	pT1	3	8.8
	pT2	5	14.7
	pT3	9	26.5
	pT4	17	50.0
Evre	1	6	17.6
	2	10	29.4
	3	16	47.1
	4	2	5.9
N	pN0	17	50.0
	pN1	7	20.6
	pN2	10	29.4
Lenfatik İnvazyon	Var	16	52.9
	Yok	18	47.1
Vasküler İnvazyon	Var	16	52.9
	Yok	18	47.1
Perinöral İnvazyon	Var	13	61.8
	Yok	21	38.2
Lenf Nodu Metastaz	Var	17	50.0
	Yok	17	50.0
Tanı anı Metastaz	Var	2	94.1
	Yok	32	5.9
Nüks	Var	10	70.6
	Yok	24	29.4

3.1.2.1.2. Protein Analizi

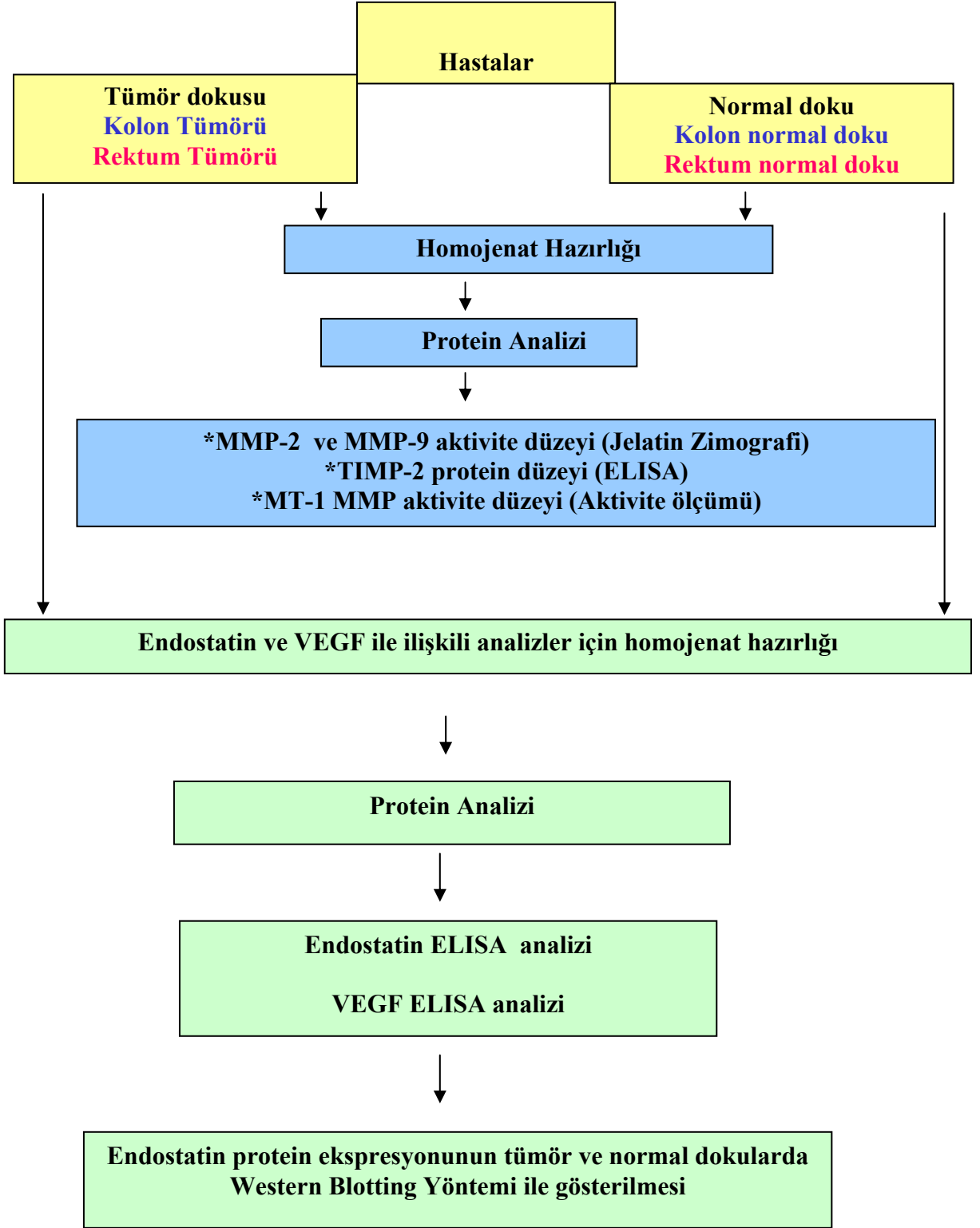
Protein düzeyleri BCA (Bicinchoninic Acid) yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla Sigma marka (Kat No: BCA-1, B9643) protein analiz kiti kullanıldı. Yöntemin temeli, alkali ortamda Cu^{+2} -protein kompleksi oluşumuna ve Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesine dayanmaktadır. Örneklerde var olan protein miktarı indirgenmiş Cu^{+1} miktarı ile doğru orantılıdır. Oluşan renk oluşumu 562 nm de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (48).

Analiz aşamaları

- ✓ Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA) kullanıldı. (250, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/ml}$) olmak üzere farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.
- ✓ Standart ve örneklerden 25'er μl kuyucuklara eklendi.
- ✓ Tüm kuyucuklara 200 μl BCA ve % 4'lük Bakır-2-Sülfat Pentahidrat solüsyonlarının sırasıyla 1:50 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan analiz solüsyonundan ilave edildi.
- ✓ 37 °C de 30 dak. inkübasyona bırakıldı ve 562 nm'de multiplak okuyucuda (BioTek, Synergy marka) okundu.
- ✓ Standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak protein miktarları hesaplandı.

3.1.2.1.3. Jelatin Zimografi

Jelatin Zimografi yöntemi jelatinazlar olarak adlandırılan MMP-2 ve MMP-9'un hem zimojen (pro), hem de aktif formlarının aynı jel üzerinde saptanmasına izin veren elektroforetik bir yöntemdir. Yöntem, substrat (jelatin) içeren sodyum dodesil sülfat (SDS) jelin (SDS-PAGE) inkübasyonu sırasında açığa çıkan proteazlar tarafından yıkıma uğratılmasına dayanır. Proteolizisin gerçekleştiği bölgeler, jelin coomassie mavisi ile boyanması sonucunda koyu mavi zemin üzerinde beyaz bantlar olarak ortaya çıkar (49).



Şekil 12: Doku çalışmaları ile ilgili deney akış çizelgesi

Jelatin Zimografi Yönteminin Uygulama Aşamaları

Doku örneklerinden elde edilen homojenatlarda mevcut jelatinazların aktivitelerini ölçmek için %1 Tip I jelatin ve %10 SDS içeren % 7.5'lük poliakrilamid jeller kullanıldı:

- ✓ Laemmli'nin tanımladığı gibi SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroferez) jel hazırlandı (50). Önce ayırıcı jel % 7.5 oranında hazırlandı (Tablo 6) ve önceden kurulmuş olan elektroferez düzeneğinde yer alan iki cam arasına döküldü ve 1 saat jelin polimerize olması için beklendi. Jel-hava temasını engellemek için yüzey üzerine n-propanol eklendi.
- ✓ Jelleşme gerçekleşikten sonra % 4 oranındaki paketleyici jel hazırlandı (Tablo 6) ve ayırıcı jel üzerine döküldü. Örneklerin uygulanacağı kuyucukların oluşturulması amacıyla jel üzerine 12 dişli tarak yerleştirilerek jelleşme beklendi. Jelleşme oluşuktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı.

Tablo 6: Jelatin Zimografi yönteminde poliakrilamid jellerin hazırlanması

REAKTİF	% 7.5 AYIRICI JEL	% 4.0 PAKETLEYİCİ JEL
Bidistile su	7.7 ml	6.10 ml
10 mg/ml Jelatin substratı	2.0 ml	---
% 30 Akrilamid	5.0 ml	1.3 ml
1.5 M Tris-HCl, pH:8.8	5.0 ml	---
0.5 M Tris-HCl, pH; 6.8	----	2.5 ml
% 10'lük SDS	200 µl	100 µl
% 10'lük APS	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl

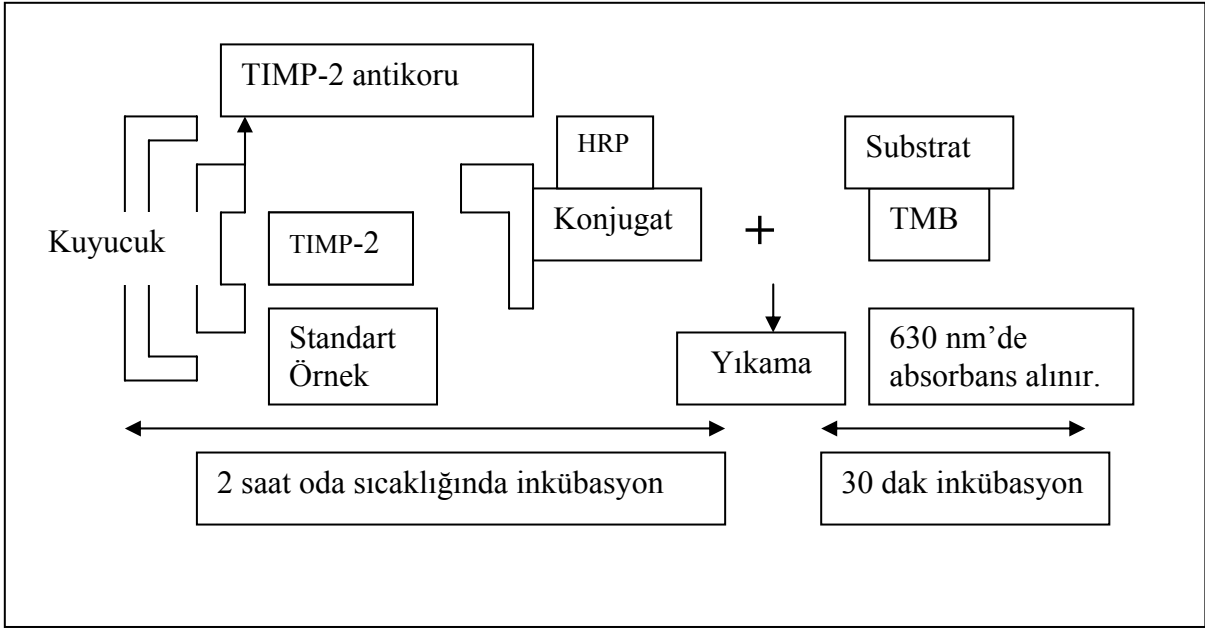
- ✓ Hazırlanan jeller, elektroforez tankına yerleştirildi.
- ✓ Eşit hacimde doku homojenatları, indirgeyici-olmayan örnek tamponu (Tablo 7) ile karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara 25 µg protein olacak şekilde uygun hacimde yüklendi.
- ✓ Sisteme “Elektroforez Yürütme Tamponu” (Tablo 7) eklendi.
- ✓ Elektroforez +4⁰C soğuk oda koşullarında gerçekleştirildi. Karşılıklı iki jel için 125 sabit voltaj, 40-60 mA/jel 4.5 saat uygulanarak elektroforez yapıldı.
- ✓ Elektroforezden sonra jellerden SDS’i uzaklaştırmak için jeller iki kez 15’şer dakika % 2.5’lik Triton X-100 “Renatürasyon Tamponu” ile yıkandı.
- ✓ Daha sonra jeller, enzimlerin (MMP-2 ve MMP-9) jel içindeki substratlarını (jelatin) tüketmelerini sağlamak için 18 saat 37 ⁰C’de “Aktivasyon Tamponu” ile inkübe edildi.
- ✓ Jeller, % 0.5’lik Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandı ve % 40 metanol-% 10 asetik asit içeren tampon ile jel zeminindeki fazla boya uzaklaştırıldı.
- ✓ Jellerin, jel dökümantasyon sistemi ile (UVP Marka Jel Dökümantasyon Sistemi) densitometrik analizi yapıldı. Her bir bantın (pro ve aktif) alan/mm² ve optik densitesi (OD) saptandı. Substrat jelin lizis miktarı “AlanxOD/µg protein” formülünden yararlanılarak hesaplandı.
- ✓ Pozitif kontrol olarak MMP-2 ve MMP-9 un hem pro hem de aktif formlarını içeren ticari olarak üretilmiş insan kaynaklı MMP marker (Chemicon Marka Kat No: CC073) kullanıldı.
- ✓ Kullanılan çözeltilerin içerikleri Tablo 7’de açıklanmaktadır.

3.1.2.1.4. TIMP-2 Analizi

Hazırlanan doku homojenatlarında TIMP-2 analizi, ELISA temelli Amersham marka (Kat No: RPN 2618) kit ile yapıldı. Bu ölçüm yöntemi, TIMP-2 düzeylerinin kantitatif olarak ölçümü için hazırlanmış “sandwich tip enzim immünoassay” tekniğine dayanır (Şekil 13). Kitin ölçüm aralığı 8-128 ng/ml arasındadır. Sensitivitesi ise 3 ng/ml dir.

Tablo 7: Jelatin Zimografi yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

ÇÖZELTİLER	İÇERİK
Aktivasyon Tamponu	50 mM Tris-HCl, pH:7.6 10 mM CaCl ₂ .2H ₂ O, 50 mM NaCl, % 0.05 Brij 35
5x Yürütme Tamponu	125 mM Tris-HCl, pH:8.3 1.23 M Glisin % 0.5 SDS
Renatürasyon Tamponu Triton X-100	% 2.5'lik Triton X-100
2x İndirgeyici Olmayan Tampon	1.0 ml 0.5 M Tris-HCL, pH:6.8 0.8 ml Gliserol 3.2 ml %10'luk SDS 0.2 ml % 0.2'lik Bromfenol 2.8 ml d H ₂ O
% 30'luk Akrilamid Çözeltisi	29.2 g Akrilamid 0.8 g N'N'-bisakrilamid
Boya Çözeltisi	% 0.5'lik Coomassie Brilliant Blue R-250 % 40 metanol % 10 asetik asid
Jel Zeminindeki Boyayı Uzaklaştıran Çözelti	% 40 metanol % 10 asetik asid



Şekil 13: TIMP-2 için ELISA ile ölçüm yöntem şeması

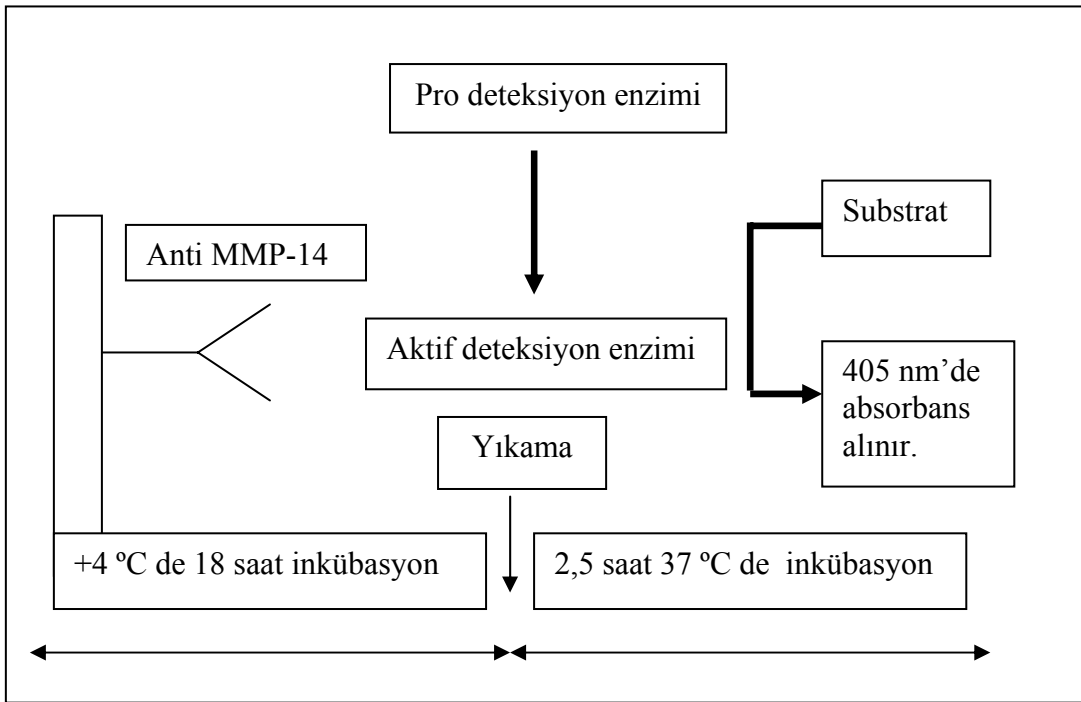
Analiz Aşamaları

- ✓ 96 kuyucuklu plak, analiz tamponu ve enzim substratı oda sıcaklığına getirildi.
- ✓ Liyofilize standart (256 ng/ml) 1.0 ml distile ile çözüldü. 8, 16, 32, 64 ve 128 ng/ml olacak şekilde analiz tamponu ile seri dilüsyon yapıldı.
- ✓ Peroksidaz konjugatı 12 ml distile su içinde çözülerek hazırlandı.
- ✓ Tüm kuyucuklara 50 µl analiz tamponu, 50 µl standart ve örnek eklendi. Kör için ayrılan kuyucuğa sadece 100 µL analiz tamponu eklendi.
- ✓ Tüm kuyucuklara 50 µl peroksidaz konjugatı eklendi ve 20-27 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkama yapıldı. Kuyucuklarda yıkama solüsyonu kalmayacak şekilde kuyucuklardan yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı.
- ✓ Tüm kuyucuklara 100 µL TMB substratı (3,3',5,5'Tetrametilbenzidin(TMB)/Hidrojen Peroksit) eklendi ve 30 dak. beklendi.
- ✓ Oluşan renkli çözeltinin absorbansı 650 nm'de okundu.

- ✓ Örneklerdeki TIMP-2 düzeyi, oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı. Sonuçlar mg protein başına ng TIMP-2 olarak ifade edildi.

3.1.2.1.5. MT-1 MMP Analizi

Hazırlanan doku homojenatlarında MT-1 MMP analizi için Amersham marka (RPN 2637) MT-1 MMP aktivite kiti kullanıldı. Testin ilkesi, anti MT-1 MMP ile kaplanmış kuyucuklara bağlanan örnek içerisinde bulunan aktif MT-1 MMP ile aktive olan pro formdaki deteksiyon enziminin, aktif deteksiyon enzimine dönüşmesine dayanmaktadır. Ortama aktif deteksiyon enziminin ilgili substratı ilave edilir ve substratın yıkılımı ile oluşan renk 405 nm de spektrofotometrik olarak ölçümlenir (Şekil 14) Testin ölçüm aralığı 0.125-32 ng/ml, sensitivitesi ise 0.7 ng/ml olarak tanımlanmıştır.



Şekil 14: MT-1 MMP ölçümü için kullanılan yöntem şeması

Analiz Aşamaları

Kit komponentleri anti MT-1 MMP antikoru ile kaplanmış 96 kuyucuklu plak, analiz tamponu, ekstraksiyon tamponu, standart, deteksiyon enzimi ve substrattan (S-2444) oluşmaktadır.

- ✓ Liyofilize MT-1 MMP standardı 1.0 ml analiz tamponu içerisinde çözüldü (32 ng/ml) ve buz üzerine alındı.
- ✓ Stok standarttan, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ng/ml olacak şekilde seri dilüsyon hazırlandı.
- ✓ 96 kuyucuklu plak, oda ısısına getirildi.
- ✓ Tüm standartlardan ve örneklerden 100 µl kuyucuklara eklendi ve +4 °C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Ertesi gün tüm kuyucuklar 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Deteksiyon reaktifi hazırlandı. Bunun için liyofilize substrat 5.1 ml analiz tamponunda çözüldü, üzerine 100 µl deteksiyon enzimi eklendi.
- ✓ Analiz tamponundan tüm kuyucuklara 50 µl ilave edildi. Plak 20 saniye çalkalayıcıda bekletildi.
- ✓ 405 nm de ilk absorbans değerleri ($Abs_{t=0}$) alındı.
- ✓ Plak, kapağı kapatılarak 37 °C de 6 saat inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyon tamamlandığında 405 nm de ikinci absorbans değerleri ($Abs_{t=6}$) alındı.
- ✓ Kit içinde " $(Abs_{t=6}) - (Abs_{t=0}) \times 1000/6^2$ (İnkübasyon zamanı) belirtilen formülden yararlanılarak her standart için absorbans değişikliği hesaplandı. Oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak örneklerdeki MT-1 MMP düzeyi hesaplandı, sonuçlar mg protein başına ng MT-1 MMP şeklinde ifade edildi.

3.1.2.2. Endostatin İle İlişkili Analizler

3.1.2.2.1. Dokuların Hazırlanması

Aynı doku serisinden (tümör ve normal doku) endostatin ile ilişkili analizlerde kullanılmak üzere 0.05 g tartım yapıldı. Her doku örneğine 500 µl homojenizasyon solüsyonu

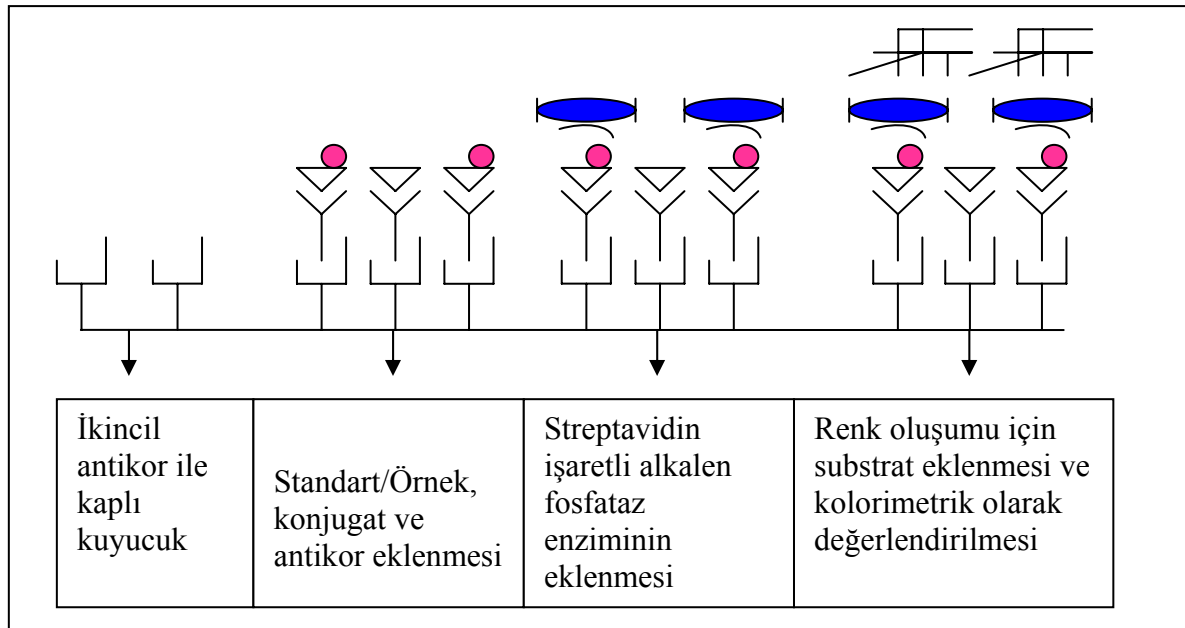
(%0.5 NP-40, 2 mM PMSF, 1 mM Pepstatin A, 2 mg/ml aprotinin içeren 10 mM Tris-HCL pH 6.8) ilave edildi ve homojenizasyon işlemi tamamlandı (51). Homojenatlar porsiyonlanarak -80 °C’de saklandı.

3.1.2.2.2. Protein Analizi

Endostatin ile ilişkili analizlerde kullanılmak üzere hazırlanan homojenatlarda protein analizi 3.2.2 bölümünde açıklandığı gibi BCA yönteminden yararlanılarak yapıldı.

3.1.2.2.3. ELISA Analizi

Tümör ve normal dokularda endostatin düzeyini ölçmek amacıyla Chemicon marka (ChemiKine, Katalog No: CYT 158) enzim immünoassay kiti kullanıldı. Testin ilkesi yarışmalı enzim immünoassay temeline dayanmaktadır. 96 kuyucuklu plaklar örnek içindeki mevcut endostatini tutmak amacıyla daha önceden ikincil bir antikor ile kaplanmıştır. Biotinlenmiş endostatin konjugatı (yarışan ligand), örnek/standart ile endostatin spesifik antikor bölgelerine bağlanmak için yarışır (Şekil 15). Sonuç olarak; örnek içindeki endostatin konsantrasyonu arttıkça, antikor tarafından yakalanan biotinlenmiş endostatin miktarı azalır. Analiz, streptavidin ile konjuge olmuş alkalin fosfataz enzimi ile kolorimetrik olarak değerlendirilir. Oluşturulan standart kalibrasyon eğrisi ile örnek içerisindeki endostatin miktarı hesaplanır. Testin ölçme aralığı 1.95 ng/ml ile 500 ng/ml arasındadır. Sensitivitesi ise 1.95 ng/ml dir.



Şekil 15: Endostatin için ELISA ile ölçüm yöntem şeması

Analiz Aşamaları

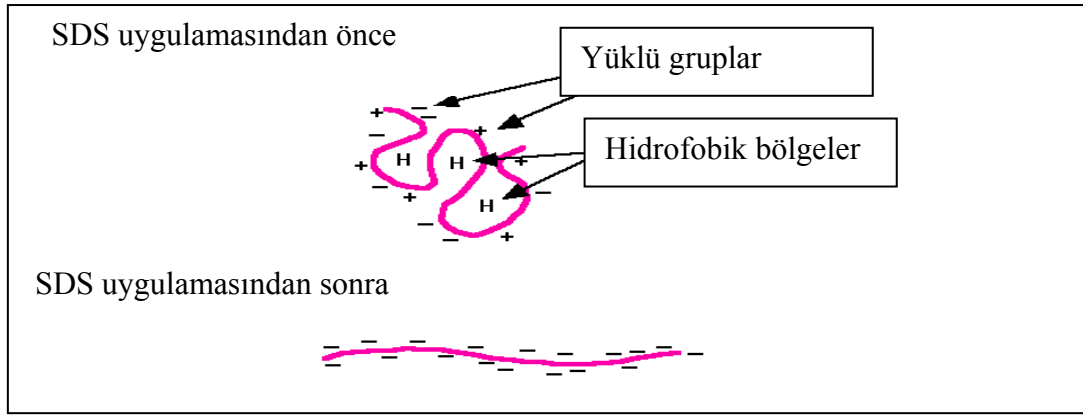
- ✓ Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.
- ✓ Liyofilize insana karşı geliştirilmiş endostatin antikoru 3.0 ml dilüsyon solüsyonu ile çözüldü.
- ✓ Liyofilize rekombinant endostatin standartı 1 ml 1 no'lu dilüsyon solüsyonu ile çözüldü. Stok rekombinant endostatin standartından (500 ng/ml), 1.95, 7.81, 31.25 ve 125 ng/ml olacak şekilde seri dilüsyon hazırlandı.
- ✓ Liyofilize endostatin konjugatı 3.0 ml 1 no'lu dilüsyon solüsyonu ile çözüldü.
- ✓ Liyofilize streptavidin ile konjuge olmuş alkalen fosfataz 6.0 ml dilüsyon çözeltisi ile hazırlandı.
- ✓ Renk oluşturma reaktifleri Reaktif A ve Reaktif B 1:1 oranında karıştırıldı ve oda sıcaklığında bekletildi.
- ✓ Örnekler için ön hazırlık yapıldı. Bu amaçla 12x75 mm boyutlarında tüplere 100 µl örnek + 200 µl 1 no'lu dilüsyon çözeltisi + 100 µl 2 no'lu dilüsyon çözeltisinden eklendi ve vorteks ile karıştırıldı.
- ✓ Tüm kuyucuklara 100 µl örnek ve standart eklendi.
- ✓ Tüm kuyucuklara 25 µl endostatin konjugatından eklendi ve ardından zaman kaybı olmaksızın 25 µl insan endostatin antikoru eklendi. Buharlaşmayı önlemek amacıyla plak kapatıldı ve 3 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Tüm kuyucuklar boşaltıldı ve 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- ✓ Kuyucuklarda yıkama solüsyonu kalmamasına özen gösterildi.
- ✓ Tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin alkalen fosfatazdan eklendi ve 30 dak. beklendi.
- ✓ 5 kez yıkama yapıldı.
- ✓ Tüm kuyucuklara 200 µl renk reaktifinden eklendi ve 20 dak. inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 490 nm de absorbans alındı.
- ✓ Standart kalibrasyon eğrisi oluşturularak örnek içindeki endostatin düzeyleri standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı. Sonuçlar mg protein başına ng endostatin olarak ifade edildi.

3.1.2.2.4. Western Blot Analizi

Western Blot analizi, poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin ayrılması, proteinlerin membrana transferi, ilgili proteinin görünür hale getirilmesi olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmektedir. Membran, proteinlerin adsorbsiyon ile tutunabileceği bir yapıda olmalıdır. Membran üzerinde ilgilenilen protein, ona özgü bir antikor kullanılarak ölçülebilir bir sinyal verilebilecek hale getirilir (52).

3.1.2.2.4.1. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmalarını sağlayan bir yöntemdir. Proteinler farklı yapı ve molekül ağırlıklarına sahip oldukları için öncelikle denatüre edilmeleri gerekir. SDS, proteinleri denatüre ederek primer yapıda kalmalarını sağlayan bir deterjandır. Aynı zamanda negatif yüklü sülfat grupları içerdiği için proteinlerin negatif yüklenmesine neden olur (Şekil 16). SDS ile muamele edilen proteinler denatüre oldukları ve negatif yüklendikleri için elektriksel alanda pozitif yöne doğru göç etme özelliği gösterirler.



Şekil 16: Proteinlerin SDS ile denatüre edilerek negatif yüklenmesi.

Farklı büyüklükteki proteinlerin farklı hızlarda göç etmesini sağlayacak ortam ise akrilamid monomerlerinin polimerizasyonu ile oluşan poliakrilamid jelidir. Poliakrilamid jel, küçük kanallardan oluşan moleküler elek olarak görev görmektedir. Küçük molekül ağırlığına sahip olan moleküller uygulanan elektriksel alanda poliakrilamidin oluşturduğu moleküler elek içinde daha hızlı hareket eder, büyük moleküllerin hareketi ise daha yavaş olur.

Vertikal elektroforez uygulamak için Atto marka elektroforez seti kullanıldı. Elektroforez sistemi, AE-6220 Dual Slab Chamber elektroforez tankı, 2 adet Slab Gel Cast jel kalıbı, ikişer adet 1 mm'lik cam, tarak ve conta ve AE-8450 1000VC güç kaynağından oluşmaktadır. Poliakrilamid jeller 16x16 cm boyutlarında iki cam düzlem arasında hazırlandı. Tablo 8'de gösterildiği gibi ayırıcı jel polimerizasyon solüsyonunun (%12) kimyasal polimerizasyonu “amonyum persülfat” (APS) ve “tetrametiletildiamin” (TEMED) eklenerek gerçekleştirildi. Solüsyon uygun yüksekliğe kadar yaklaşık (12-13 cm) 10 ml'lik bir pipet yardımıyla iki cam düzlemin bir kenarından döküldü ve üzeri % 0.01 SDS çözeltisi ile kaplandı. Daha sonra oda sıcaklığında 40-60 dak polimerize olması için bırakıldı. Polimerize olduktan sonra % 0.01 SDS çözeltisi, set ters çevrilerek döküldü.

Paketleyici jel solüsyonu Tablo 9'da belirtildiği gibi hazırlandı ve cam düzlemlerin bir kenarından ayırıcı jel üstüne boşaltıldı. 12 kuyulu tarak, hava kabarcığı olmayacak şekilde paketleyici jele yerleştirildi. 40-60 dak oda sıcaklığında polimerizasyona bırakıldı.

3.1.2.2.4.2. Örneklerin Hazırlanması

Protein örnekleri kuyucuk başına 40 µg olacak biçimde en az 1:3 oranında örnek tamponu ile seyreltildi ve 95 °C de su banyosunda 5 dak tutuldu. Endostatin pozitif kontrol için Calbiochem marka (Katalog No 324768, Lot No: B74743) rekombinant insan endostatin proteini kullanıldı. Rekombinat endostatinden kuyucuk başına 20 ng olacak şekilde uygulandı (51).

3.1.2.2.4.3. Jelin Yüklenmesi

Paketleyici jelin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı. İki cam düzlemden oluşan “jel sandwich”, iki cam arasında bulunan silikonlar çıkartılarak yaklaşık 1 L rezervuar tamponu ile doldurulmuş Atto elektroforez tankı içine yerleştirildi. Kuyulara analiz edilecek protein örnekleri ve moleküler ağırlık standartı (Biorad marka, Broad Range) yüklendi.

3.1.2.2.4.4. Elektroforetik Yürütme

Atto Cell üzerine elektrodlar bağlandı ve paketleyici jel boyunca sabit bir şekilde 90 V uygulandı. Bromfenol mavisi ayırıcı jele girince voltaj 150 V'a çıkarıldı. Bromfenol

mavisi jelin alt ucuna ulaşınca akım kesildi ve jel tanktan uzaklaştırıldı. Bu işlem 5 saat sonra tamamlandı.

Tablo 8: SDS-PAGE yönteminde ayırıcı jelin hazırlanması

JEL BİLEŐENLERİ (% 12)	Miktar
Saf su	12.7 ml
3M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml
%20 (w/v) SDS	0.1 ml
Akrilamid/Bisakrilamid (%29.2, %0.8 w/v)	4.6 ml
%10 (w/v) Amonyum persülfat	0.2 ml
TEMED	0.02 ml
Total monomer karışımı	20.00 ml

Tablo 9: SDS-PAGE yönteminde paketleyici jelin hazırlanması

JEL BİLEŐENLERİ (% 4)	Miktar
Saf su	7.35 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1.25 ml
% 20 (w/v) SDS	0.05 ml
% 30 (w/v) Akrilamid/Bisakrilamid	1.34 ml
% 10 (w/v) Amonyum persülfat	0.1 ml
TEMED	0.02 ml
Total monomer karışımı	10.00 ml

3.1.2.2.4.5. Proteinlerin Membrana Transferi

Yöntem, jel yüzeyine dik bir elektrik akımı uygulanarak eksi yüklü proteinlerin jelden çıkararak hemen üstündeki membrana adsorbe olmalarını sağlayan “Elektroforetik transfer” ilkesine dayanmaktadır. Kullanılan cihazların farklılığına göre tank içinde ıslak transfer ve yarı-kuru transfer olmak üzere iki teknik bulunmaktadır (52).

Çalışmamızda yarı-kuru transfer tekniği kullanıldı. Bu amaçla, Atto marka elektroblotting sistemi (AE-6675 HorizBlot ve AE-8450 1000VC güç kaynağı) kullanıldı. Burada bir tank dolusu tampon yerine, tamponla ıslatılmış filtre kağıtları, jel ve membran çevreler. Bu filtre-jel-membran-filtre katmanı doğrudan iki elektrod arasına yerleştirilir ve transfer gerçekleştirilir (Şekil 17). Akımın jel dışından geçmesi, yani kısa devre yapması önlenmelidir; bu amaçla filtre-jel-membran-filtre kağıtları aynı boyutta kesilmelidir. Membran ile jel arasında proteinlerin transferini önleyen hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edilmelidir.

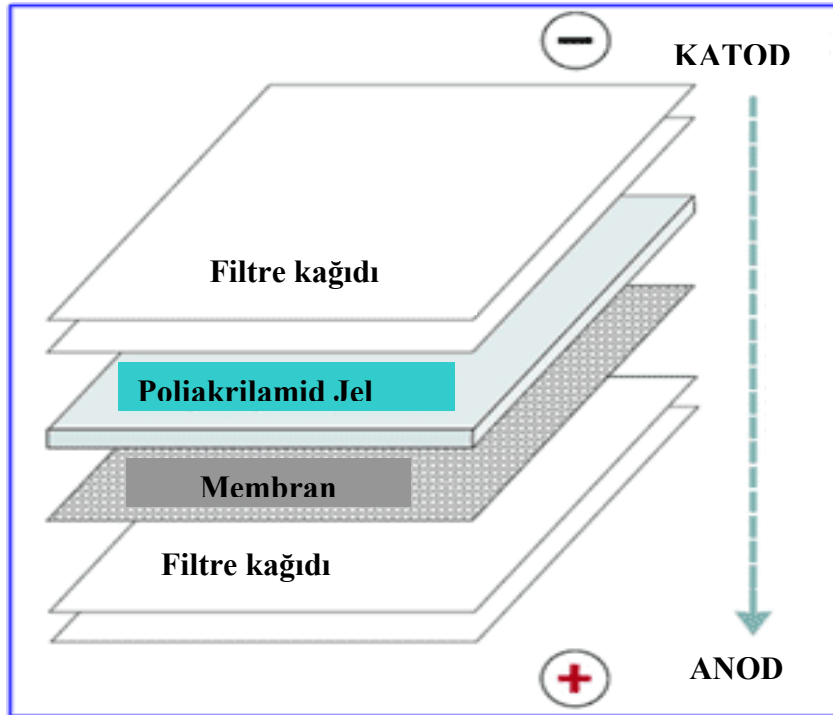
Analiz aşamaları aşağıda özetlenmektedir:

- ✓ Transfer çözeltisi (192 mM Glisin, % 0.5 SDS ve % 20 lik Metanol içeren 25 mM Tris HCl pH 8.3) hazırlandı.
- ✓ Polivinildendiflorid (PVDF) membran (Millipore, Immobilon P, Kat No: IPVH00010) uygun boyutta kesilerek önce % 100 metanol ile doyuruldu, daha sonra transfer çözeltisi ile dengelendi.
- ✓ Jelin protein bulunmayan paketleyici kısmı kesildi.
- ✓ Filtre kağıtları (Sigma P8171) ve membran, jel ile aynı büyüklükte kesildi.
- ✓ İki adet filtre kağıdı transfer solüsyonu ile ıslatıldı, en alta yerleştirildi, üzerine membran konuldu.
- ✓ Membran üzerine jel yerleştirildikten sonra transfer solüsyonu ile ıslatılmış diğer iki filtre kağıtları konuldu (+ yüklü blok) .
- ✓ Bu aşamalar sırasında arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.
- ✓ (-) yüklü blok kapatılarak, 15 V’ta 120 dak. transfer gerçekleştirildi.
- ✓ Transfer işlemini sonlandırmak için güç kaynağı kapatıldı ve sistemin kapağı açıldı.

- ✓ Jel ve membran birbirinden dikkatli bir şekilde ayrıldı.

3.1.2.2.4.6. İlgili Proteinin Görünür Hale Getirilmesi

İlgilenilen proteinin görünür hale getirilmesi, bu proteine karşı oluşturulmuş monoklonal veya poliklonal antikor ile mümkündür. Bu antikor membranın üstünde sadece ilgili proteine bağlanmalıdır.

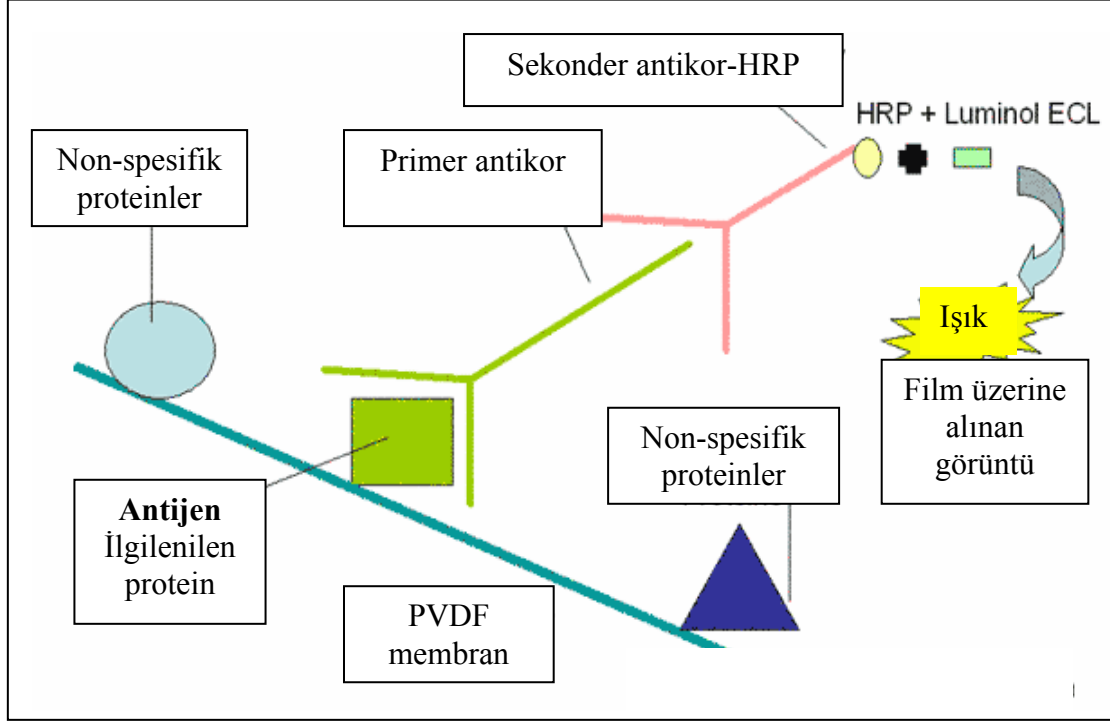


Şekil 17: Western Blot yönteminde yarı-kuru transfer sistemi

- ✓ Bunu sağlamak amacıyla membran yüzeyine adsorblanmış olan diğer proteinler, bloklama solüsyonu (150 mM NaCl , % 0.3 Tween 20 ve % 5 yağsız süt tozu içeren (AppliChem A0830), 50 mM Tris HCl, pH7.5) ile bir saat oda sıcaklığında bloke edildi.
- ✓ Bloklama sonrasında ilgili proteine karşı primer antikor (Rabbit Anti-Human Endostatin Poliklonal Antikor , 1000x dilüsyon, Chemicon AB1878) 150 mM NaCl , % 0.3 Tween 20 (AppliChem A0830) ve % 1 yağsız süt tozu içeren, 50 mM Tris HCl,

pH 7.5 solüsyonu içerisinde 1000 kez seyreltilerek çalkalayıcı üzerinde +4 °C’de bir gece inkübe edildi.

- ✓ Ortamdaki bağlanmamış antikor yıkama çözeltisi (154 mM NaCl, % 0.1 Tween 20 içeren 20 mM Tris-Baz pH 7.5) ile 15 dak süre ile 4 kez yıkandı.
- ✓ Primer antikorunu tanıyan sekonder antikor (Goat anti rabbit IgG Horseradish Peroxidase Conjugated Affinity Purified Antibody, 10000x dilüsyon, Chemicon marka Katalog No: AP132P) 150 mM NaCl, % 0.3 Tween 20 ve % 0.5 yağsız süt tozu içeren, 50 mM Tris HCl, pH7.5 solüsyonu içerisinde 10 000 kez seyreltilerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ✓ Bu süre sonunda membran tekrar yıkama çözeltisi ile 15 dak süre ile 4 kez yıkandı.
- ✓ Deteksiyon aşaması: Sinyalin görünür hale getirilmesi amacıyla Amersham marka (RPN 2132) ECLplus kiti kullanıldı. Kit, horseradish peroksidaz enziminin hidrojen peroksit varlığında substratı olan luminolü oksitlemesine ve luminolün uyarılmış durumdan bazal duruma geçerken yaydığı kemiluminesans ışımının röntgen filmini yakması ilkesine dayanmaktadır.
- ✓ Kit içinde bulunan peroksit ve enhancer solüsyonları 1:1 oranında karıştırılarak sinyal oluşturma solüsyonu hazırlandı.
- ✓ Film kaseti (Amersham marka, Katalog No: RPN 11649) hazırlandı: Kaset içine, bir poşet dosya yerleştirildi. Bu dosyanın içine membran kondu ve üzerine sinyal oluşturma solüsyonu eklendi. Kaset içerisine karanlık odada film (Kodak, Biomax Light Film-Katalog No: 8761520) yerleştirildi. Film, film banyosu (Konica SRX-101) ile görüntülendi. Buraya kadar izlenen aşamalar Şekil 18’de özetlenmektedir:



Şekil 18: Western Blot yönteminde ilgili proteinin görünür hale getirilmesinde izlenen aşamalar

3.1.2.3. VEGF Analizi

Tümör ve normal dokularda VEGF düzeyi (VEGF A) Biosource marka ELISA kiti ile gerçekleştirildi. İlk inkübasyon süresinde, standart/örnek içerisindeki VEGF, daha önceden kuyucuklara kaplanmış olan antikor tarafından tutulur. Yıkama aşamasından sonra VEGF'e spesifik biotinlenmiş spesifik monoklonal antikor eklenir. İkinci inkübasyon süresince, bu antikor immobilize olmuş antikora bağlanır. Bağlanmayan sekonder antikorların uzaklaştırılması amacıyla yapılan yıkama işleminden sonra, streptavidin–peroksidaz işaretli enzim ilave edilir. Bu enzim biotinlenmiş antikora bağlanır. Bağlanmayan fazla enzim yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Ortama substrat eklenir, oluşan rengin yoğunluğu, örnekte bulunan VEGF miktarı ile doğru orantılıdır.

Analiz Aşamaları

- ✓ Tüm kit komponentleri oda sıcaklığına getirildi.
- ✓ Liyofilize standart, standart dilüsyon tamponu ile hazırlandı (10 000 pg/ml). Stok standarttan 0.090 ml alındı ve üzerine 0.510 ml standart dilüsyon tamponu eklenerek final konsantrasyon 1500 pg/ml'ye getirildi. 1500 pg/ml'den 750, 375, 188, 93.8, 46.9 ve 23.4 pg/ml olmak üzere seri dilüsyon ile 7 farklı konsantrasyonda standart aralığı hazırlandı.
- ✓ Tüm kuyucuklara 50 µl inkübasyon tamponu eklendi.
- ✓ Standartlar için ayrılan kuyucuklara 100 µl standart eklendi.
- ✓ Kör kuyucuk için 100 µl standart dilüsyon tamponu eklendi. Kromojen kör kuyucuğu için bir çift kuyucuk boş bırakıldı.
- ✓ Örnekler için ayrılan kuyucuklara 50 µl örnek ve 50 ml standart dilüsyon tampon eklendi.
- ✓ 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyon sonunda 4 kez yıkama yapıldı.
- ✓ Kromojen kör için ayrılan kuyucuk dışında tüm kuyucuklara 100 µl biotinlenmiş anti VEGF (Biotin konjugatı) eklendi.
- ✓ 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyon sonunda 4 kez yıkama yapıldı.
- ✓ Kromojen kör için ayrılan kuyucuk dışında tüm kuyucuklara 100 µl streptavidin HRP eklendi.
- ✓ 30 dak oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyon sonunda 4 kez yıkama yapıldı.
- ✓ Tüm kuyucuklara 100 µl kromojen solüsyonundan eklendi.
- ✓ 30 dak süresince karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklara 100 µl reaksiyon sonlandırma solüsyonundan eklendi.

- ✓ Multiplak okuyucuda (Synergy HT, BioTek Ins., USA) 450 nm absorbans değerleri alındı. Standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak örneklerdeki VEGF düzeyi hesaplandı. Sonuçlar, protein düzeylerine (Bölüm 3.1.2.2; Protein Analizi) oranlanarak mg protein başına pg VEGF olarak ifade edildi.

3.1.2.4. İstatistiksel Analiz

Araştırmadan elde edilen veriler, SPSS 15.0 istatistik programında değerlendirilmiştir. Bağımsız değişkenlerin ortalamalarının karşılaştırılmasında “t testi” kullanıldı. Aynı hastada tedavi boyunca değişimlerin araştırılmasında “Eşlenik değişkenler t testi” kullanıldı. Farklı gruplarda sıklıkların karşılaştırılmasında “Ki-kare testi” kullanıldı. Sürekli değişkenler arasındaki korelasyonların karşılaştırılmasında “Pearson korelasyon yöntemi” kullanıldı. İstatistiksel incelemede 0.05’in altındaki p değeri % 95 güven aralığı ile anlamlı olarak kabul edildi. Parametrelere ait tüm değerler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi.

3.2. İN VİTRO DENEYLER

3.2.1. MATERYAL

Ticari olarak üretilen HT-29 hücre dizisi (KatNo: ACC 299, Lot No: 6) DSMZ'den (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Menschliche und Tierische Zellkulturen, Braunschweig, Germany) satın alındı. HT-29 hücre dizisi insan kolon adenokarsinoma hücre dizisidir. Kültürde yüzeye tutunarak monolayer olarak üreyen hücrelerdir. İnkübe süreleri 40-60 saattir. Çalışmalar başlayıncaya kadar hücre hattı sıvı nitrojen tankında (-180 °C'de) saklandı. Çalışmaya başlama gününde Bölüm 3.2.2.1'de tanımlanan uygulama basamakları doğrultusunda hücreler çözüldü. 37 °C de ve % 5 CO₂ sağlayan inkübatörde (Heraeus, Hera Cell) aşağıda tanımlanan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Media) (Biochrom F0445) ortamı içerisinde üretildiler (53). Hücre sayımı ve canlılığı tripan mavisi canlılık testi ile yapıldı. Kültürler yaklaşık % 80 sıklığına eriştiğinde pasajları yapıldı. Her pasaja ait hücreler, kapaklı dondurma tüplerine hücre hattı ismi, pasaj numarası ve tarih yazılarak bölüm 3.2.2.4'te tanımlanan dondurma protokolüne göre donduruldu.

3.2.1.1. Besi Ortamı Hazırlanması

500 ml'lik DMEM içerisine 2 mM konsantrasyonda L glutamin (Biochrom, K 0282), 1 µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin (Biochrom A2213) ve % 10 oranında inaktive edilmiş Fetal Sığır Serum (FBS) (Biochrom S0113) eklendi.

3.2.1.2. Fetal Sığır Serumun (FBS) İnaktive Edilmesi

-20 °C koşullarında saklanan FBS çözüldü ve 56 °C'de 30 dak bekletildi. Steril tüplere porsiyonlar ve son kullanım tarihi not alınarak -20 C'de saklandı.

3.2.2. YÖNTEMLER

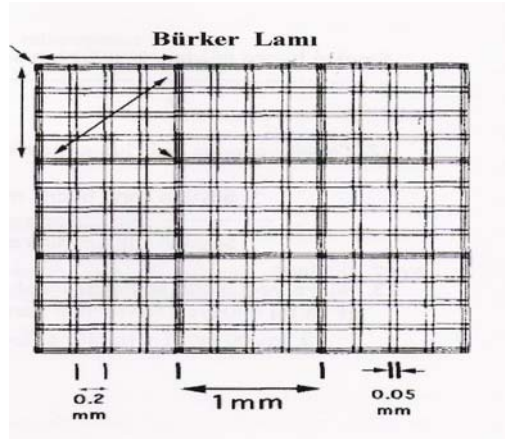
3.2.2.1 Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

- ✓ Hücreler 37 °C ye ayarlanmış su banyosunda (Grant, LT D6G) hızla çözüldü.
- ✓ Hücre süspansiyonu üzerine damla damla serumlu ortam eklenerek pipetaj yapıldı.

- ✓ 800 rpm de 5 dak santrifüj yapıldı.
- ✓ Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet yavaşça kaldırıldı.
- ✓ Pelet üzerine ortam eklenerek hücreler süspande edildi ve kültür kabı içerisine uygun yoğunlukta ekimi yapıldı.
- ✓ Faz-kontrast mikroskopunda (Olympus, CK40) incelenen hücreler inkübatöre alındı.

3.2.2.2. Hücre Sayımı ve Tripan Mavisi Canlılık Testi

Hücre sayımı için “Bürker” tip hemositometre (Şekil 19) kullanıldı. “Bürker” tip hemositometre, üzerinde üçlü çizgilerle birbirinden ayrılmış 9 büyük kareden oluşan özel mikroskop lamıdır. Her büyük karenin alanı 1 mm^2 dir. Lam üzerine koyulan sıvının derinliği 0.1 mm dir. Sonuçta her büyük kare üzerindeki sıvı hacmi 10^{-4} ml 'dir. [$1 \times 1 \times 0.1 = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.0001 \text{ cm}^3 = 0.0001 \text{ ml}$ (10^{-4} ml)]



Şekil 19: Bürker tip hemositometre

Canlı hücreler membran bütünlüğüne sahip olmaları nedeniyle tripan mavisi boyasını geçirmezler. Hücre membranının herhangi bir nedenle zarar görmesi halinde tripan mavisi hücre içerisine girer ve sitoplazmayı boyar. Bu durumda mikroskopik bakıda canlı hücreler parlak sarı renkte, ölü hücreler ise mavi sitoplazmalı olarak görülür (54). Hücre sayımı için izlenen aşamalar aşağıda özetlenmektedir:

- ✓ Hücre ortamı hücre kabından (25 cm² flask) uzaklaştırıldı.
- ✓ Önceden 37 °C'ye getirilmiş EDTA (Biochrom, Katalog No 2113) ile hücreler yıkandı.
- ✓ Hücre yüzeyini kaplayacak miktarda (700 µl) Tripsin (Biochrom, Katalog No: L2123,) eklendi. 37 °C'de inkübatörde (Heraeus, Hera Cell) 5 dak tripsin aktivasyonu için bekletildi.
- ✓ Tripsin, % 10 FBS içeren besi ortamı ile nötralize edildi. 800 rpm'de 5 dak santrifüj (Eppendorf, 5810R) edildi.
- ✓ Çöken hüceler taze ortam ile süspande edildi.
- ✓ Hemositometre sayım için hazırlandı: Lam ve lamel alkol ile temizlendi, lam üzerine lamel yerleştirildi.
- ✓ Ependorf tüpüne 1:1 oranında % 0.4 lük tripan mavisi (Sigma T-6146) solüsyonundan ve sayımı yapılacak hücre süspansiyonundan ilave edildi.
- ✓ Bu yeni karışım köpük oluşturmayacak şekilde pipet ile homojenize edildi.
- ✓ 50 µl kadar hücre süspansiyonu alınarak hemositometrenin lamı ile lameli arasına yavaşça akıtıldı.
- ✓ 20-30 saniye hücrelerin hareketsizleşmesi için beklendi.
- ✓ Faz-mikroskobu yardımıyla (Olympus, CK40) 10x objektif kullanarak, hemositometrenin tüm karelerindeki canlı hücreler sayıldı. Sayım sırasında en sağdaki üçlü çizgiden başlayarak küçük karelerin içindeki tüm hücreler, sağ çizgi üzerindikiler ve en üst çizgi üzerindikiler sayılarak yukarıya, daha sonra yandaki küçük kareden aynı prensiple aşağıya doğru inilir, alt çizgidekiler de sayıldıktan sonra yandaki küçük karelere geçilir. Tüm alan sayılıncaya kadar bu işleme devam edildi.
- ✓ Boyayı absorbe etmiş (ölü) hücreler de aynı şekilde sayıldı. Hücre yoğunluğu sayılamayacak kadar fazla ise PBS ile belli oranlarda dilüe edildi ve bu dilüsyon faktörü formülde kullanıldı. Mililitredeki canlı ve ölü hücre sayılarını belirlemek için “sayılan hücre miktarı x dilüsyon oranı x 10⁴/9” formülünden yararlanıldı.

3.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Aşağıdaki aşamalar izlendi:

- ✓ Kültür kapları (25 cm² flask) inkübatörden steril kabinete (Heraeus, Kendro Laboratory Products, Germany) taşındı.
- ✓ Kültür kabındaki kültür ortamı steril bir pipetle alındı. Yüzeğe yapışmış hücreler, tripsinin etkisini inhibe edebilecek herhangi FBS artığını uzaklaştırmak amacıyla az miktarda kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS (37 °C) ile yıkandı.
- ✓ Hücre tabakasını kaplayacak hacimde Tripsin (37 °C) eklendi.
- ✓ Kültür kabı 1-2 dak inkübatöre konuldu. Hücrelerin yuvarlaklaştığından ve yüzeyden ayrıldığından emin olmak için kültür mikroskopla kontrol edildi.
- ✓ Hücreler ayrılır ayrılmaz hücreleri hasara uğratabilecek tripsinin aktivitesini inhibe etmek için serum içeren ortam eklendi. Hücre süspansiyonu pipet ile çekildi ve yüzeyde kalabilecek hücreleri ayırmak için hücre tabakası birkaç kez yıkandı.
- ✓ Hücre süspansiyonu steril kapaklı bir tüpe aktarıldı.
- ✓ 800 rpm de 5 dak santrifüj edildi.
- ✓ Santrifüj sonrası hücre ortamı atıldı.
- ✓ Hücre peleti 2 ml ortamda resüspande edildi.
- ✓ Hücre süspansiyonundan 100 µl kadar ependorf tüpe aktarıldı. Hücreler “Tripan mavisi canlılık testi” ilkesine göre sayıldı.
- ✓ İstenilen yoğunluğu elde etmek için ortam ile seyreltilerek her bir kültür kabına belli sayıda hücre ekildi. Kültürlerin üzerine pasaj tarihi ve pasaj numarası yazıldı.
- ✓ Her yeni kültür kabına taze ortam eklendi ve inkübatöre konuldu.

3.2.2.4. Hücrelerin Dondurulması

- ✓ “Hücrelerin pasajlanması” protokolünde belirtilen “5.basamak santrifügasyon işlemi” ile elde edilen hücre peleti yavaş hareketlerle vurularak kaldırıldı ve üzerine %10 Dimetil Sulfoksit (DMSO) (Kat No: D4540, Fluka) ve % 90 serum içeren dondurma ortamı eklendi.

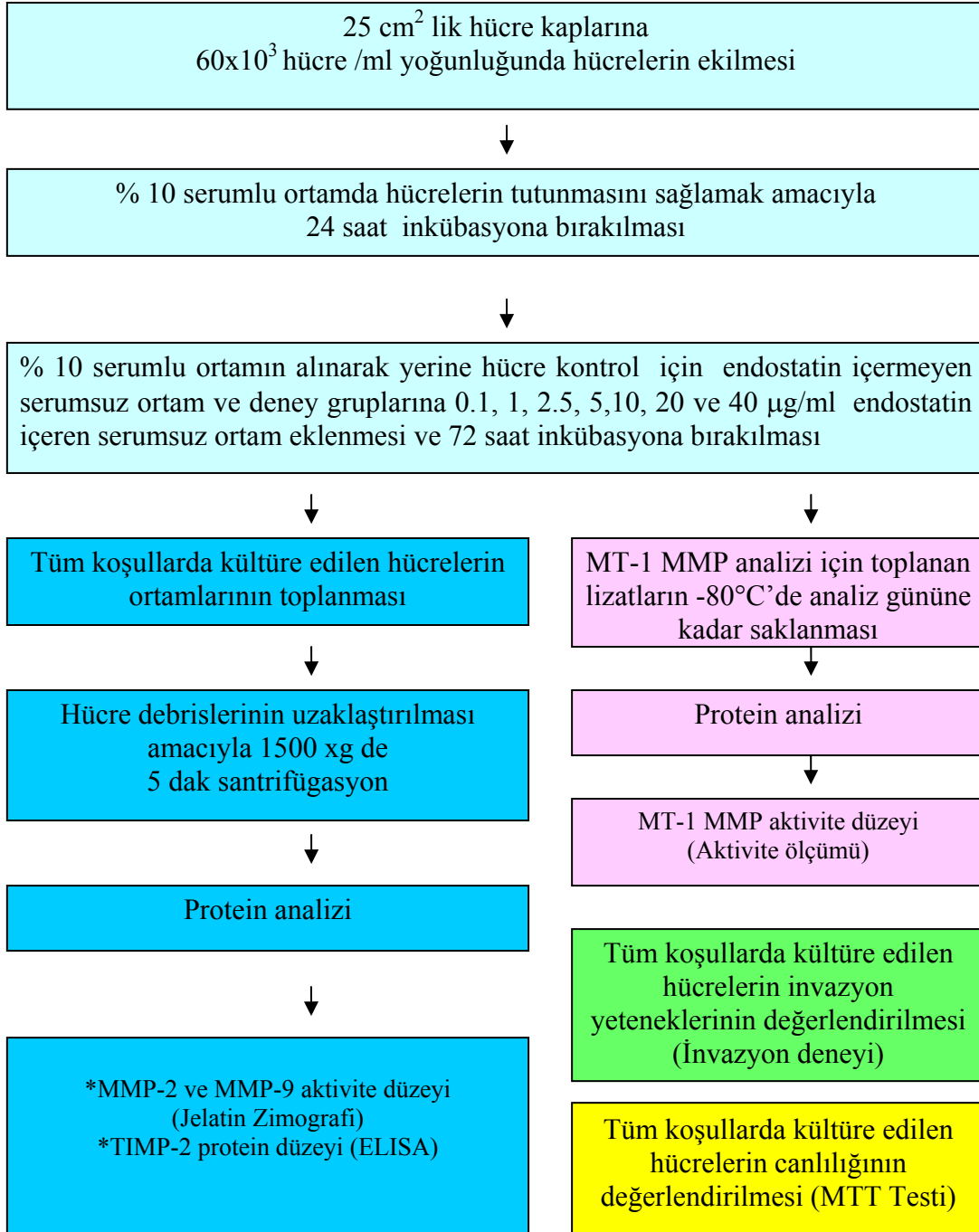
- ✓ Hücreler süspande edildikten sonra kapaklı dondurma tüplerine aktarıldı ve tüp üzerine hücre tipi, pasaj numarası, tarih bilgileri yazıldı.
- ✓ Tüpler 37 °C de ısıtılmış ve –1 °C/dak soğuma sağlayan buz kutusu (Nalgene, 5100-0001) içerisine konularak –80 °C dondurucuya (Sanyo Ultra Low Temperature Freezer, MDF-43086SBT) yerleştirildi.
- ✓ Bir gün sonra örnekler hücre hattı saklama kutusuna yerleştirilerek sıvı nitrojen tankı içine alındı. Saklama kutularının yerleşim pozisyonu ve kutu numarası not edildi.

3.2.2.5. Rekombinant Endostatin Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada Calbiochem marka (Katalog No 324768, Lot No: B74743) Recombinant İnsan Endostatini (4 mg/ml) kullanıldı. 4 mg/ml'den 0.1, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 µg/ml şeklinde serumsuz besiyeri içinde hazırlandı.

3.2.2.6. Hücrelerin Analiz İçin Hazırlanması

Tüm deney koşulları serumsuz ortam içerisinde gerçekleştirildi. Çünkü serumun MMP'leri interfere edeceğine ilişkin çalışmalar mevcuttur (55). Şekil 20'de deney akış şeması gösterilmektedir. Buna göre hücrelerin kültür kaplarına tutunmasını sağlamak amacıyla hücreler, ilk 24 saatte %10 FBS içeren DMEM içinde kültüre edildiler. İkinci gün kültür kaplarından serumlu ortam uzaklaştırılarak yerine planlanan konsantrasyonlarda endostatin (0.1, 1, 2.5, 5, 10, 20 ve 40 µg/ml) içeren serumsuz kültür ortamı eklendi ve hücreler 72 saat inkübasyona bırakıldılar. Endostatine maruz bırakılmayan hücreler "Hücre Kontrol" olarak tanımlandı. MMP-2 ve TIMP-2 analizleri için hücreler aynı kültür kaplarına ekildiler. Toplanan supernatantlar uygun miktarlarda porsiyonlanarak analiz gününe kadar -80 °C de saklandı. Hücre canlılığının değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen MTT analizi için hücreler 96 kuyucuklu hücre kaplarına ekildiler. Hücrelerin invazyon yeteneği ve MT-1 MMP düzeylerini belirlemek için yapılan analizlere ilişkin uygulama basamakları her analiz başlığı altında ayrıntılı olarak açıklanmaktadır. Tüm deneyler 3 ayrı hücre kültüründe 4. pasajta gerçekleştirildi.



Şekil 20: İn vitro deneyler için akış çizelgesi

3.2.2.6.1. MTT Testi

MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) yöntemi ile, bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon fragil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrojenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır (56). Ayrıntılı deney basamakları şu şekildedir:

- ✓ MTT (Sigma, M5655) stok solüsyonu PBS içinde steril ve karanlık koşullarda hazırlandı (500 mg/ml) ve 0.22 µm'lik filtre ile süzülerek debrisler uzaklaştırıldı. Test öncesi 1:10 oranında besiyeri ile seyreltilerek (50 mg/ml) kullanıldı.
- ✓ 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilen kontrol ve farklı endostatin konsantrasyonları ile 72 saat inkübe edilen kültürlerle (6×10^3 hücre/kuyucuk) hedeflenen inkübasyon süresinin sonunda kültür ortamları alındı, yerine karanlık ortamda 200 µl/kuyucuk hacimde MTT çözeltisi eklendi.
- ✓ Kültür plakları alüminyum folyo ile sarılarak 37 °C'de inkübatörde 4 saat tutuldu.
- ✓ İnkübasyon süresinin sonunda faz-kontrast mikroskobu altında canlı hücrelerde mor renkte formazan kristallerinin oluştuğu saptandı.
- ✓ Formazan kristallerini çözünür duruma getirmek için DMSO (Sigma D4540)'dan 100 µl/kuyucuk hacimde eklendi.
- ✓ Kültür plağı, plak okuyucusunda (Molecular Devices, Versamax) 570 nm dalga boyunda okutuldu. Hücre kontrol ve farklı endostatin konsantrasyonları ile inkübe edilmiş hücrelerin canlılık oranları absorpsiyon değerleri karşılaştırılarak incelendi.

3.2.2.6.2. Protein Analizi

Hücrelerin besi ortamının içinde bulunan fenol red kırmızı BCA protein analizinin ölçümlendiği 562 nm’de maksimum absorbans verdiği için kültür ortamına sekrete edilen proteinlerin ölçümünde “DC Protein Assay (Biorad Marka)” kullanıldı. Bu yöntemin temeli alkali ortamda Cu^{+2} ile protein arasında bir kompleks oluşması ve Folin reaktifinin indirgenmesi sonucu oluşan renk şiddetinin 750 nm’de kolorimetrik olarak değerlendirilmesine dayanmaktadır (57)

- ✓ Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA) kullanıldı. 25, 125, 250, 500, 750, 1500 ve 2000 $\mu g/\mu l$ olmak üzere 7 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.
- ✓ Standart ve örneklerden 5’er μl kuyucuklara eklendi.
- ✓ Tüm kuyucuklara sırasıyla 25 μl Reaktif A (alkali bakır tartarat solüsyonu) ve 200 μl Reaktif B (Folin reaktifi) ilave edildi. Oda sıcaklığında 15 dak inkübasyona bırakıldı ve 750 nm de multiplak okuyucuda (Synergy marka) okundu.
- ✓ Standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak protein miktarları hesaplandı.

3.2.2.6.3. Jelatin Zimografi Analizi

Tüm koşullarda kültüre edilen hücrelerde toplanan supernatantlarda bir üst basamakta tanımlanan protokol izlenerek “protein analizi” yapıldı. Bölüm 3.1.2.1.3’de açıklandığı üzere kuyucuk başına 20 μg protein/kuyucuk olacak şekilde Jelatin Zimografi Analizi yapıldı.

3.2.2.6.4. TIMP-2 Analizi

Farklı endostatin konsantrasyonları ile inkübe edilen HT-29 hücrelerinin ortamları toplandı. Ortama sekrete edilen TIMP-2 düzeyi bölüm 3.1.2.1.4’te belirtildiği gibi ELISA temelli Amersham marka (Kat No: RPN 2618) kit ile ölçümlendi.

3.2.2.6.5. MT-1 MMP Analizi

Farklı endostatin konsantrasyonları ile inkübe edilen HT-29 hücrelerinde MT-1 MMP düzeyleri bölüm 3.1.2.1.5’te belirtildiği gibi Amersham marka (RPN 2637) MT-1 MMP aktivite kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

Analiz için örneklerin hazırlanması:

- ✓ Her koşul için 6 kuyucuklu hücre kaplarına 60×10^3 hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.
- ✓ 72 saat 37°C 'de inkübasyon sonunda kuyucuklardan ortam alındı, yerine kit komponentlerinden olan ekstraksiyon tamponu (1.5 mM NaCl, 0.5 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2 , % 0.01 Brij 35 ve % 0.25 Triton X-100 içeren 50 mM Tris-HCl, pH 7.6) eklendi.
- ✓ $+4^\circ\text{C}$ de 15 dak inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyon sonrasında supernatant toplandı, analiz süresine kadar -80°C 'de saklandı.

Analiz Aşamaları

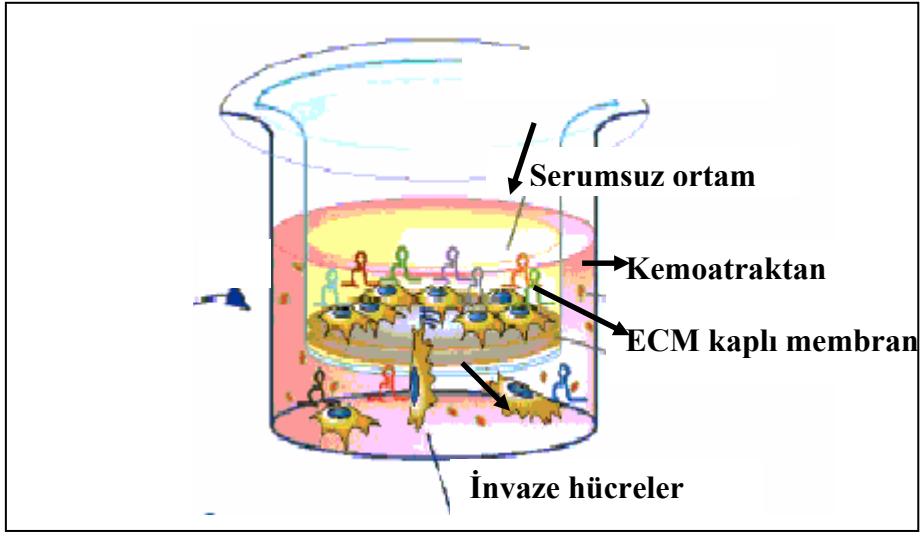
Bölüm 3.1.2.1.5'te belirtilen aşamalar izlendi. MT-1 MMP analizi için toplanan örneklerde bölüm 3.1.2.1.2'de açıklandığı şekilde BCA yöntemi ile protein analizi yapıldı. MT-1 MMP sonuçları mg protein başına ng aktif MT-1 MMP olarak ifade edildi.

3.3.2.6.6. İnvazyon Analizi

HT-29 hücrelerinin farklı endostatin konsantrasyonlarında gösterdikleri invazyon yetenekleri invazyon kiti (ECM 550, Chemicon marka) kullanılarak saptandı (58). Kit, üzeri ince matrix ile kaplanmış 8 μm büyüklüğünde porlarla kaplı 12 adet hücre kuyucuğundan oluşmuş 24 kuyucuklu plaktan oluşmaktadır. İnvaziv yeteneğinde olan hücreler bu porlardan geçerek polikarbonat membranın dış yüzeyine tutunurlar (Şekil 21).

İnvazyon deneyi aşağıdaki aşamalar izlenerek gerçekleştirildi:

- ✓ Kit, steril kabin içinde oda sıcaklığına getirildi.
- ✓ 300 μl serumsuz ortam kuyucuğa eklendi, rehidrate olması için 1-2 saat beklendi.
- ✓ Deney akış planında (Şekil 20) belirtildiği koşullarda serumsuz endostatinli ortam içerisinde hücre süspansiyonu (60×10^3 hücre/ml) hazırlandı.



Şekil 21: İn vitro invazyon deneyi

- ✓ Rehidrasyon işlemi için gerekli süre sonunda ortam, kuyucuk içinden membrana zarar vermeden alındı.
- ✓ Alt büyük kuyucuğa kemoatraktan olarak 500 µl %10 FBS içeren ortam ilave edildi.
- ✓ 300 µl hücre süspansiyonu (60×10^3 hücre/ml) kuyucuğa ekildi.
- ✓ 37 °C’de 72 saat inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Kuyucuk üzerindeki membrandan invaze olmayan hücreler kit tarafından sağlanan ucuna pamuk sarılmış çubukla toplandı. Bu işlem en az iki kez tekrarlandı.
- ✓ İnvaze olan ve membranın alt kısmına yapışan hücrelerin değerlendirilmesi için Giemsa boyama yapıldı.
- ✓ Kit içinde kullanılmamış diğer kuyucukların içine 500 µl PBS solüsyonu ilave edildi, membrana tutunmuş hücreler yıkandı.
- ✓ 500 µl 1:1.5 oranında PBS-metanol solüsyonu ilave edildi, boşaltıldı.
- ✓ 500 µl absolut metanol ilave edildi, oda sıcaklığında 10 dak bekletildi.
- ✓ Metanol döküldü.
- ✓ Tekrar metanol ilave edildi, döküldü.

- ✓ Hücre yüzeyini tamamen kaplayacak miktarda Giemsa (% 5, Carlo Erba) solüsyonundan ilave edildi, hafifçe sallayarak boyanın tüm yüzeye yayılması sağlandı. Oda sıcaklığında 5 dak bekletildi.
- ✓ Boya boşaltıldı.
- ✓ Boyanın fazlası uzaklaşınca kadar su ile yıkandı ve kurutuldu.
- ✓ Faz-kontrast mikroskobunda hücreler sayılarak her gruptaki hücrelerin invazyon kapasitesi değerlendirildi. Kontrol grubu hücreler ile kıyaslandığında, endostatinin invazyon üzerine inhibisyon oranı; “Kontrol grubunda invaze hücre sayısı-deney grubundaki invaze hücre sayısı/kontrol grubundaki invaze hücre sayısı $\times 100$ ” formülünden yararlanılarak ifade edildi (59).

3.3.2.6.7. İstatistiksel Analiz

Araştırmadan elde edilen veriler, SPSS 15.0 istatistik programında değerlendirilmiştir. İki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ alınmıştır. Parametrelere ait tüm değerler, ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Değişkenler arasındaki ilişki nonparametrik Spearman korelasyon çözümlemesi ile incelenmiştir. Bu yöntemde korelasyon katsayısı x ve y değişkenlerinin gerçek değerleri ile değil, bu değerlerin sıra numaraları ile hesaplanır ve x değişkenindeki sıralamanın y değişkenindeki sıralamaya nasıl bir uygunluk sağladığı aranır. Korelasyonun r değeri; 0.00-0.24 arasında ise zayıf, 0.25-0.49 arasında ise orta, 0.50 - 0.74 arasında ise güçlü ve 0.75-1.00 arasında ise çok güçlü olarak değerlendirilir (60).

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

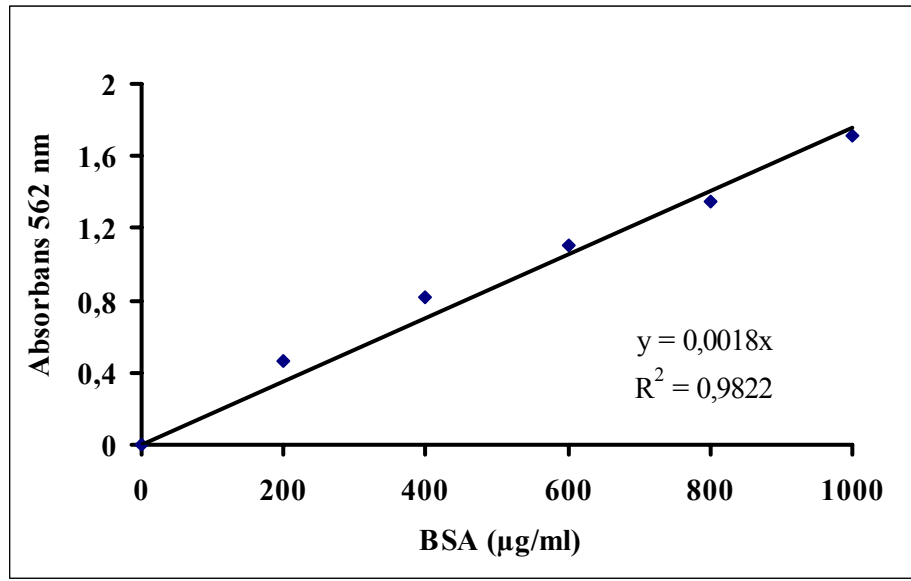
4. BULGULAR

4.1 DOKU ÇALIŞMALARI

4.1.1. MMP-2, TIMP-2 ve MT-1 MMP Analizlerine İlişkin Sonuçlar

4.1.1.1. Kolon ve Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Protein Düzeyleri

Kolon ve rektum tümör-eşlenik normal dokuların protein düzeyleri Şekil 22’de gösterilen standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 22: BSA standart kalibrasyon eğrisi

Kolon ve rektum tümör-eşlenik normal doku ortalama protein düzeyleri sırasıyla Tablo 10 ve Tablo 11’de gösterilmektedir.

Tablo 10: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında protein düzeyleri

(n=50)	Kolon		
	Tümör	Normal	p değeri†
Protein*	3377. 6 ± 160. 3	2691. 5 ± 134. 8	0.002

*µg/ml

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

Tablo 11: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında protein düzeyleri

(n=34)	Rektum		
	Tümör	Normal	p değeri†
Protein*	3228.6 ± 257.9	2556.2 ± 204.5	0.0048

*µg/ml

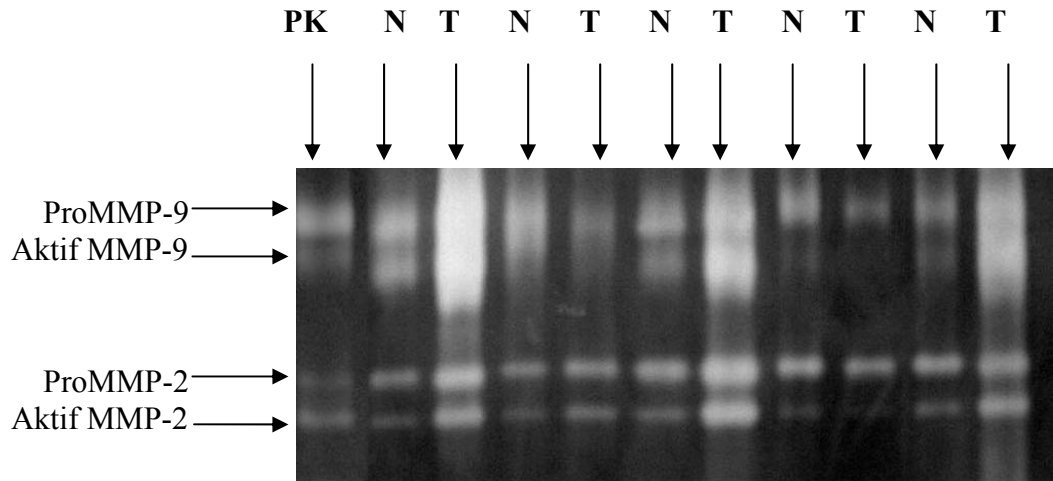
† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

Her doku örneği için saptanan protein düzeyleri; jelatinaz aktivite düzeylerinin µg protein başına (AU/µg protein), TIMP-2 ve MT-1 MMP düzeylerinin ise mg protein başına oranlanması (ng/mg protein) için kullanıldı.

4.1.1.2. Jelatinaz Aktivite Düzeyleri

4.1.1.2.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Jelatinaz Aktivite Düzeyleri

Şekil 23'de kolon tümör ve eşlenik normal doku örnekleri için temsili jelatin zimogram örneği gösterilmektedir. Kullanılan pozitif kontrol (PK) proteine göre proMMP-9'un moleküler ağırlığı 92 kDa; aktif MMP-9'un 82 kDa; proMMP-2'nin 72 kDa ve aktif MMP-2'nin moleküler ağırlığı ise 62 kDa olarak tanımlanmıştır.



Şekil 23: Kolon tümör ve eşlenik dokularında jelatin zimogram görüntüsü

(PK: Pozitif Kontrol, N: Normal doku, T: Tümör dokusu)

Kolon tümör dokularında aktif MMP-9 ve MMP-2'nin pro ve aktif formlarının jelatinolitik aktivite düzeyleri, eşlenik normal dokulardaki jelatinolitik aktivite düzeyleri ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 12).

MMP-9 ve MMP-2 için pro formdan aktif forma dönüşüm oranı “AktifMMP/Pro MMP” (r) oranlaması kullanılarak hesaplandı (61) (Tablo 12) Buna göre kolon tümör ve eşlenik normal dokularda rMMP-9 değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p > 0.05$). Bununla birlikte kolon tümör dokularındaki rMMP-2 değeri, eşlenik normal doku rMMP-2 değerlerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p = 0.004$).

Tablo 12: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında jelatin zimografi sonuçları

(n=50)	Kolon		
	Tümör	Normal	p değeri [†]
Pro MMP-9*	1043.3 ± 118.9	776.6 ± 121.2	0.059
Aktif MMP-9	877.5 ± 187.9	189.5 ± 44.5	0.000
rMMP-9*	1.82 ± 0.93	0.39 ± 0.081	0.129
Pro MMP-2*	358.9 ± 42.5	184.6 ± 27.7	0.000
Aktif MMP-2*	308.2 ± 41.9	63.9 ± 11.6	0.000
rMMP-2	1.03 ± 0.14	0.53 ± 0.10	0.004

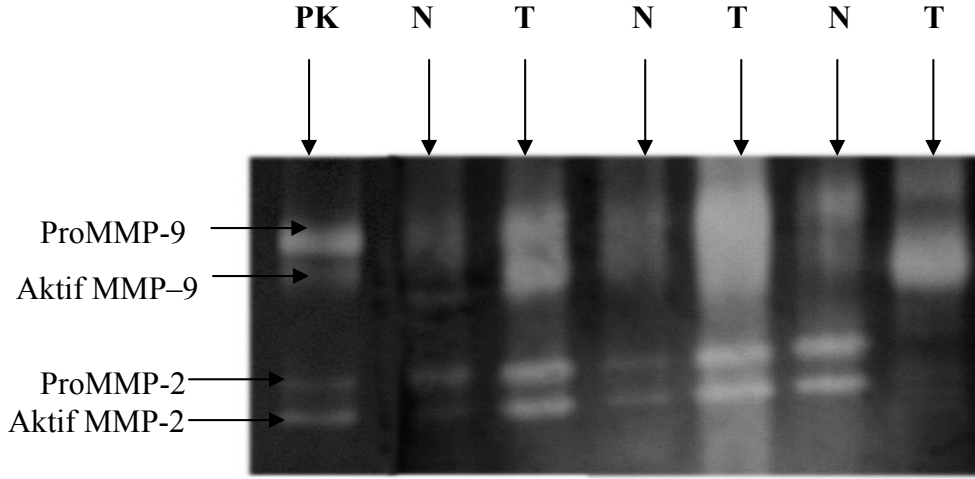
* AU/μg protein

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

● Aktif MMP/ProMMP oranı

4.1.1.2.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Jelatinaz Aktivite Düzeyleri

Şekil 24’de rektum tümör ve eşlenik normal doku örnekleri için temsili jelatin zimogram örneği gösterilmektedir. Kullanılan pozitif kontrol (PK) proteine göre proMMP 9’un moleküler ağırlığı 92 kDa; aktif MMP-9’un 82 kDa; proMMP-2’nin 72 kDa ve aktif MMP-2’nin moleküler ağırlığı ise 62 kDa olarak tanımlanmıştır.



Şekil 24: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında jelatin zimogram görüntüsü (PK: Pozitif Kontrol, N: Normal doku, T: Tümör dokusu)

Rektum tümör dokularında hem MMP-9 hem de MMP-2’ nin pro ve aktif formlarının jelatinolitik aktivite düzeyleri, eşlenik normal dokulardaki jelatinolitik aktivite düzeyleri ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 13).

MMP-9 ve MMP-2 için pro- formdan aktif forma dönüşüm oranı “AktifMMP/Pro MMP” oranlaması (r) kullanılarak hesaplandı (61). (Tablo 13) Buna göre rektum tümör ve eşlenik normal dokularda rMMP-9 değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p = 0.526$). Bununla birlikte tümör dokularındaki rMMP-2 değeri, eşlenik normal doku rMMP-2 değerlerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p = 0.017$).

Tablo 13: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında jelatin zimografi sonuçları

(n=34)	Rektum		
	Tümör	Normal	p değeri†
Pro MMP-9*	888.4 ± 147.2	555.8 ± 99.9	0.008
Aktif MMP-9	515.7 ± 106.6	109.6 ± 28.9	0.001
rMMP-9•	1.50 ± 0.58	1.09 ± 0.43	0.526
Pro MMP-2*	261.9 ± 41.9	158.9 ± 29.2	0.012
Aktif MMP-2*	148.4 ± 26.2	47.8 ± 12.0	0.000
rMMP-2	1.76 ± 0.57	0.32 ± 0.017	0.017

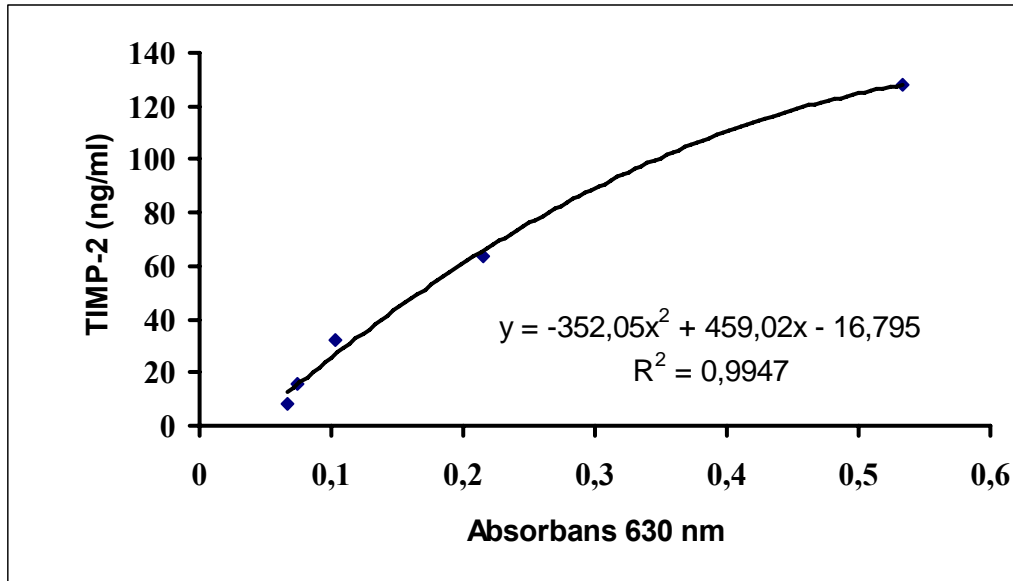
* AU/μg protein

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

• Aktif MMP/ProMMP oranı

4.1.1.3. TIMP-2 Düzeyleri

Kolon ve rektum tümör-eşlenik normal dokularda TIMP-2 protein düzeyleri oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden (Şekil 25) yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 25: TIMP-2 standart kalibrasyon eğrisi

4.1.1.3.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda TIMP-2 Düzeylerinin Karşılaştırılması

Kolon tümör ve eşlenik normal doku TIMP-2 protein düzeyleri Tablo 14’de gösterilmektedir. Kolon tümör dokularında TIMP-2 protein düzeyleri, eşlenik normal dokulardaki TIMP-2 protein düzeyleri ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 14: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında TIMP-2 protein düzeyleri

(n=50)	Kolon		
	Tümör	Normal	p değeri†
TIMP-2*	3.6 ± 1.5	3.4 ± 0.8	0.9

* ng/mg protein

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

4.1.1.3.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda TIMP-2 Düzeylerinin Karşılaştırılması

Rektum tümör dokularında TIMP-2 protein düzeyleri, eşlenik normal dokulardaki TIMP-2 protein düzeyleri ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 15).

Tablo 15: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında TIMP-2 protein düzeyleri

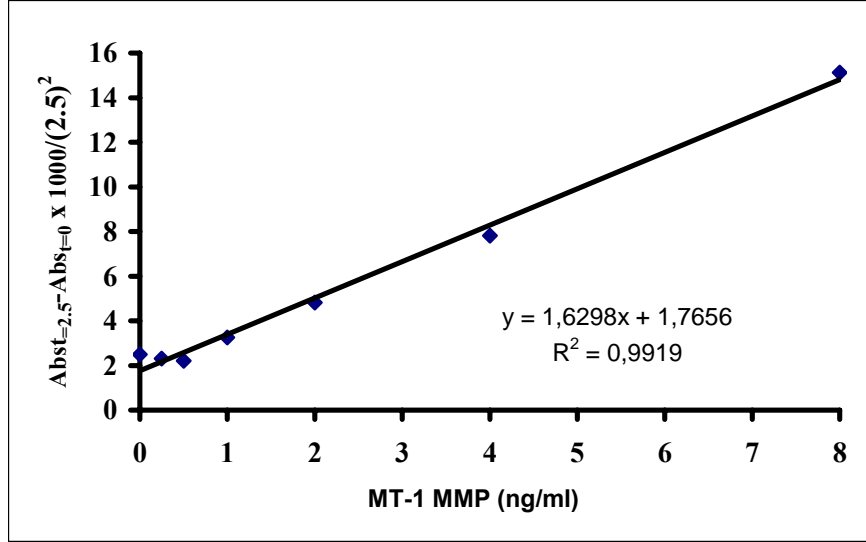
(n=34)	Rektum		
	Tümör	Normal	p değeri†
TIMP-2*	1.8 ± 0.49	1.7 ± 0.61	0.841

* ng/mg protein

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

4.1.1.4. MT-1 MMP Düzeyleri

Kolon ve rektum tümör-eşlenik normal dokularda aktif MT-1 MMP protein düzeyleri, oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden (Şekil 26) yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 26: MT-1 MMP standart kalibrasyon eğrisi

4.1.1.4.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda MT-1 MMP Düzeylerinin Karşılaştırılması

Kolon tümörlerinde aktif MT-1 MMP protein düzeyi, eşlenik normal doku aktif MT-1 MMP protein düzeylerine göre yaklaşık 3 kat yüksek olarak bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 16).

Tablo 16: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında MT-1 MMP düzeyleri

(n=50)	Kolon		
	Tümör	Normal	p değeri†
MT-1 MMP*	1.53 ± 0.54	0.52 ± 0.10	0.063

* ng/mg protein

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

4.1.1.4.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda MT-1 MMP Düzeylerinin Karşılaştırılması

Rektum tümörlerinde aktif MT-1 MMP protein düzeyleri, eşlenik normal doku aktif MT-1 MMP protein düzeylerine göre yaklaşık 2 kat yüksek olarak bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 17).

Tablo 17: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında MT-1 MMP düzeyleri

(n=34)	Rektum		
	Tümör	Normal	p değeri†
MT-1 MMP*	0.77 ± 0.22	0.46 ± 0.06	0.142

* ng/mg protein

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

4.1.1.5. TIMP-2/MT-1 MMP Oranları

4.1.1.5.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda TIMP-2/MT-1 MMP Oranları

MMP-2'nin endojen inhibitör proteini olan TIMP-2 ile endojen aktivatör proteini olan MT-1 MMP protein düzeyleri birbirine oranlanarak "inhibitör protein/aktivatör protein oranı" hesaplandı. Kolon tümör dokularının TIMP-2/MT-1 MMP oranları, eşlenik normal dokuların TIMP-2/MT-1 MMP oranlarından düşük bulundu. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p=0.006$) (Tablo 18).

Tablo 18: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında TIMP-2/MT-1 MMP oranları

(n=50)	Kolon		
	Tümör	Normal	p değeri†
TIMP-2/MT-1 MMP	4.0 ± 1.23	8.3 ± 1.58	0.006

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

4.1.1.5.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda TIMP-2/MT-1 MMP Oranları

Rektum tümör dokularının TIMP-2/MT-1 MMP oranları, eşlenik normal dokuların TIMP-2/MT-1 MMP oranlarından yüksek bulundu. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 19).

Tablo 19: Rektum tümör ve normal dokularında TIMP-2/MT-1 MMP oranları

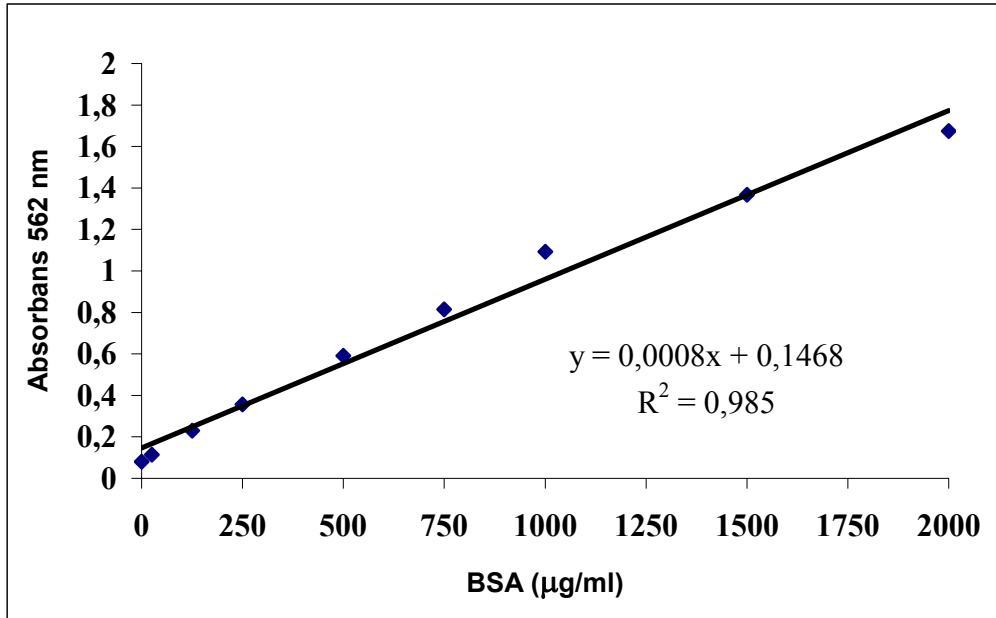
(n=34)	Rektum		
	Tümör	Normal	p değeri†
TIMP-2/MT-1 MMP	5.06 ± 1.93	3.47 ± 0.99	0.338

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

4.1.2. Endostatin Düzeylerine İlişkin Sonuçlar

4.1.2.1. Kolon ve Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Protein Düzeyleri

Şekil 27’de gösterilen standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak kolon ve rektum tümör-eşlenik normal doku protein düzeyleri hesaplandı.



Şekil 27: BSA standart kalibrasyon eğrisi

Kolon ve rektum tümör-eşlenik normal doku ortalama protein düzeyleri sırasıyla Tablo 20 ve Tablo 21’de gösterilmektedir.

Tablo 20: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında protein düzeyleri

(n=50)	Kolon		
	Tümör	Normal	p değeri†
Protein*	6007. 4 ± 380	4179. 5± 287	0.000

*µg/ml

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

Tablo 21: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında protein düzeyleri

(n=34)	Rektum		
	Tümör	Normal	p değeri†
Protein*	5751.3 ± 348.3	4735 ± 398,9	0.060

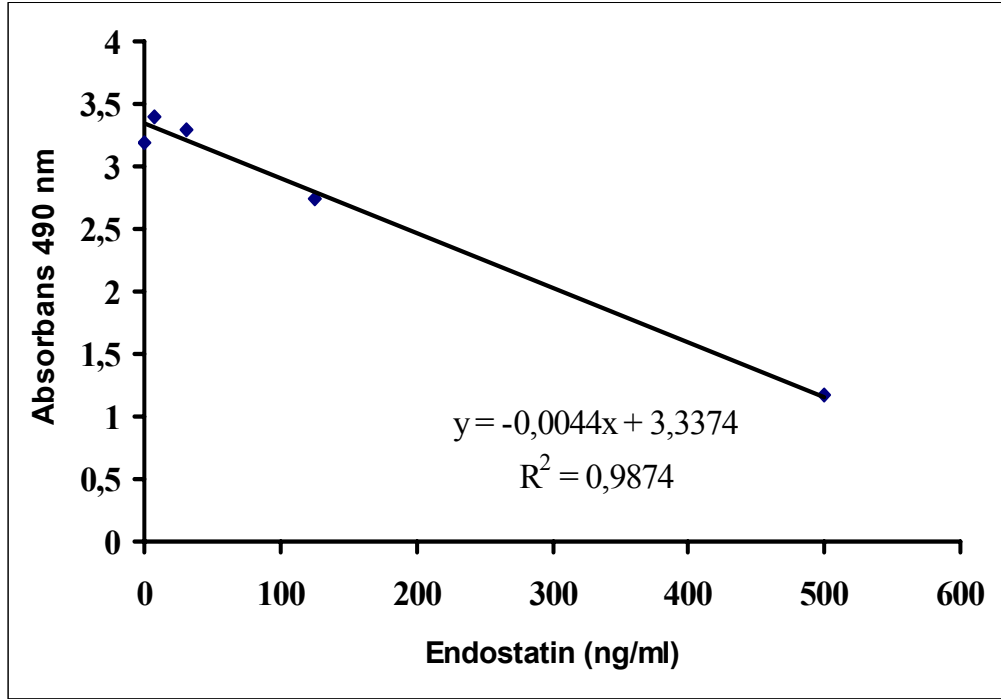
*µg/ml

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

Her doku örneği için saptanan protein düzeyleri; endostatin düzeylerinin mg protein başına (ng/mg protein) ve VEGF düzeylerinin ise pg protein başına oranlanması (pg/mg protein) için kullanıldı.

4.1.2.2. ELISA Sonuçları

Kolon ve rektum, tümör-eşlenik normal dokularda endostatin düzeyleri oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden (Şekil 28) yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 28: Endostatin standart kalibrasyon eğrisi

4.1.2.2.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Endostatin Düzeylerinin Karşılaştırılması

Kolon tümör dokusu endostatin protein düzeyleri ile eşlenik normal doku endostatin düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 22).

Tablo 22: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında endostatin düzeyleri

(n=50)	Kolon		
	Tümör	Normal	p değeri†
Endostatin*	46.2 ± 7.5	54.6 ± 8.8	0.097

* ng/mg protein

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

4.1.2.2.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Endostatin Düzeylerinin Karşılaştırılması

Rektum tümör dokusu endostatin protein düzeyleri ile eşlenik normal doku endostatin protein düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 23).

Tablo 23: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında endostatin düzeyleri

(n=34)	Rektum		
	Tümör	Normal	p değeri†
Endostatin*	74.7 ± 10.3	77.7 ± 9.7	0.572

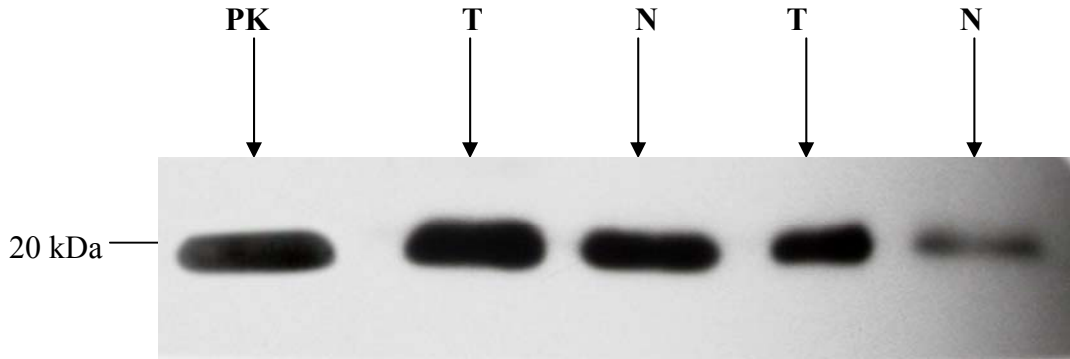
* ng/mg protein

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

4.1.2.3. Endostatin Protein Ekspresyonunun Western Blot İle Gösterilmesi

4.1.2.3.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Endostatin Protein Ekspresyonu

Kolon kanserli toplam 13 hastada tümör ve eşlenik dokularında endostatin Western Blot çalışması yapıldı. 13 hastanın 6'sında hem tümör hem de eşlenik normal dokularında endostatin protein ekspresyonu saptandı. Temsili film görüntüsü Şekil 29'da gösterilmektedir.

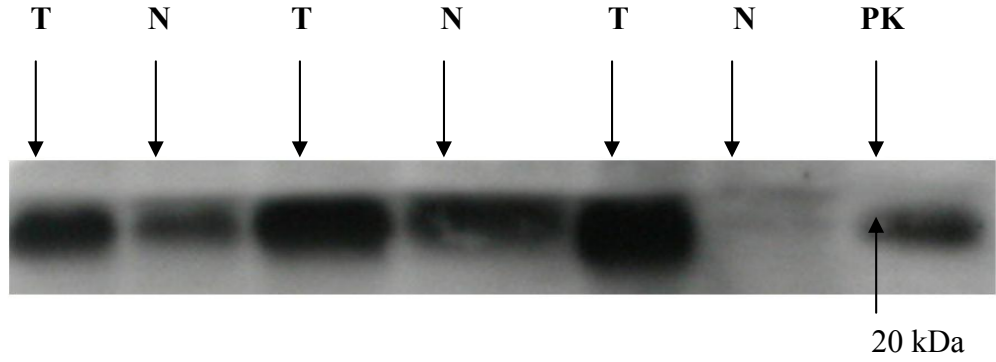


Şekil 29: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında endostatin ekspresyonu

(PK: Pozitif Kontrol, T: Tümör dokusu, N: Normal doku olarak ifade edilmektedir.)

4.1.2.3.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda Endostatin Protein Ekspresyonu

Rektum kanserli toplam 14 hastada tümör ve eşlenik dokularında endostatin western blot çalışması yapıldı. 14 hastanın 3'ünde hem tümör hem de eşlenik normal dokularında endostatin protein ekspresyonu saptandı. Buna ilişkin temsili film görüntüsü Şekil 30'da gösterilmektedir.



Şekil 30: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında endostatin ekspresyonu (PK: Pozitif Kontrol, T:Tümör dokusu, N: Normal doku olarak ifade edilmektedir.)

Endostatin ekspresyonunun istatistiksel değerlendirilmesinde; kolon ve rektum tümör ve eşlenik dokularında ekspresyon pozitif olan örnek sayısının az olması nedeni ile parametrik test kullanılamadı. Bu amaçla kolon (n=14) ve rektum (n=13) örnekleri ile ilişkili bulgular total kolorektal grup (n=27) olarak değerlendirildi. Hastaların demografik özellikleri Tablo 24'de özetlenmektedir. İstatistiksel değerlendirme için Ki-kare testi uygulandı. Kolorektal tümör ve eşlenik normal doku arasındaki fark anlamlı bulunmadı. Endostatin protein ekspresyonu ile klinikopatolojik değişkenler arasındaki ilişki düzeyleri incelendiğinde ise ekspresyon ile klinikopatolojik değişkenler arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 24).

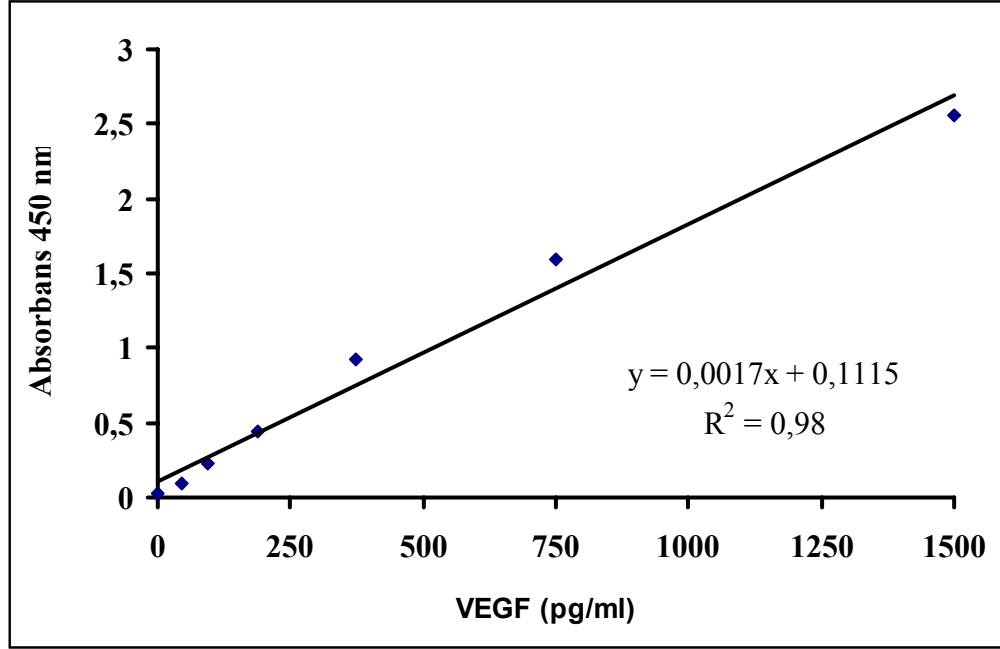
Tablo 24: Kolorektal kanserli hastalarda klinikopatolojik değişkenler ile endostatin ekspresyonu arasındaki ilişki

Klinikopatolojik Değişkenler		Endostatin Ekspresyonu (n=27)		p (Ki-kare testi)
		Negatif	Pozitif	
Cinsiyet	Kadın	10	3	0.249
	Erkek	8	6	
Histolojik Tip	Adenokarsinom	14	7	0.695
	Diğerleri	4	2	
Diferansiasyon	Düşük	17	9	0.667
	Yüksek	1	0	
Tümör Yerleşimi	Kolon	7	6	0.171
	Rektum	11	3	
T	pT1	5	3	*
	pT2	6	1	
	pT3	4	5	
	pT4	3	0	
	pT0-2	5	3	0.550
	pT3-4	13	6	
	pT0-3	8	4	0.657
	pT4	10	5	
Evre	1	5	3	*
	2	6	1	
	3	4	5	
	4	3	0	
N	Negatif	11	4	0.340
	Pozitif	7	5	
Perinöral İnvazyon	Yok	11	6	0.561
	Var	7	3	
Uzak Metastaz	Yok	12	8	0.224
	Var	6	1	

*Alt grup sayılarının fazla ve örnek sayılarının az olması nedeni ile istatistiksel analiz yapılamadı.

4.1.3. VEGF Düzeyleri

Kolon ve rektum tümör-eşlenik normal dokularda VEGF düzeyleri, oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden (Şekil 31) yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 31: VEGF standart kalibrasyon eğrisi

4.1.3.1. Kolon Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda VEGF Düzeylerinin Karşılaştırılması

Kolon tümör dokusu VEGF protein düzeyleri ile eşlenik normal doku endostatin düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 25).

Tablo 25: Kolon tümör ve eşlenik normal dokularında VEGF düzeyleri

(n=50)	Kolon		
	Tümör	Normal	p değeri†
VEGF*	102.4 ± 16.9	98.5 ± 16.6	0.852

* pg/mg protein

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

4.1.3.2. Rektum Tümör ve Eşlenik Normal Dokularda VEGF Düzeylerinin Karşılaştırılması

Rektum tümör dokusu VEGF protein düzeyleri ile eşlenik normal doku endostatin protein düzeyleri karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 26).

Tablo 26: Rektum tümör ve eşlenik normal dokularında VEGF düzeyleri

(n=34)	Rektum		
	Tümör	Normal	p değeri†
VEGF*	85.8 ± 15.4	74.2 ± 11.9	0.483

* pg/mg protein

† Tümör vs normal doku (eşlenik veriler t-testi)

4.1.4. Klinikopatolojik Değişkenler İle Biyokimyasal Parametreler Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

4.1.4.1. Kolon Kanseri Klinikopatolojik Değişkenler İle Biyokimyasal Parametrelerin Anlamlı İlişkileri

Kolon kanseri klinikopatolojik değişkenler ile biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki incelendiğinde; aktif MMP-9 ile tümör invazyon derinliği “pT1-2 vs pT3-4” ($p=0.011$) (Tablo 27) ve uzak metastaz arasında anlamlı ilişki bulundu ($p=0.047$) (Tablo 28). Bununla birlikte, biyokimyasal parametreler ile histopatolojik tip, diferansiasyon, lenf damar invazyonu, perinöral invazyon ve pN ile biyokimyasal parametreler arasında herhangi anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Tablo 27: Kolon tümör aktif MMP-9 düzeyi ile tümör invazyon derinliği arasında saptanan ilişki

Aktif MMP-9	pT1-2 vs pT3-4	N	Ortalama±Standart hata	p değeri
	T1-2	33	327.2 ± 110.3	p=0.011
T3-4	17	967.1 ± 215.2		

t-testi

Tablo 28: Kolon tümör aktif MMP-9 düzeyi ile uzak metastaz arasında saptanan ilişki

Aktif MMP-9	Uzak Metastaz	N	Ortalama±Standart hata	p değeri
	Yok	40	404.6 ± 176.4	p=0.047
Var	10	995.8 ± 227.8		

t-testi

Kolon endostatin protein düzeyleri ile klinikopatolojik değişkenler arasında ilişki incelendiğinde ise herhangi anlamlı bir ilişki saptanmadı. Aynı şekilde endostatin ile MMP-2, MMP-9 ve VEGF düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı.

4.1.4.2. Rektum Kanseri Klinikopatolojik Değişkenler İle Biyokimyasal Parametrelerin Anlamlı İlişkileri

Rektum kanseri klinikopatolojik değişkenler ile biyokimyasal parametrelerin ilişkileri incelendiğinde tanı anı metastaz ile aktif MMP-9 (p=0.002), aktif MMP-9/Pro MMP-9 oranı (rMMP-9) (p=0.000) ve aktif MMP-2/Pro MMP-2 oranı (rMMP-2) (p=0.006) arasında anlamlı ilişki bulundu (Tablo 29).

Tablo 29: Rektum tümör MMP-9, rMMP-9 ve rMMP-2 değerleri ile tanı anı metastaz arasında saptanan ilişki

Parametreler	Tanı anı metastaz	N	Ortalama± Standart Hata	p değeri
Aktif MMP-9	Yok	32	463.5 ± 99.2	0.002
	Metastaz	2	2351.9 ± 210	
rMMP-9	Yok	32	0.8 ± 0.3	0.000
	Metastaz	2	9.3 ± 2.7	
rMMP-2	Yok	32	1.5 ± 0.5	0.006
	Metastaz	2	10.4 ± 3.1	

t-testi

Lenf nodu metastaz varlığı ile proMMP-9 (p=0.012) ve proMMP-2 arasında anlamlı ilişki saptandı (p=0.021) (Tablo 30).

Tablo 30: Rektum tümör proMMP-9 ve proMMP-2 ile lenf nodu metastazı arasında saptanan ilişki

Parametreler	Lenf Nodu Metastazı	N	Ortalama± Standart Hata	p değeri
proMMP-9	Negatif	17	559.6 ± 161.3	0.012
	Pozitif	17	1315.7 ± 234.4	
proMMP-2	Negatif	17	183.3 ± 47.9	0.021
	Pozitif	17	383.2 ± 66.3	

t-testi

Perinöral invazyon varlığı ile aktif MMP-9 (p=0.042) ve VEGF düzeyleri (p=0.044) arasında anlamlı ilişki saptandı (Tablo 31).

Tablo 31: Rektum tümör aktif MMP-9 ve VEGF düzeyleri ile perinöral invazyon arasında saptanan ilişki

Parametreler	Perinöral invazyon	N	Ortalama± Standart Hata	p değeri
Aktif MMP-9	Yok	21	322.9 ± 89.8	0.042
	Var	13	878.1 ± 243.8	
VEGF	Yok	21	58.2 ± 16.9	0.044
	Var	13	117.6 ± 25.7	

t-testi

Nüks ile klinikopatolojik değişkenler ilişkilendirildiğinde ise nüks varlığında saptanan TIMP-2 düzeyleri, nüks yokluğunda saptanan TIMP-2 düzeylerine göre anlamlı olarak düşük saptandı (p=0.011). Ayrıca, nüks varlığında aktif MMP-2/Pro MMP-2 (rMMP-2) oranı, nüks yokluğundaki rMMP-2 oranına göre anlamlı olarak 4 kat daha az bulundu (0.002) (Tablo 32).

Tablo 32: Rektum tümör TIMP-2 düzeyleri ile nüks arasında saptanan ilişki

Parametreler	Nüks	N	Ortalama± Standart Hata	p değeri
TIMP-2	Yok	24	2.5± 0.7	0.011
	Var	10	0.4± 0.2	
rMMP-2	Yok	24	0.4 ± 0.1	0.002
	Var	10	0.1 ± 0.02	

t-testi

Tümör invazyon derinliği (T), diferansiasyon, histopatolojik tip, lenfatik ve vasküler invazyon ile biyokimyasal parametreler arasında anlamlı ilişki bulunmadı.

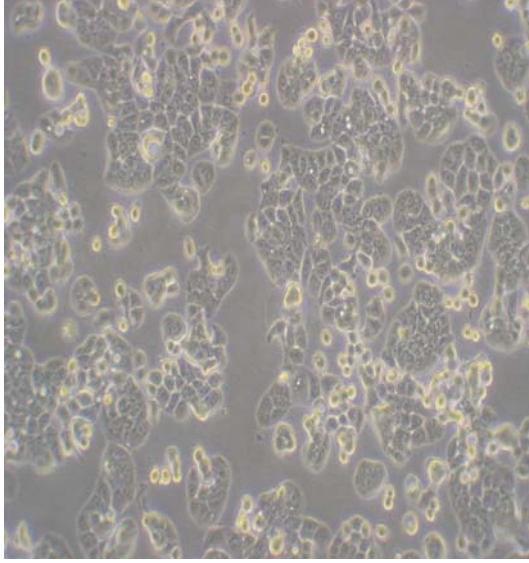
Biyokimyasal parametreler ile klinikopatolojik değişkenlerin korelasyon analizinde ise tümör çapı ile aktif MMP-9 ($p=0.024$ $r=0.393$) ve VEGF düzeyleri arasında ($p=0.009$ $r=0.454$) orta derecede anlamlı korelasyon saptandı.

Rektum endostatin protein düzeyleri ile klinikopatolojik değişkenler arasında ilişki incelendiğinde ise herhangi anlamlı bir ilişki saptanmadı. Aynı şekilde endostatin ile MMP-2, MMP-9 ve VEGF düzeyleri ile de anlamlı bir korelasyon saptanmadı.

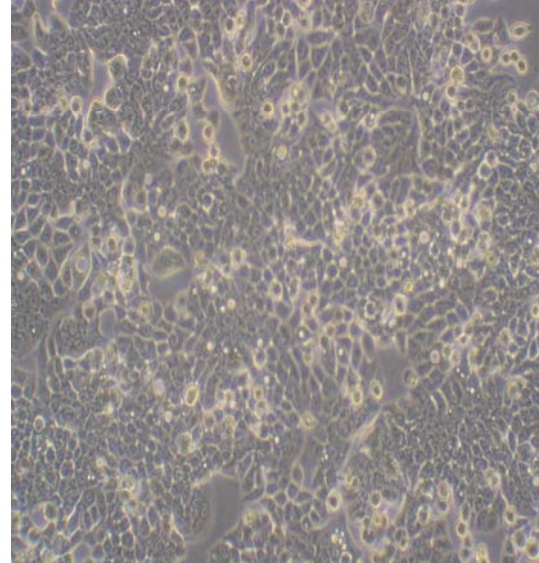
4.2. İN VİTRO DENEY SONUÇLARI

4.2.1. HT-29 Hücrelerinin Morfolojileri ile İlgili Gözlemler

HT-29 hücrelerinin ikilenme süreleri 40-60 saat arasında değişmekteydi. Adacıklar halinde çoğalıp hücre kültür kabının %80'nini kapladıklarında pasajlandılar. Çoğalmakta olan ve pasaja hazır HT-29 hücrelerinin morfolojilerine ilişkin görüntüler Şekil 32 ve Şekil 33'te gösterilmektedir.



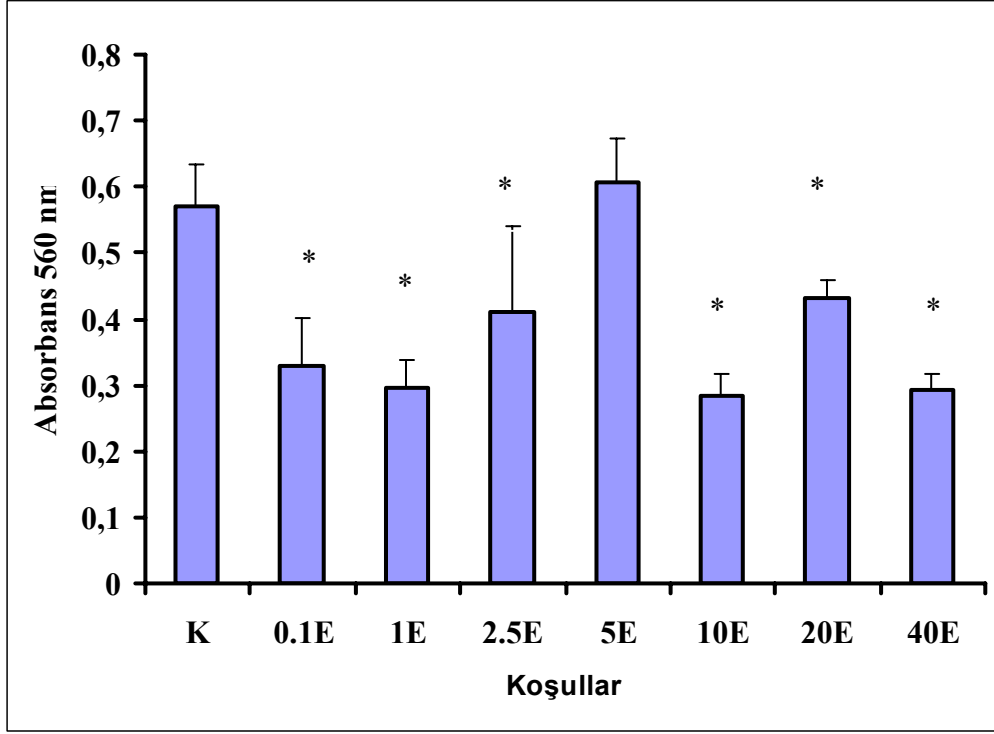
Şekil 32: Çoğalmakta olan HT-29 hücreleri



Şekil 33: Pasaja hazır HT-29 hücreleri

4.2.2. Rekombinant Endostatinin HT-29 Hücre Canlılığına Etkisi

MTT hücre canlılığı test bulguları Şekil 34'te gösterilmektedir. 0.1, 1, 2.5, 10, 20 ve 40 µg/ml endostatin ile 72 saat inkübasyona bırakılan HT-29 hücrelerinin canlılığı kontrol hücre grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Bununla birlikte, 5 µg/ml endostatin ile inkübasyona bırakılan HT-29 hücrelerinin canlılıkları ile kontrol grubu hücrelerin canlılıkları arasında anlamlı olarak fark gözlenmedi. Kontrol ile deney grupları karşılaştırıldığında elde edilen p değerleri Tablo 33'te gösterilmektedir. En düşük canlılık düzeyi 10 µg/ml endostatin ile 72 saat inkübasyona bırakılan HT-29 hücrelerinde gözlemlendi.



Şekil 34: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (K: Hücre Kontrol, 0.1E: 0.1 µg/ml endostatin, 1E: 1 µg/ml endostatin, 2.5E: 2.5 µg/ml endostatin, 5E: 5 µg/ml endostatin, 10E: 10 µg/ml endostatin, 20E: 20 µg/ml endostatin ve 40E: 40 µg/ml endostatin ile inkübasyona bırakılan deney gruplarını ve *: $p \leq 0.05$ vs K ifade etmektedir).

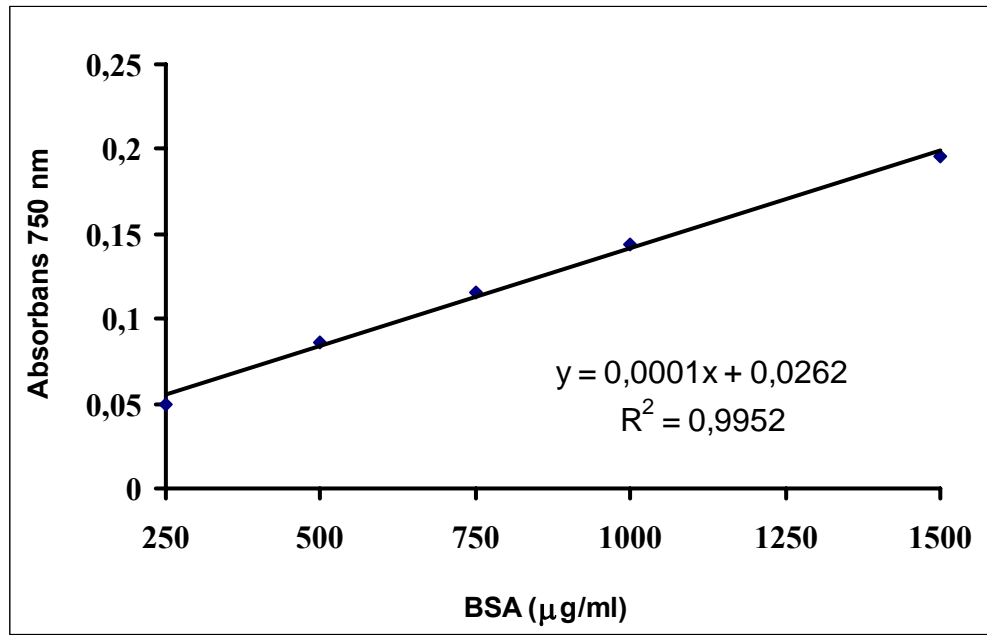
Tablo 33: Kontrol ve deney gruplarında canlılık yönünden anlamlılık düzeyleri

KOŞULLAR	p değerleri
K-0.1E	0.006
K-1E	0.004
K-2.5E	0.045
K-5E	0.333
K-10E	0.011
K-20E	0.006
K-40E	0.011

4.2.3. Rekombinant Endostatinin HT-29 Hücre Dizisinde MMP-2 ve TIMP-2 Üzerine Etkisi

4.2.3.1. Hücre Kültür Ortamı Protein Düzeyleri

Şekil 35’te gösterilen standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak kontrol ve deney grubu hücrelerin ortamlarındaki protein düzeyleri hesaplandı (Tablo 34).



Şekil 35: BSA standart kalibrasyon eğrisi

Her koşul için saptanan protein düzeyleri; jelatinaz aktivite düzeylerinin µg protein başına (AU/µg protein) ve TIMP-2 düzeylerinin ise mg protein başına oranlanması (ng/mg protein) için kullanıldı.

Tablo 34: Kontrol ve deney gruplarının ortalama protein düzeyleri

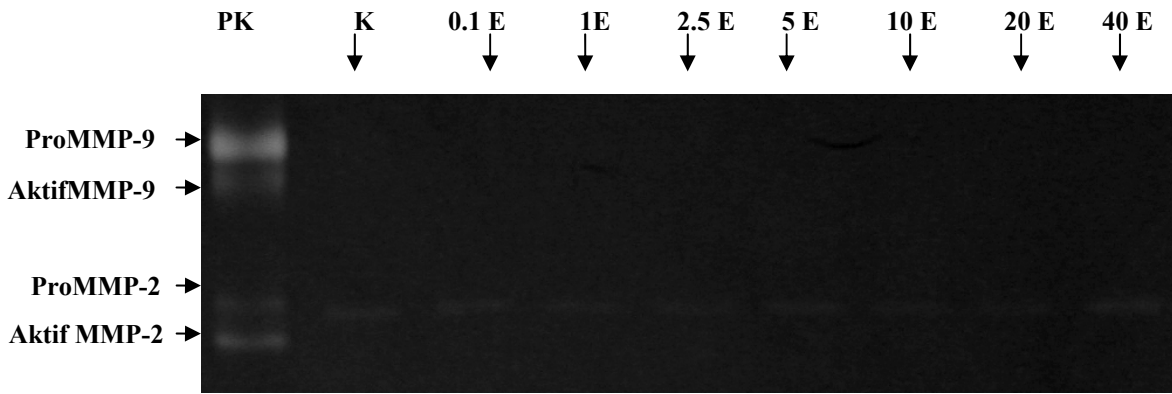
KOŞULLAR	Protein Düzeyleri ($\mu\text{g/ml}$)	p değerleri
Kontrol	736.3 \pm 69.4	
0.1E	666.3 \pm 88.4	0.333
1.0E	674.6 \pm 15.1	0.023
2.5E	654.6 \pm 94.2	0.125
5.0E	643.0 \pm 37.8	0.008
10E	454.6 \pm 83.6	0.004
20E	696.3 \pm 35.4	0.332
40E	673.0 \pm 152.8	0.127

† Kontrol vs deney grupları (Mann –Whitney U testi)

(K: Hücre Kontrol, 0.1E: 0.1 $\mu\text{g/ml}$ endostatin, 1E: 1 $\mu\text{g/ml}$ endostatin, 2.5E: 2.5 $\mu\text{g/ml}$ endostatin, 5E: 5 $\mu\text{g/ml}$ endostatin, 10E: 10 $\mu\text{g/ml}$ endostatin, 20E: 20 $\mu\text{g/ml}$ endostatin ve 40E: 40 $\mu\text{g/ml}$ endostatin ile inkübasyona bırakılan deney gruplarını ifade etmektedir.)

4.2.3.2. Rekombinant Endostatinin HT-29 Hücre Dizisinde MMP-2 Jelatinolitik Aktivitesine Etkisi

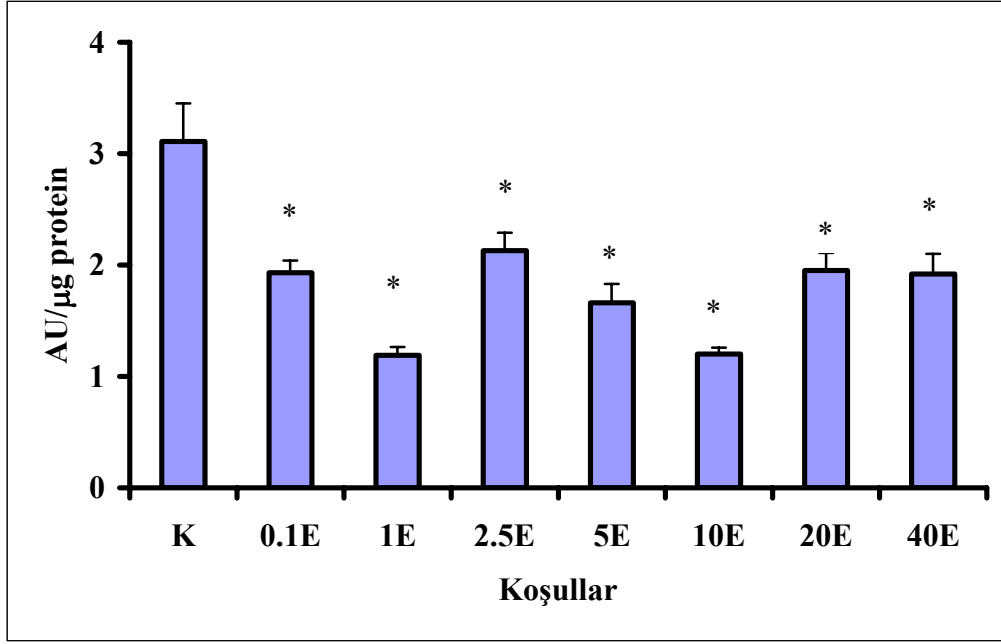
Şekil 20'deki akış şemasında belirtildiği şekilde farklı endostatin koşullarında kültüre edilen HT-29 hücrelerinden toplanan supernatantlarda jelatin zimografi yöntemi ile proMMP-2 saptandı. Bununla birlikte jelatinaz grubunun üyesi olan MMP-9 saptanmadı. ProMMP-2 bantlarının densitometrik analizi yapılarak litik alanların yoğunlukları hesaplandı (Şekil 36).



Şekil 36: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinde ProMMP-2 jelatinolitik aktivitesi üzerine etkisinin jelatin zimografi yöntemi ile incelenmesi

(PK: Pozitif Kontrol, K: Hücre Kontrol, 0.1E: 0.1 µg/ml endostatin, 1E: 1 µg/ml endostatin, 2.5E: 2.5 µg/ml endostatin, 5E: 5 µg/ml endostatin, 10E: 10 µg/ml endostatin, 20E: 20 µg/ml endostatin ve 40E: 40 µg/ml endostatin ile inkübasyona bırakılan deney gruplarını ifade etmektedir).

Hücre kontrol grubunda gözlenen proMMP-2 düzeylerinin, ortama endostatin eklenen tüm deney gruplarında dozdan bağımsız olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 37). Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$) (Tablo 35).



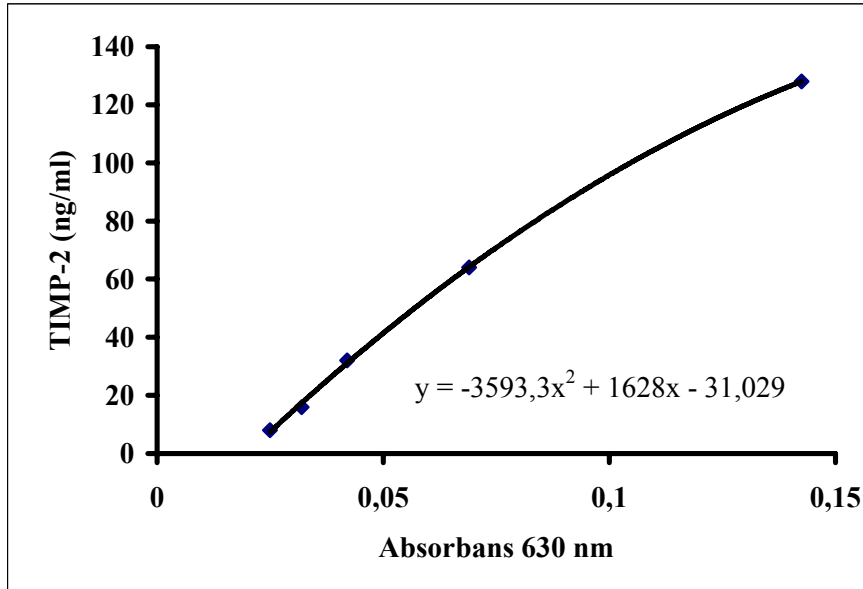
Şekil 37: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinde proMMP-2 jelatinolitik aktivite düzeylerine etkisi (K: Hücre Kontrol, 0.1 E: 0.1 µg/ml endostatin, 1 E: 1 µg/ml endostatin, 2.5 E: 2.5 µg/ml endostatin, 5E: 5 µg/ml endostatin, 10 E: 10 µg/ml endostatin, 20E: 20 µg/ml endostatin ve 40 E: 40 µg/ml endostatin ile inkübasyona bırakılan deney gruplarını ve *: $p \leq 0.05$ vs K ifade etmektedir).

Tablo 35: Kontrol ve deney gruplarında proMMP-2 jelatinolitik aktivite düzeyleri yönünden anlamlılık düzeyleri

KOŞULLAR	p değerleri
K-0.1E	0.004
K-1E	0.004
K-2.5E	0.004
K-5E	0.002
K-10E	0.004
K-20E	0.004
K-40E	0.004

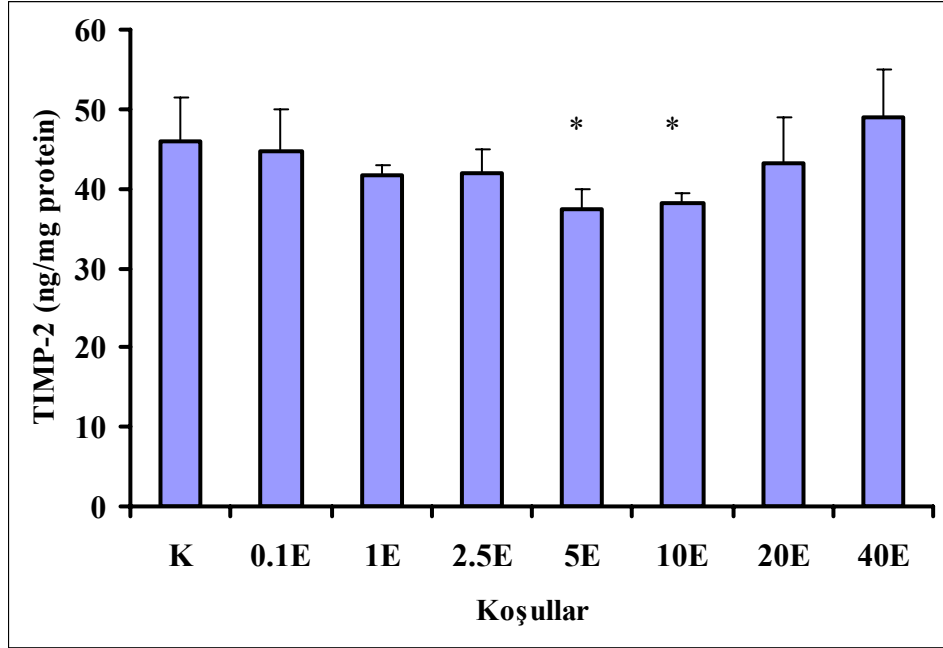
4.2.3.3. Rekombinant Endostatinin HT-29 Hücre Dizisinde TIMP-2 Düzeyine Etkisi

Hücre kontrol ve farklı konsantrasyonlarda endostatin eklenen deney gruplarında TIMP-2 protein düzeyleri, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan TIMP-2 standart proteini ile oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı (Şekil 38).



Şekil 38: TIMP-2 standart kalibrasyon eğrisi

5 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonunda endostatin eklenen deney gruplarında TIMP-2 düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (Şekil 39). (p=0.043; her iki koşul için). Bununla birlikte hücre kontrol TIMP-2 protein düzeyleri ile endostatin eklenen diğer gruplar arasında anlamlı olarak fark gözlenmedi.

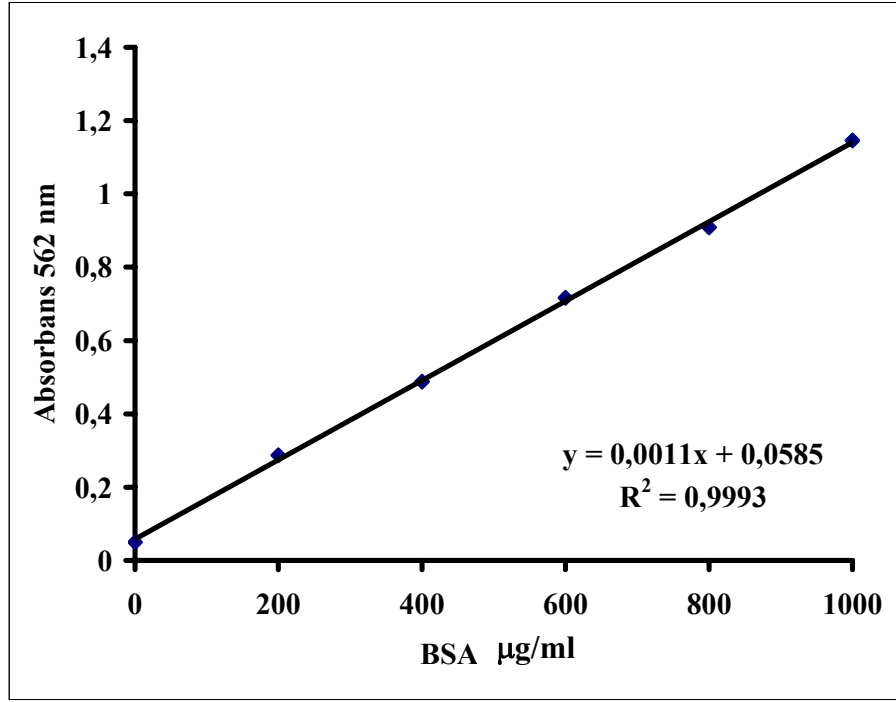


Şekil 39: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinde TIMP-2 düzeylerine etkisi (K: Hücre Kontrol, 0.1E: 0.1 µg/ml endostatin, 1E: 1 µg/ml endostatin, 2.5E: 2.5 µg/ml endostatin, 5E: 5 µg/ml endostatin, 10E: 10 µg/ml endostatin, 20E: 20 µg/ml endostatin ve 40E: 40 µg/ml endostatin ile inkübasyona bırakılan deney gruplarını *: p≤0.05 vs K ifade etmektedir ifade etmektedir).

4.2.4. Rekombinat Endostatinin HT-29 Hücre Dizisinde MT-1 MMP Üzerine Etkisi

4.2.4.1. Protein Düzeyleri

Şekil 40'da gösterilen standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak kontrol ve deney grubu hücre lizatı protein düzeyleri hesaplandı (Tablo 36).



Şekil 40: BSA standart kalibrasyon eğrisi

Tablo 36: Kontrol ve deney gruplarında hücre lizatı ortalama protein düzeyleri

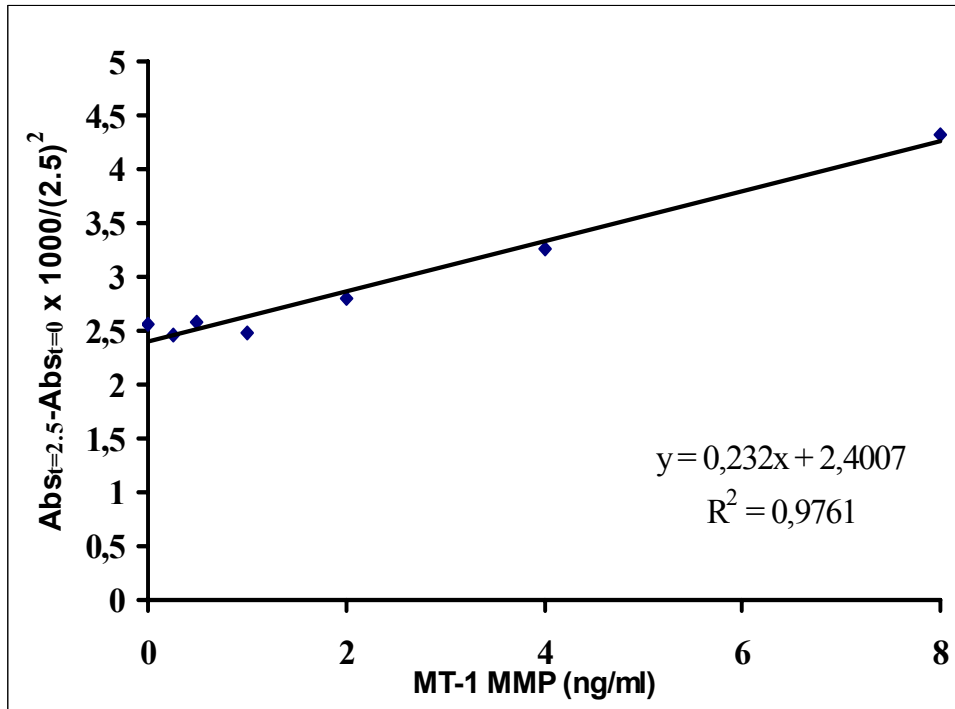
KOŞULLAR	Protein Düzeyleri (µg/ml)	p değerleri
K	292.6 ± 9.6	
K-0.1E	120.0 ± 3.0	0.050
K-1E	127.5 ± 4.5	0.050
K-2.5E	89.6 ± 2.1	0.037
K-5E	124.5 ± 3.5	0.050
K-10E	113.0 ± 2.7	0.037
K-20E	160.3 ± 19.5	0.050
K-40E	158.0 ± 13.0	0.050

*: $p \leq 0.05$ vs K ifade etmektedir.

Her koşul için hesaplanan protein değerleri MT-1 MMP aktivite düzeylerinin mg protein başına oranlanması (ng/mg protein) için kullanıldı.

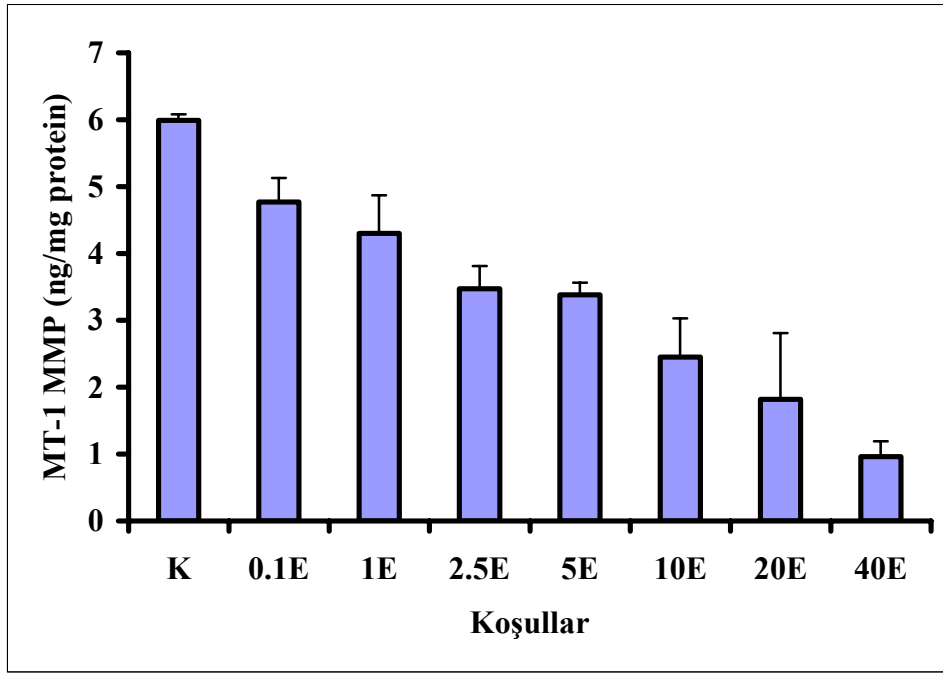
4.2.4.2. Rekombinant Endostatinin MT-1 MMP Aktivitesine Etkisi

Hücre kontrol ve farklı konsantrasyonlarda endostatin eklenen deney gruplarında aktif MT-1 MMP protein düzeyleri Şekil 41'deki standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 41: MT-1 MMP standart kalibrasyon eğrisi

Elde edilen MT-1MMP analiz bulgularına göre, hücre kontrol grubunda gözlenen aktif MT-1 MMP düzeyleri, ortama farklı konsantrasyonlarda endostatin eklenmesi ile azaldı. (Şekil 42). Bununla birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Kontrol vs her deney grubu için p=0.121).

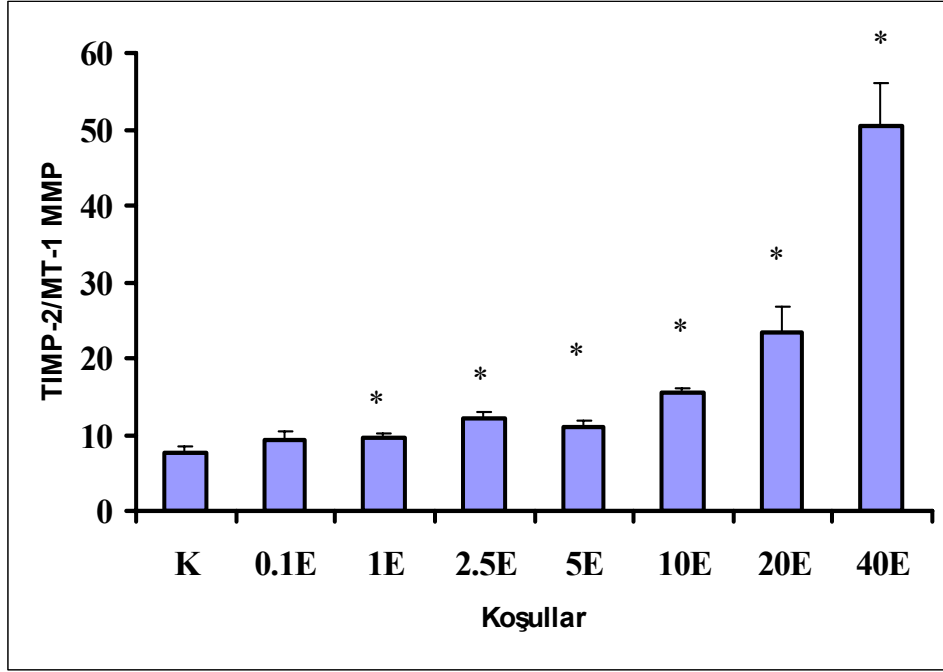


Şekil 42: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinde MT-1 MMP düzeylerine etkisi (K: Hücre Kontrol, 0.1E: 0.1 µg/ml endostatin, 1E: 1 µg/ml endostatin, 2.5E: 2.5 µg/ml endostatin, 5E: 5 µg/ml endostatin, 10E: 10 µg/ml endostatin, 20E: 20 µg/ml endostatin ve 40E: 40 µg/ml endostatin ile inkübasyona bırakılan deney gruplarını ifade etmektedir).

4.2.5. Rekombinant Endostatinin HT-29 Hücre Dizisinde TIMP-2/MT-1 MMP Oranına Etkisi

Hücre kontrol ve tüm deney grupları için MMP-2 nin endojen inhibitör ve aktivatör protein oranları hesaplandı. Bunun için tüm deney koşulları için elde edilen TIMP-2 değerleri MT-1 MMP değerlerine oranlandı.

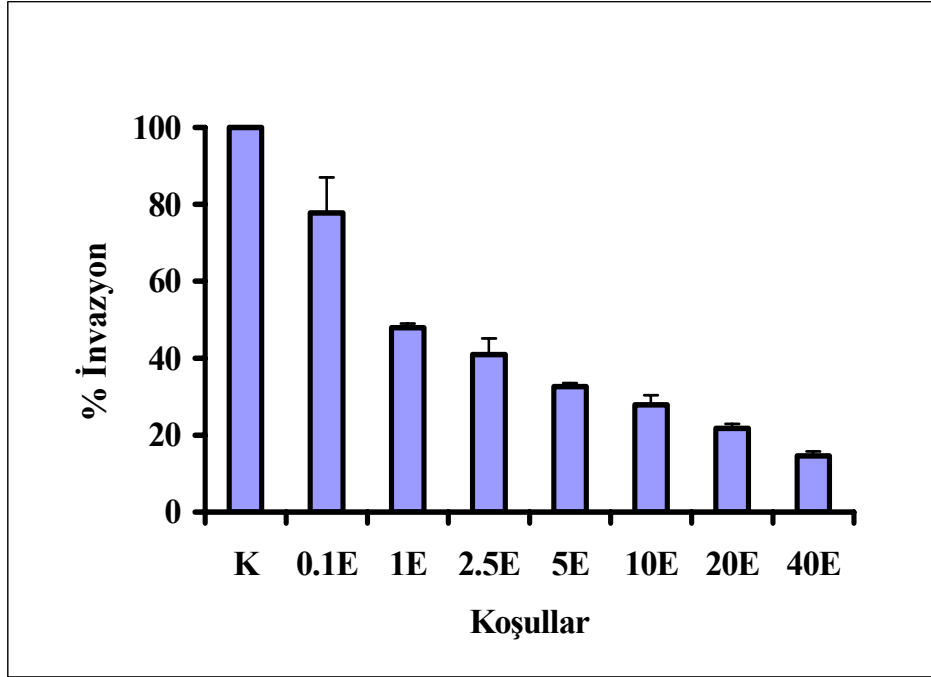
Hücre kontrol grubu TIMP-2/MT-1MMP oranının, deney grupları ile karşılaştırıldığında arttığı gözlemlendi. Bu artış 1 µg/ml, 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml ve 40 µg/ml endostatin eklenen deney grupları için istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.050$) (Şekil 43).



Şekil 43: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinde TIMP-2/MT-1 MMP oranına etkisi. (K: Hücre Kontrol, 0.1E: 0.1 µg/ml endostatin, 1E: 1 µg/ml endostatin, 2.5E: 2.5 µg/ml endostatin, 5E: 5 µg/ml endostatin, 10E: 10 µg/ml endostatin, 20E: 20 µg/ml endostatin ve 40 E: 40 µg/ml endostatin ile inkübasyona bırakılan deney gruplarını *: $p \leq 0.05$ vs K ifade etmektedir).

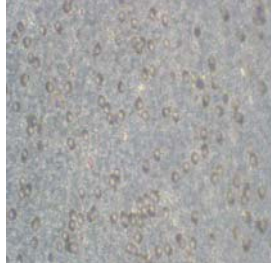
4.2.6. Rekombinant Endostatinin HT-29 Hücre İnvazyonuna Etkisi

Hücre kontrol ile 0.1, 1, 2.5, 10, 20 ve 40 µg/ml endostatin ile 72 saat inkübasyona bırakılan HT-29 hücrelerin invazyon yetenekleri incelendiğinde; hücre kontrol grubuna göre tüm deney gruplarındaki hücrelerin invazyon yeteneklerinin azaldığı gözlemlendi. Fakat bu azalma istatistiksel değerlendirilmede anlamlı saptanmadı. Hücre kontrol vs her deney grubu için p değeri 0.121 olarak saptandı. Her koşuldaki % invazyon Şekil 44'de gösterilmektedir. Ayrıca analiz sırasında boyanmış invaze hücre görüntüleri de Şekil 45'de verilmektedir.

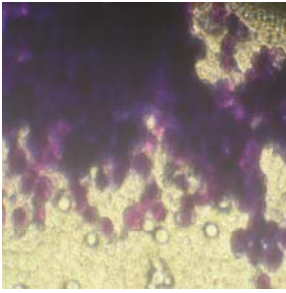


Şekil 44: Rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinin invazyonuna etkisi (K: Hücre Kontrol, 0.1 E: 0.1 µg/ml endostatin, 1 E: 1 µg/ml endostatin, 2.5 E: 2.5 µg/ml endostatin, 5E: 5 µg/ml endostatin, 10 E: 10 µg/ml endostatin, 20E: 20 µg/ml endostatin ve 40 E: 40 µg/ml endostatin ile inkübasyona bırakılan deney gruplarını ifade etmektedir).

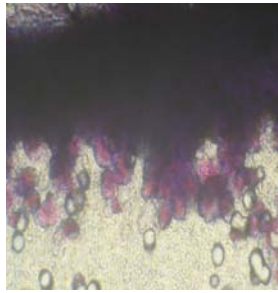
Negatif kontrol (Hüresiz kuyucuk)



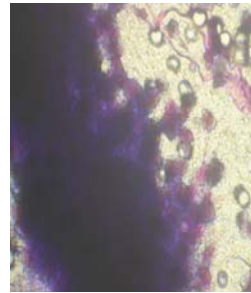
Hücre Kontrol



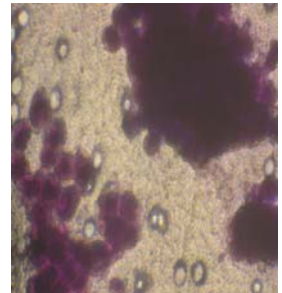
0.1 µg/ml Endostatin



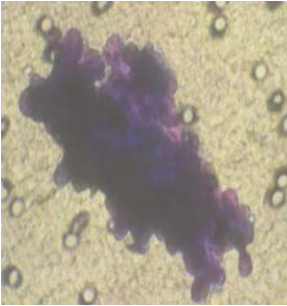
1 µg/ml Endostatin



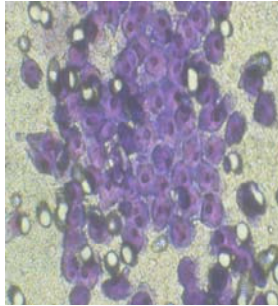
2.5 µg/ml Endostatin



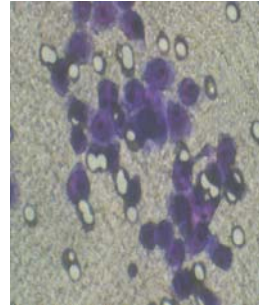
5 µg/ml Endostatin



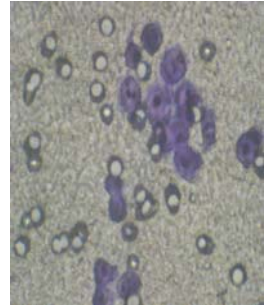
10 µg/ml Endostatin



20 µg/ml Endostatin



40 µg/ml Endostatin



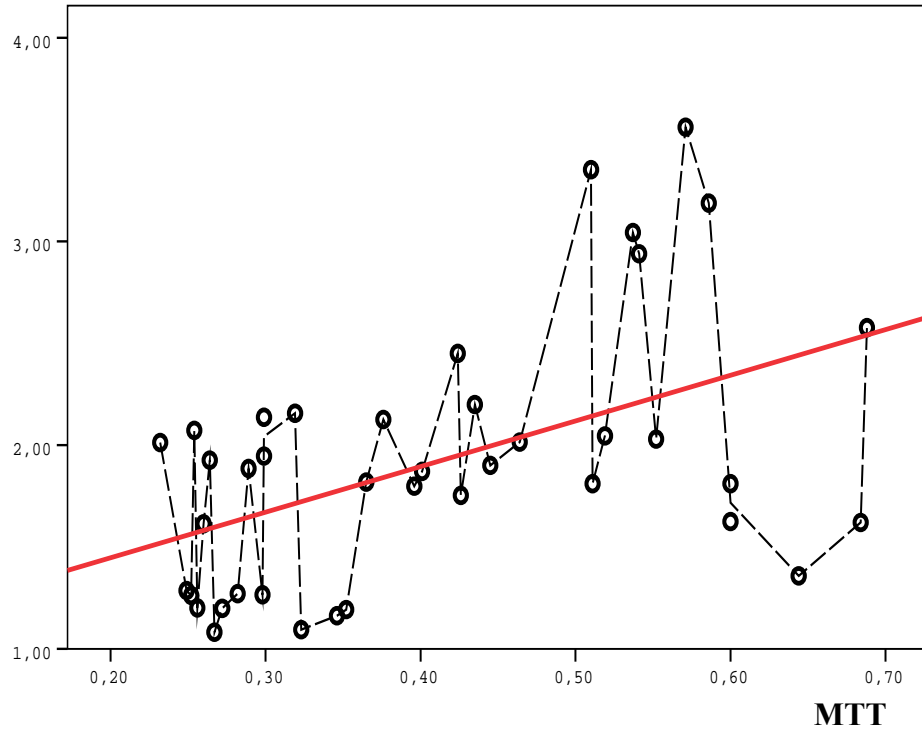
Şekil 45: İnvazyon deneyinde kontrol ve deney gruplarına ait mikroskopik görüntüler

4.2.7. Biyokimyasal Parametreler Arasındaki Korelasyonlar

4.2.7.1. ProMMP-2 Jelatinolitik Aktivite Düzeyi ile Hücre Canlılığı Arasındaki Korelasyon

ProMMP-2 jelatinolitik aktivite düzeyi ile MTT canlılık oranı arasında olumlu, orta derecede anlamlı bir korelasyon bulundu ($p=0.007$ ve $r = .423$). ProMMP-2 jelatinolitik aktivite düzeyi ile MTT canlılık oranı arasındaki korelasyon grafiği ve regresyon doğrusu Şekil 46'da gösterilmektedir.

ProMMP-2

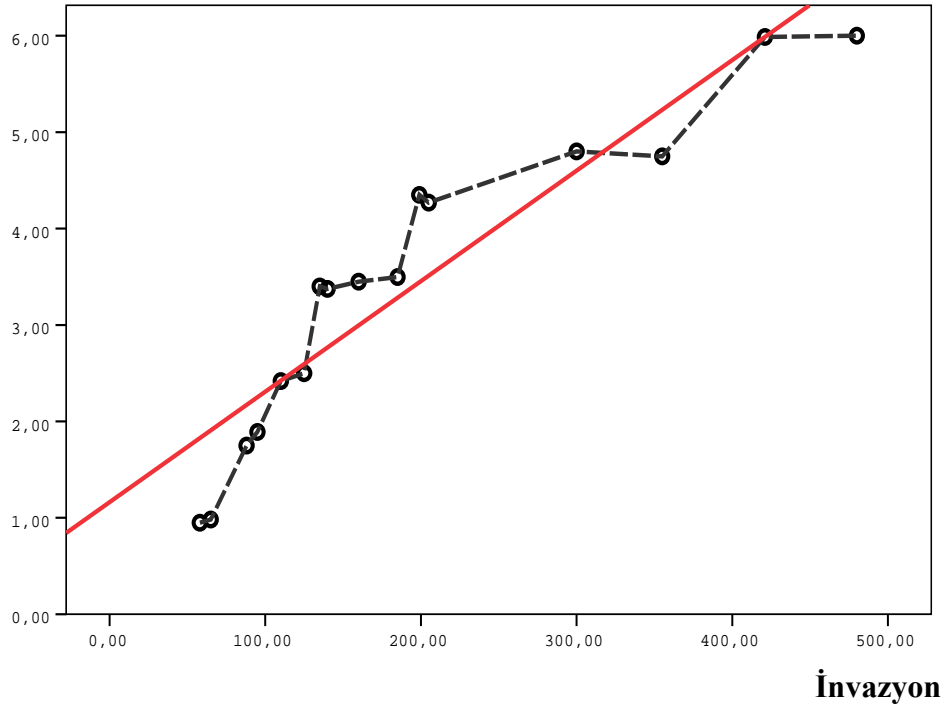


Şekil 46: ProMMP-2 aktivite düzeyi ve canlılık arasındaki korelasyon grafiği ve regresyon doğrusu

4.2.7.2. Aktif MT-1 MMP Düzeyi ile İnvazyon Arasındaki Korelasyon

Aktif MT-1 MMP Düzeyi ile invazyon arasında pozitif yönde çok güçlü bir korelasyon bulundu ($p=0.000$ ve $r = .991$). Aktif MT-1 MMP düzeyi ile invazyon arasındaki korelasyon grafiği ve regresyon doğrusu Şekil 47’de gösterilmektedir.

MT-1 MMP

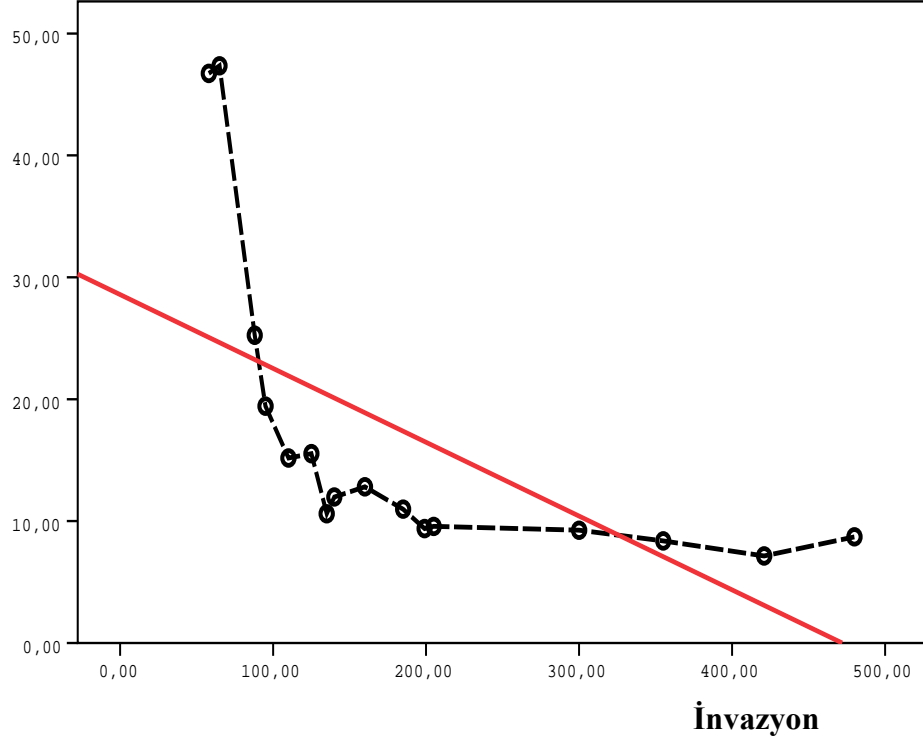


Şekil 47: MT-1 MMP aktivite düzeyi ile invazyon arasındaki korelasyon grafiği ve regresyon doğrusu

4.2.7.3. TIMP-2/MT-1 MMP Oranı ile İnvazyon Arasındaki Korelasyon

TIMP-2/MT-1 MMP oranı ile invazyon arasında ters yönde çok güçlü anlamlı bir korelasyon bulundu ($p=0.000$ ve $r = -.962$). TIMP-2/MT-1 MMP oranı ile invazyon arasındaki korelasyon grafiği ve regresyon doğrusu Şekil 48’de gösterilmektedir.

TIMP-2/MT-1 MMP



Şekil 48: TIMP-2/MT-1 MMP oranı ile invazyon arasındaki korelasyon grafiği ve regresyon doğrusu

BEŞİNCİ BÖLÜM

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada kolon ve rektum kanserleri olarak ayrı iki homojen grubun tümör ve eşlenik dokularında MMP-2 ve MMP-9 aktivite düzeylerini, TIMP-2, MT-1 MMP, VEGF ve endostatin düzeylerini inceleyerek, tümör dokusu parametreleri ile klinikopatolojik değişkenler arasındaki ilişkileri araştırdık. İn vitro deneyler ile de rekombinat endostatinin ticari olarak sağlanan insan kolon adenokarsinoma hücrelerinde (HT-29), direkt olarak tümör hücre invazyonu üzerine olası etkisinin, MMP-2 ve MT1-MMP aktivitesinde meydana getireceği olası inhibisyon özellikleri ile ilişkilendirerek araştırdık. Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulguları; doku ve in vitro deneyler ile ilgili bulgular olmak üzere iki başlık altında tartışacağız.

Doku çalışmalarımız:

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, 50 kolon tümör dokusunda pro ve aktif MMP-2'nin ve aktif MMP-9'un aktivite düzeyleri, eşlenik normal doku aktivite düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$). Kolon tümör MT-1 MMP protein düzeyi, eşlenik normal doku MT-1 MMP protein düzeylerine göre yaklaşık 3 kat yüksek olarak bulunmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Kolon tümör dokusu TIMP-2, endostatin ve VEGF düzeyleri, eşlenik normal doku düzeylerinden farklı değildi. Kolon tümör dokusu parametreleri ile klinikopatolojik değişkenler arasındaki ilişkiyi incelediğimizde ise aktif MMP-9 ile tümör invazyon derinliği "pT1-2 vs pT3-4" ve uzak metastaz varlığı arasında anlamlı ilişki saptandı ($p<0.05$)

34 rektum tümör dokusunda hem MMP-2'nin hem de MMP-9'un aktivite düzeyleri, eşlenik normal doku aktivite düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$). Rektum tümör MT-1 MMP düzeyi, eşlenik normal doku MT-1 MMP protein düzeylerine göre daha yüksek bulunmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Rektum tümör TIMP-2, endostatin ve VEGF düzeyleri eşlenik normal doku düzeylerinden farklı değildi. Rektum tümör dokusu parametreleri ile klinikopatolojik değişkenler arasındaki ilişkiyi incelediğimizde ise aktif MMP-9, aktif MMP-9/ProMMP-9 oranı (rMMP-9) ve aktif MMP-2/ProMMP-2 oranı (rMMP-2) ile tanı anı metastaz ve perinöral invazyon varlığı arasında; proMMP-9 ve proMMP-2 ile lenf nodu metastazı

arasında, TIMP-2 düzeyleri ile nüks varlığı arasında ve VEGF düzeyleri ile perinöral invazyon varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p<0.05$). Ayrıca rektum tümör çapı ile VEGF düzeyleri ($p=0.009$ $r=0.454$) ve aktif MMP-9 arasında orta derecede anlamlı korelasyon ($p=0.024$ $r=0.393$) belirlendi.

ECM'nin MMP'ler tarafından degradasyonu kanser hücrelerinin ilerlemesi için kısıtlılık yaratan fiziksel bariyerlerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. İnvazyon ve metastaz aşamaları içerisinde ECM'nin aşırı yıkımı, bu sürecin en belirgin özellikleri arasındadır (13). Bu enzimlerin aktivitesi ekstrasellüler olarak düzenlenmekte ve pro-enzim aktivasyonu ile doku inhibitör proteinleri arasındaki dengeye dayanmaktadır (62). Kanser hücrelerinin invazyonu için bazal membranın (BM) lamina densa ve lamina fibroretikularis katmanlarının proteolizi zorunlu bir basamaktır. Tip IV kollajen, lamina densanın başlıca bileşenlerinden biridir ve başlıca MMP-2 ve MMP-9 tarafından proteolitik olarak yıkılmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, MMP-2 ve MMP-9'un aşırı ekspresyonunun meme, prostat, akciğer, melanoma, baş-boyun ve beyin tümörlerinin progresyonundaki rolleri vurgulanmaktadır (63).

Literatür incelendiğinde kolorektal kanserde; MMP-2, MMP-9 ve bunların regülasyonlarında görevli inhibitör proteinlerin TIMP-2, TIMP-1 ve aktivatör proteinlerin MT-1 MMP'nin ekspresyonlarına ve prognostik anlamları üzerine yapılan birçok çalışmanın mevcut olduğu görülmektedir (9, 10, 64, 65). Bu çalışmalarda kolorektal tümörler kolon ve rektum olarak ayırılmaksızın bir bütün olarak ele alınmıştır. Yapılan bu çalışmalardan elde edilen veriler arasında uyumsuz sonuçların da bulunması dikkat çekicidir.

Yapılan bu çalışmalarda MMP-2 mRNA'sının kolorektal kanser dokusunda normal dokuya göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (66, 61, 67, 68, 69, 70). Bununla birlikte MMP'lerin prognostik anlamlarını inceleyen çalışmalar ise tartışmalıdır. Heslin ve arkadaşları MMP-2 ve MMP-9 mRNA'sının tümör büyüklüğü veya evresi ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir (70). Yine Ring ve arkadaşları 212 kolorektal tümörlü örnek grubunda gerçekleştirdikleri çalışmada kolorektal tümör dokusunda artan MMP-2 ve MMP-9'un klinikopatolojik değişkenler ile ilişkisini gösterememişlerdir (71). Pesta ve arkadaşları da 38 kolorektal tümör örneğinde gerçekleştirdikleri çalışmada kolorektal tümörlerde yüksek bulunan MMP-2 mRNA'sının klinikopatolojik değişkenlerle ilişkisini tanımlayamamışlardır (72). Bu bulgular Tutton ve arkadaşlarının bulguları ile benzerdir (73). Bu çalışmalara zıt olarak Sis ve arkadaşlarının immünohistokimyasal yöntem kullanarak gerçekleştirdikleri

çalışma sonucunda, yüksek MMP-2 ekspresyonu ile lenf damar invazyonu ve tümör evresi arasında ilişki olduğu bildirilmektedir (74). Zeng ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise yüksek MMP-9 ekspresyonunun kolorektal tümörlerde kısa sağkalım ile ilişkisi vurgulanırken (75), İşlekel ve arkadaşları 43 kolorektal tümörde gerçekleştirdikleri çalışmada yüksek MMP-9 protein düzeylerinin perinöral invazyon ile korele olduğunu bildirmektedirler (76). 73 kolorektal tümör ve eşlenik normal dokuda MMP-2 ve MMP-9 aktivitesini araştıran diğer bir çalışmada ise MMP-2'nin evre ve uzak metastaz ile ilişkisi gösterilirken, MMP-9 aktivitesinin klinikopatolojik değişkenlerin hiçbiri ile ilişkisi gösterilmemiştir (77).

TIMP-2 ile ilgili çalışmalar da tartışmalı olarak devam etmektedir. TIMP-2 mRNA'sının tümörlü dokuda düşük olduğunu bildiren çalışmaların yanında (68, 78) bu bulgulara zıt olarak TIMP-2 mRNA'sının tümörlü dokuda normal dokuya göre daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (72). Bu bulguya paralel olarak da Jung ve arkadaşları kolorektal tümörlerdeki yüksek TIMP-2'nin lenfatik invazyon ve lenf nodu metastazı ile ilişkisini bildirmektedirler (79).

MT-1 MMP ekspresyonuna ilişkin çalışmalarda kolorektal tümörlü dokuda MT-1 MMP ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir (80). Malhotra ve arkadaşları MT-1 MMP ekspresyonunun karsinoma *in situ*'dan adenomaya geçişte arttığını, bu artışın rekürrens ve prognoz ile ilişkili olmadığını bildirmektedir (81). Bununla birlikte Ngan ve arkadaşları yüksek MT-1 MMP ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğunu savunmuşlardır (82). Ayrıca Bendardaf ve arkadaşları ise düşük MT-1 MMP ekspresyonu ile daha uzun sağkalım arasında ilişki saptamışlardır (83).

Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler arasında uyumsuz sonuçların bulunması, bu enzimlerin ve ilgili düzenleyici proteinlerin mRNA, protein ve aktivite seviyelerinde incelenmek üzere farklı teknikler ile değerlendirilmesi, bu noktada farklı sınır değerlerinin kullanılması ve çalışmaların kendi içinde homojen olmayan hasta gruplarında yürütülmesine bağlı sebepler ile açıklanabilir. Ayrıca kolon ve rektumun birbirinden farklı doğası da bu sebeplerin başında yer almaktadır.

Kolon ve rektum kanserlerinin gelişim mekanizmalarına ilişkin literatür incelediğinde bu mekanizmaların farklı olduğunu destekleyen çalışmalar olduğu görülmektedir. Kapitejin ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada kolon tümörlerinde β -katenin ve p53

ekspresyonlarının rektum kanserlerine göre daha fazla olduğu bildirilmektedir (11). Yine aynı çalışmada, p53 ekspresyonundaki bu fazlalığın yüksek oranda p53 mutasyonlarıyla ilişkili olabileceği de savunulmaktadır. Bu mutasyon oranının kolon kanserinde daha yüksek olması ise farklı bakteriyel flora ve uzun geçiş zamanının fekal akışta potansiyel karsinojenler arasındaki etkileşimi değiştirebileceği yönünde düşünülmektedir. Konishi ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada da sol kolon ve rektumda mukozal lezyonların invaziv kanserlere ilerlemesini sağlayan mekanizmaların varlığından söz edilirken (12), sağ kolonda tam aksine bu ilerlemeyi baskılayabilen mekanizmaların var olduğu savunulmaktadır (84, 85, 86). Yine bu çalışmalarda kolon ve rektum kanserlerinin klinik davranışının birbirinden farklı olduğu; rektal kanserlerde en büyük problemin lokal rekürrens iken, kolon kanserlerinde ise uzak metastaz olduğundan söz edilmektedir (11). Yine Kapitejin ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmanın sonucu olarak rektal kanser tanısı almış hasta popülasyonunda erkek hasta sayılarının kolon kanseri tanısı almış hasta popülasyonundan daha fazla olduğu bildirilmektedir (11). Bu anlamda etyolojik faktörlerin ve moleküler mekanizmaların kolon ve rektum tümörlerini birbirlerinden farklı kıldığına yönelik görüşler birbirini desteklemektedir.

Jelatinaz düzeylerine yönelik bugüne kadar gerçekleştirilmiş çalışmaların çoğu kolorektal tümör grubunda gerçekleştirilmiş olmasına rağmen (10, 9, 76, 72) son yıllarda yapılan birkaç çalışmada kolon ve rektum tümörlerinin gelişim mekanizmalarının farklılığından kaynaklanan sebeplerden dolayı kullanılan parametreler ile klinikopatolojik değişkenler arasındaki korelasyonların klinik uygunluklarının doğruluğu açısından hasta gruplarının kolon ve rektum olarak ayrılması gerektiği görüşü önem kazanmıştır (87, 82, 88, 89).

Biz de bu görüşü savunarak, gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada 50 kolon ve 34 rektum tümörü teşhisi alan hastaları total kolorektal olarak değil, kendi içinde homojen olan ayrı iki grup olarak değerlendirdik. MMP-2 aktivasyon düzeyini, MMP-2' nin endojen inhibitör proteini TIMP-2, aktivatör proteini MT-1 MMP ve anjiogenez regülasyonunda rol oynayan anjiogenik potansiyeli yüksek olan VEGF ve anjiogenez inhibitörü endostatinin protein düzeyini her iki tip tümörde ayrı ayrı araştırdık ve bu parametrelerin klinikopatolojik değişkenler ile ilişkisini tanımladık. MMP-2 aktivasyon düzeyini değerlendirmek için kullandığımız jelatin zimografi yöntemi aynı zamanda MMP-9 aktivasyon düzeyini de değerlendirmeyi mümkün kılmaktadır. Bu nedenle hem kolon hem rektum tümör dokusu MMP-9 aktivasyonuna ilişkin elde ettiğimiz bulguları da değerlendirmenin literatüre

zenginlik getireceği sonucuna vardık. Her biyokimyasal parametre ile klinikopatolojik değişkenler arasında (Cinsiyet, yaş, histopatolojik tip, diferansiyasyon, tanı anı metastaz, uzak metastaz, lenf nodu metastazı, tümör evreleri, nüks, lenfatik, perinöral ve vasküler invazyon) anlamlı ilişki bulunup bulunmadığını araştırdık. Bununla birlikte parametrelerin sağkalım üzerinde etkili olup olmadığına yönelik sağ kalım analizinin hastaların izlem süreleri tamamlandığında araştırılması planlanmaktadır. Yine parametrelerin kolon ve rektum tümörleri düzeyleri arasındaki farklılığı araştırmak hedeflerimiz arasında olmadığı için buna ilişkin istatistiksel analiz yapılmadı. Bu anlamda ayrı ayrı kolon ve rektum tümörlerinde MMP-2, MMP-9, TIMP-2, MT-1 MMP düzeylerine ilişkin literatür incelendiğinde oldukça kısıtlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir.

50 kolon tümör dokusunda pro ve aktif MMP-2'nin ve aktif MMP-9'un aktivite düzeylerini, eşlenik normal doku aktivite düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulduk. Roeb ve arkadaşlarının 20 kolon tümör örneği ile gerçekleştirdikleri çalışmada, kolon tümör dokusunda MMP-9 aktivitesi normal dokuya göre anlamlı olarak yüksek, MMP-2 aktivitesinin ise tümör ve eşlenik normal dokularında farklı olmadığı bildirilmektedir (90). Çalışmamızda MMP-9'a ilişkin saptadığımız bulgular bu literatür ile uyumludur. Bununla birlikte MMP-2'nin hem pro hem de aktif formlarını eşlenik normal dokuya göre anlamlı olarak yüksek saptamamız ve bu bulguyu destekleyici olarak tümör aktif MMP-2/ProMMP-2 oranının da eşlenik normal dokuya göre yüksek bulunması, Roeb ve arkadaşlarının çalışmasının MMP-2'ye ilişkin bulgularından farklılık göstermektedir. Tae-Dong Kim ve arkadaşlarının 12 kolon tümör örneği ile gerçekleştirdikleri diğer çalışmada ise bizim bulgularımızı destekleyici yönde hem MMP-2 hem de MMP-9 aktivite düzeylerinin tümör dokularında eşlenik normal dokuya göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmektedir (13). Her iki çalışmada da klinikopatolojik değişkenler ile korelasyon analizi yapılmamıştır. Bununla birlikte, yukarıda sözü edilen literatürlere göre daha fazla örnek sayısı ile gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada tümör dokusu parametreleri ile klinikopatolojik değişkenler arasındaki ilişki de incelenmiştir. Kapitejin ve arkadaşları kolon kanserlerinde en büyük problemi, uzak metastaz olarak tanımlanmaktadır (11). Bu anlamda çalışmamızda kolon tümör dokusu aktif MMP-9 ile tümör invazyon derinliği "pT1-2 vs pT3-4" ve uzak metastaz arasında saptadığımız korelasyon bulguları, Kapitejin ve arkadaşlarının literatürü ile desteklenmekte ve sadece kolon kanser progresyonu ve jelatinazların ilişkilendirildiği ve ilişkilendirileceği yeni çalışma sonuçlarının tartışılmasına yönelik literatüre zenginlik

katacağını düşünmekteyiz. Bununla birlikte kolon tümör MMP-2 aktivite düzeyine ilişkin herhangi bir klinikopatolojik değişken ile anlamlı ilişki saptamadık. Hilska ve arkadaşları tarafından oldukça geniş örnek grubu (233 kolon ve 118 rektum tümörü) ile yapılan çalışmada MMP-1, 2, 7 ve 13 ile TIMP-1, 2, 3 ve 4 ekspresyonları immünohistokimyasal olarak değerlendirilerek bu parametrelerin prognostik önemi araştırılmış ve sağ kalım analizleriyle ilişkilendirilmiştir (87). Literatürde ilk kez bu çalışmada, yüksek MMP-2 ekspresyonun kolon tümörlü hastalarda kısa sağkalımda önemli rol oynayabileceği görüşü ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte bu çalışmada aktif MMP-2'ye ilişkin herhangi bir bilgi mevcut değildir. Araştırmacılar bu durumu, tercih ettikleri immünohistokimyasal yöntemde MMP-2'ye karşı kullanılan antikoron, aktif MMP-2'yi tanıma yeteneğinde olmadığı şeklinde açıklamaktadırlar.

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, 34 rektum tümör dokusunda hem MMP-2' nin hem de MMP-9'un aktivite düzeyleri, eşlenik normal doku aktivite düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Rektum tümör MT-1 MMP düzeyi, eşlenik normal doku MT-1 MMP protein düzeylerine göre daha yüksek bulunmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Yine rektum tümör TIMP-2, endostatin ve VEGF düzeyleri eşlenik normal doku düzeylerinden farklı değildi. Rektum tümör dokusu parametreleri ile klinikopatolojik değişkenler arasındaki ilişkiyi incelediğimizde ise aktif MMP-9, aktif MMP-9/Pro MMP-9 oranı (rMMP-9), aktif MMP-2/ProMMP-2 (rMMP-2) ile tanı anı metastaz ve perinöral invazyon varlığı arasında; proMMP-9 ve proMMP-2 ile lenf nodu metastazı arasında, TIMP-2 düzeyleri ile nüks varlığı arasında anlamlı ilişki saptadık ($p<0.05$). Çalışmamızın bulguları, Tae-Dong Kim ve arkadaşları tarafından 10 rektal tümör örneğinde MMP-2 ve MMP-9 aktivite düzeylerinin jelatin zimografi ile değerlendirildiği çalışmanın bulguları ile yöntemlerden kaynaklanan yorum farklılıkları olmaksızın uyumludur (13). Bununla birlikte Roeb ve arkadaşlarının yine 10 rektal tümör örneğinde gerçekleştirdikleri çalışmada ise MMP-2, MMP-9 ekspresyonu ve aktivasyonuna ilişkin rektum tümör dokuları ve eşlenik normal dokular arasında farklılık saptanmamıştır (90). Her iki çalışmada da klinikopatolojik değişkenler ile korelasyon analizi yapılmamıştır (13, 90). Schwander ve arkadaşlarının 94 rektal tümör örneği ile gerçekleştirdikleri diğer bir çalışmada ise MMP-2, MT-1 MMP ve TIMP-2 imünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir (88). MMP-2 ekspresyonunun rektal tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre anlamlı olarak daha fazla olduğu ve bunun da invazyon derinliği ile korele olduğu bildirilmektedir (88).

Çalışmamızda aktif MMP-2/ProMMP-2 (rMMP-2) ile tanı anı metastaz varlığı ve proMMP-2 ile lenf nodu metastaz varlığı arasında gösterdiğimiz korelasyon bu anlamda orjinaldir. Yine aynı çalışmada rektal tümörlerde MT-1 MMP'nin daha yüksek olduğu fakat bunun klinikopatolojik değişkenler ile korele olmadığı bildirilmektedir. Çalışmamızda rektal tümör MT-1 MMP düzeyi eşlenik normal dokulara göre daha yüksekti fakat istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. Aynı zamanda klinikopatolojik değişkenler ile de korelasyon bulunmadı. Yine aynı çalışmada TIMP-2 düzeylerinin tümörlü dokuda daha yüksek ve TIMP-2 fonksiyonuna zıt olarak invazyon derinliği ile korele olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte bizim çalışmamızda rektal tümör TIMP-2 düzeyi, eşlenik normal dokuya göre yüksek olarak bulunmuştur. Fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir. TIMP-2 düzeylerinin tümör dokularında düşük olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (68, 91). Rektal tümörlerde en çok rastlanan problemin nüks olduğunu dikkate aldığımızda, çalışmamızda rektal TIMP-2 düzeyi ile nüks arasında saptadığımız korelasyonun, rektal tümörlere yönelik literatür için önemli bir bulgu olacağını düşünmekteyiz. 44 rektal tümörlü hastadan preoperatif kemoradyoterapiden önce alınan biyopsilerde MMP-9 ekspresyonunun immünohistokimya ile değerlendirildiği diğer bir çalışmada ise yüksek olarak bulunan MMP-9 ekspresyonunun preoperatif kemoradyoterapiye yetersiz yanıt ile korele olduğu saptanmıştır (89). Tüm bu çalışmalardan farklı olarak, çalışmamızda rektal tümör aktif MMP-9 düzeyinin; tanı anı metastaz, lenf nodu metastazı ve perinöral invazyon varlığı ile korele olduğunu gösteren bulgularımız, MMP-9'a ait rektal tümörlerde kısıtlı olarak yapılan çalışmaların yanında özgünlüğünü korumaktadır. Ayrıca Hilska ve arkadaşlarının 118 rektal tümör ile gerçekleştirdikleri çalışmada, TIMP-2 ile birlikte diğer TIMP'lerin ekspresyonları ve bunların rektum tümörlerindeki prognostik önemleri araştırılmıştır. Çalışma bulgusu olarak rektum tümörlerinde yüksek TIMP-4 ekspresyonunun rektum kanserli hastalarda uzun sağkalım ile ilişkili olabileceği ilk kez bu literatür ile bildirilmiştir (87). Bu bulguya benzer olarak; TIMP-4'ün fazla olarak eksprese edilmesinin meme kanserlerinde de tümör büyümesi ile ters yönde ilişkisi bildirilirken (92), endometrial (93) ve servikal kanserlerde (94) aşırı TIMP-4 ekspresyonunun invazyon ve ilerleyen evreler ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. TIMP-4'ün fizyolojik fonksiyonu incelendiğinde ise MMP-2'nin MT-1 MMP aracılı aktivasyonunda MT-1 MMP'yi inhibe ederek, MMP-2 aktivasyonunu engellediği görülmektedir (95). Bizim çalışmamızda rektum tümör MT-1 MMP ile eşlenik normal MT-1 MMP düzeyleri arasında farklılık saptayamadığımız, TIMP-4'ün bu koruyucu mekanizması ile ilişkilendirilebilir. Tanı

anı metastaz ile anlamlı ilişki içinde bulunan rMMP-2 oranında ise MMP-2 aktivasyonunun, aktifleşen diğer MMP'ler (MMP-1, -3, -7) aracılığı ile de gerçekleşebileceği ihtimaller arasında yer alabilir. MMP-2 aktivasyonunun inceleneceği çalışmalarda TIMP-4 düzeyinin araştırılması MMP-2'nin MT-1 MMP aracılı aktivasyon etki mekanizmasına açıklık getirebilir görüşüdeyiz.

Kolorektal kanserlerde meydana gelen ölüm nedenleri arasında sıklıkla uzak metastazlar (karaciğer metastazı) yer almaktadır. Tümör progresyonu ve metastazının angiogeneze bağımlı olduğu bilinmektedir. Angiogenez, hücre migrasyonu, proliferasyonu, ECM degradasyonu ve yapısal reorganizasyonunu gerektirir. Tüm bu aşamalar proangiogenik ve antiangiogenik moleküller arasındaki dengeye bağımlıdır (96). Biz de bu amaçla çalışmamızda rektum (n=34) ve kolon tümörlerinde (n=50) proangiogenik molekül olarak VEGF; antiangiogenik molekül olarak endostatin düzeylerini belirleyerek angiogenezin hangi yönde, nasıl bir denge içinde olduğunu ve bu moleküllerin klinikopatolojik değişkenlerle ilişkisini araştırmayı planladık. VEGF ve endostatin düzeylerini belirlemek amacıyla ELISA yönteminden yararlandık. VEGF için yöntemin sensitivitesi pikogram/ml düzeyinde, endostatin için ise ng/ml düzeyindedir.

Çalışmalarımız sonucunda rektum ve kolon tümörleri için ayrı ayrı araştırdığımız VEGF düzeyleri arasında rektum ve kolon tümör dokusu ile eşlenik normal dokular arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Rektum tümör VEGF düzeylerinin klinikopatolojik değişkenlerle anlamlı ilişkisi olup olmadığını araştırdığımızda ise rektum tümör VEGF düzeylerinin perinöral invazyon ile anlamlı ilişki içinde olduklarını belirledik. Ayrıca rektum tümör VEGF düzeyleri ile tümör çapı arasında anlamlı orta derecede korelasyon bulundu ($p=0.009$ $r=0.454$). Bu bulgu VEGF'in tümör vaskülarizasyonu ile ilişkili olduğunu gösteren total kolorektal tümör grubu ile kurgulanmış literatürlerle benzerlik göstermektedir (97, 98). Bununla birlikte kolon tümör VEGF düzeyleri ile klinikopatolojik değişkenler arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Diğer yandan jelatinazların kolorektal kanser gelişimindeki patogenetik mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Bu enzimlerin up-regülasyonlarının solid tümörlerde pro-angiogenik veya pro-metastatik aktiviteyi artırdığını bildiren çalışmalar vardır (99). Angiogenez, tümör hücrelerinin ve çevredeki stromal hücrelerin birbirleri ile etkileşimlerini kolaylaştıran birçok solubl faktörlerle ve hücre yüzeyi moleküllerinin yer aldığı kompleks ve

dinamik bir olaydır. MMP-9'un, ESM'ye VEGF salınımındaki rolü ile tümör anjiogenezinin düzenlenmesindeki rolleri yapılan çalışmalarda vurgulanmaktadır (7). Sonuç olarak MMP-9'un up-regülasyonunun pro-anjiogenik aktivitesi aracılığıyla erken aşamada kolorektal karsinogenezin gelişiminde önemli olduğunu savunan görüşler vardır. (100) Bu bağlamda çalışmamızda rektum tümörlerinde tanı anı metastaz varlığı ile, kolon tümörlerinde ise uzak metastaz varlığı arasında anlamlı ilişkisi bulunan tümör aktif MMP-9 düzeylerinin, VEGF düzeyleri ile arasında korelasyon analizi yapıldı fakat herhangi bir korelasyon saptanmadı.

Kolorektal kanser ve VEGF düzeylerine ilişkin literatür incelendiğinde örneklerin total kolorektal grubu olarak analizlendiğini görmekteyiz. Yapılan çalışmaların sonucunda VEGF ekspresyonunun vasküler invazyon ve karaciğer metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (101, 102). Çalışmamızda bu literatürlere benzerlik veya daha yeni bir bulgu olarak, kolon VEGF düzeyleri ile klinikopatolojik değişkenler arasında bir ilişki gösterilemedi. Rektum tümörlerinde VEGF ekspresyonuna yönelik son yıllarda yayınlanan çalışmaların çoğunlukla sağ kalım ile ilişkilendirildiğini görmekteyiz. 71 rektal tümör ile yapılan çalışmada yüksek VEGF ekspresyonunun uzak metastaz ile ilişkili olarak kısa sağkalım süresi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (103). 59 rektal tümör ile gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise VEGF ekspresyonunun lenf nodu metastazı ile de ilişkili olduğu savunulmaktadır (104). Çalışmamız sonuçları arasında bu literatürlere benzer herhangi bir bulgu yoktur. Bununla birlikte rektum tümör ve normal VEGF düzeylerinin perinöral invazyon ile anlamlı ilişki içinde bulunması ve rektal tümör çapı ile tümör VEGF düzeyleri arasında saptadığımız korelasyonun literatüre çeşitlilik getireceği düşüncesindeyiz.

Son yıllarda deneysel kanser modellerinde yapılan çalışmalarda endostatin popüler bir molekül haline gelmiştir. Chen W ve arkadaşları retroviral endostatin gen transferinin kolon kanser hücrelerinin büyümesini engellediklerini bildirmişlerdir (105). Farelerde gerçekleştirilen bir çalışmada ise enjeksiyon yolu ile verilen endostatinin VEGF ve VEGF reseptör ekspresyonunu azaltarak neovaskülarizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (106). Biz de bu çalışmalardan etkilenerek kolon ve tümör dokularımızda endostatin ekspresyonuna ve bunun özellikle VEGF ve ESM'ye VEGF salınımında etkin olduğu bildirilen MMP-9 ile korelasyonunu araştırdık. Endojen tümör anjiogenez inhibitörü endostatin ile ilgili çalışmalarımızı gerçekleştirirken ELISA ve Western Blot yöntemlerinden yararlandık. ELISA yöntemi ile rektum ve kolon tümör dokusu ile eşlenik normal dokularda endostatin düzeylerini nanogram (ng) seviyesinde ölçümledik. Buna göre hem rektal hem de kolon tümör

ve eşlenik normal dokularda endostatin düzeyleri yönünden anlamlı bir farklılık saptanmadı. Korelasyon analizi sonucunda endostatin düzeyleri ile MMP-2, MMP-9 ve VEGF düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Aynı şekilde endostatin düzeyleri ile klinikopatolojik değişkenler arasında da anlamlı bir ilişki bulunmadı. Western Blot çalışmalarını, 13 kolon tümör-eşlenik normal dokularında ve 14 rektum tümör ve eşlenik normal dokularında gerçekleştirdik. Çalışmalarımız sonucunda 6 adet kolon tümör dokusunda ve 3 adet rektum tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre endostatin ekspresyon düzeyleri yüksek saptandı. Fakat tümör ve eşlenik normal dokudaki endostatin ekspresyon düzeylerindeki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. Literatürü kolorektal kanser ve doku endostatin ekspresyonu yönünden incelediğimizde buna ilişkin çalışmaya rastlanılmamaktadır. Bununla birlikte Guenther ve arkadaşlarının karaciğer metastazlı kolorektal örneklerinde endostatinin prekürsörü olan kollagen XVIII'in mRNA ekspresyonuna yönelik gerçekleştirdikleri bir çalışma mevcuttur (107). Bu çalışmanın sonucunda kolon karsinoma epitelinde kollagen XVIII ekspresyonu saptanmamış, primer ve karaciğere metastaz yapan tümör stromasında fibroblast ve endotel hücre kaynaklı kollajen XVIII ekspresyonu gösterilmiştir. Tien ve arkadaşları kolorektal kanserli hastalardan alınan periferik venöz kan ve tümör direnajını anjiyogenik faktörler yönünden karşılaştırmışlardır. Çalışmalarının bulguları olarak VEGF'in tümör ve hastalısız sağ kalım ile ilişkisini gösterirken bFGF (Fibroblast büyüme faktörü) ve endostatinin tümör evresi ve hastalısız sağ kalım ile korele olmadığını bildirmişlerdir (108). Karaciğer dokusuna ait kollagen XVIII ekspresyonu ilk kez Schuppan ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (109). Bunların yanında glioma (51), pankreas (110), mesane, prostat ve böbrek (111) tümörlerinde normal dokuya göre yüksek endostatin ekspresyonunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda endostatin ekspresyonunu örneklerin tamamında gösterememiş olmamız, alınan örneğin tümör stromasını tamamen temsil edememiş olmasından kaynaklanabilir. Nasu ve arkadaşlarının in vitro koşullarda kanser hücresi olmamakla birlikte insan endometrial hücrelerde gerçekleştirdikleri bir çalışmada hipoksi etkisiyle kollajen XVIII mRNA'sında değişiklik olmaksızın endostatin üretiminin azaldığı, VEGF sekresyonunun ise arttığı bildirilmektedir (112). Endostatin ekspresyonu gösterilemeyen örneklerimizde, tümör mikroçevresinin hipoksik koşulları etkisi ile kollajen XVIII'den endostatinin oluşumu için gerekli proteolitik işlemin gerçekleşmemiş olması da ihtimaller arasında yer alabilir. Yine tümör ve normal dokularda Western Blot yönteminde hem kollagen XVIII hem de endostatini

tanıyan antikorların kullanılması ve buna komplementer olarak immünohistokimyasal yöntemlerden yararlanılması gerektiği sonucuna vardık. Böylece kollagen XVIII'in varlığı tümör dokusu doğasında endostatin kaynağı olarak tanımlanarak, endostatin ekspresyonunun daha kontrollü değerlendirilmesi mümkün hale getirilebilir. Ayrıca çalıştığımız kolorektal tümörlü hasta grubunda kollagen XVIII/endostatin geninde mutasyon taramaları da bu tür çalışmalara yeni bir bakış açısı kazandırabilir diye düşünmekteyiz.

İn vitro deneyler:

Kanser hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyon ve aktivasyon regülasyon mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Değişik kanser türlerinde MMP-2 ve MMP-9'un çeşitli ajanların bu enzimlerin regülasyonların düzenlenmesindeki etkinlikleri araştıran çalışmalar mevcuttur (113, 114). Rekombinant endostatinin MMP-2 üzerine ne tür spesifik etkilerinin olacağı ve bu etkinin kanser hücrelerinin invazyon yeteneğini hangi yönde değiştireceğini araştırmak için hücre kültüründen yararlandık. Bunun için kolon adenoma kanser hücre dizisi olan HT-29 kullanıldı. Literatürde HT-29 hücrelerinde rekombinant endostatinin MMP-2 regülasyonu ve invazyonu üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışma mevcut değildir. Bu kurgudaki hipotezimiz 72 saat inkübasyon sonunda endostatinin MMP-2'nin MT-1 MMP aracılı aktivasyonunu bloke ederek HT-29 hücrelerinin invazyon yeteneklerini azaltması idi. Ayrıca endostatinin kanser hücresi canlılığı üzerindeki etkilerini de test etmek istedik.

Hücre canlılığı için MTT testini kullandık. Çalışmamız sonucunda 0.1, 1, 2.5, 10, 20, 40 µg/ml konsantrasyonlarında endostatin ile 72 saat inkübe edilen deney grubu hücrelerinde, kontrol grubu hücrelerine göre anlamlı olarak azaltıcı etkisinin olduğunu ve en etkin dozun 10 µg/ml olduğunu saptadık. Literatürde, HT-29 kolon adenokarsinoma hücre dizisinde rekombinant endostatinin hücre proliferasyonuna ilişkin bir çalışma yoktur. Bununla birlikte Dkhissi ve arkadaşları, daha önceden HT-29 hücreleri ile oluşturdukları tümörlü murinlere, fare endostatin geni taşıyan rekombinant adenovirüsü taşıyarak, endostatinin tümör büyümesini azaltıcı yönde etkisinin olduğunu göstermişlerdir (115). Bu anlamda bulgularımız bu literatür ile desteklenmektedir. Bununla birlikte 72 saat süresince 0.01, 0.1, 1, 5, 10 µg/ml konsantrasyonlarında endostatin ile inkübasyona bırakılan mesane kanser hücrelerinde (EJ hücre hattı) gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise endostatinin hücre proliferasyonunu azaltıcı etkisinin olmadığı bildirilmektedir. Yine aynı araştırmacılar aynı çalışma kapsamında

endostatinin 10 µg/ml konsantrasyonda ECV304 endotel hücrelerinde hücre proliferasyonunu bu konu ile ilgili temel çalışmalara (2) benzer olarak azalttığını göstermişler buradan da endostatinin hücre proliferasyonunun azaltıcı etkisinin endotel hücresine spesifik olduğunu savunmuşlardır (116).

Rekombinant endostatinin MMP-2 sekresyonuna olan etkisini değerlendirmek üzere doku çalışmalarında olduğu gibi jelatin zimografi yönteminden yararlandık. Kontrol ve deney grubu hücreler birbiri ile karşılaştırıldığında, tüm deney grubu hücrelerinde proMMP-2 aktivite düzeylerinin, kontrol grubu hücrelerine göre anlamlı olarak azaldığı saptandı. ProMMP-2 sekresyonunu azaltan en etkin endostatin dozu 1 µg/ml olarak belirlendi. Çalışmamızda proMMP-2 aktivasyonunu gösteren aktif MMP-2 bantları saptanamamıştır. Literatüre baktığımızda aktif MMP-2 bantlarının saptanamadığı çalışmalar ile karşılaşılmakta ve bulgularımız bu literatürlerle benzerlik göstermektedir. Li ve arkadaşlarının anti-TipIV kollajenaz monoklonal antikörlerin HT-29 hücrelerinde antitümör aktivitesinde yönelik çalışmalarında da jelatin zimografi yönteminde aktif MMP-2 bantları gösterilememiş ve proMMP-2 aktivitesi tartışılmıştır (117). Yosef ve arkadaşlarının insan endotel hücrelerinde gerçekleştirdikleri diğer bir çalışmada da jelatin zimografi ile MMP-2 aktivasyonu gözlenmemiştir. Araştırmacılar bu durumu, in vitro çalışma koşullarının, doğal fizyolojik mikroçevrenin içerdiği sitokinler, büyüme faktörleri vb faktörlerden yoksun olması nedeni ile MT-1 MMP'nin MMP-2 aktivasyonunu sağlayamaması veya aktifleşen MMP-2'nin yarılanma ömrünün kısa olması şeklinde açıklamaktadırlar (118). Ayrıca çalışmamızda HT-29 hücrelerinde bazal durumda da MMP-2 aktivasyonunun gözlenememiş olması yine bu hücre tarafından salgılanan TIMP-2 düzeyi ile de ilişkili olabilir. MT-1 MMP aracılı MMP-2 aktivasyonunun gerçekleşebilmesi için TIMP-2 düzeyinin düşük konsantrasyonlarda olması gerekmektedir. TIMP-2 düzeyi arttığında TIMP-2 ya serbest aktif MT-1 MMP'lere ya da aktif MMP-2'lere bağlanarak MMP-2 aktivasyonunu inhibe etme yönünde çalışmaktadır (29, 30). Yine MT-1 MMP'nin hücre içinde aktifleşememesi ya da aktifleşen MT-1 MMP'nin hücre yüzeyine transfer olamaması ya da aktif MT-1 MMP'nin in vitro ortam koşullarından (pH, kalsiyum düzeyi vb) etkilenerek (119) proMMP-2 ye tutunamaması gibi ihtimaller de söz konusu olabilir. Tüm bunların dışında endostatinin proMMP-2 sekresyonunu azaltıcı yöndeki etkisi transkripsiyonel düzeyde de etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda amacımızın rekombinant endostatinin HT-29 hücrelerinde MMP'ler üzerine ne tür spesifik etkilerinin olacağını araştırmak olması nedeni ile kültür ortamlarımızda

serum, büyüme faktörü, sitokin vb kullanılmadı. Bu nedenle indüklenebilir özellik gösteren MMP-9'un saptanamamış olması beklenebilir bir sonuçtur. Bu çalışmalara ve bizim bulgularımıza zıt olarak ise Stahtea ve arkadaşları HT-29 hücreleri üzerine imatinibinin etkilerinin araştırılmasına yönelik gerçekleştirdikleri çalışmada jelatin zimografi ile MMP-2'ye yönelik hiçbir bulgu gösterememişler; bunu aşmak için HT-29 hücrelerini fibroblast hücreleri ile kokültürleme tekniğinden yararlanmışlardır (120). Tüm bu çalışmaların dışında Kim ve arkadaşları HT1080 fibrosarkoma ve insan endotel hücrelerinde MMP-2 aktivitesinin endostatin tarafından bloke edildiğini bildirmişlerdir (3). Buna benzer olarak da Nyberg ve arkadaşları insan dil karsinoma hücrelerinde (HSC-3) MMP-2, 9 ve 13'ün aktivasyonlarının bloke edildiğini göstermişlerdir (121). Nyberg ve arkadaşları çalışmalarında 1, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 30 ve 40 µg/ml olmak üzere oldukça geniş endostatin konsantrasyon aralığı kullanmışlardır. Sonuç olarak intravazasyon ve migrasyon deneylerinde endostatinin düşük konsantrasyonlarda daha etkili, yüksek konsantrasyonlarda ise daha az etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu bifazik etkiyi MMP-2 aktivitesini değerlendirme sırasında da gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda endostatinin 20 ve 40 µg/ml konsantrasyonlarında gözlenen proMMP-2 aktivitesinin daha düşük konsantrasyonlarda gözlenen aktivitelere göre düşük olması Nyberg ve arkadaşlarının yukarıdaki yorumu ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca Nyberg ve arkadaşları endostatinin inhibitör etkisinin hücre yoğunluğu ile değişebileceğini de bildirmektedirler. Çalışmalarında 28000 hücre olarak belirledikleri hücre sayısının endostatinin inhibitör etkisi için kritik bir değer olduğunu; bu değer altında (18000 hücre) ve üstündeki (38000 hücre) değerlerde etkinin meydana gelmediğini gözlemlemişlerdir (121). Çalışmamızda hücre sayısını ml başına 60 000 hücre olarak kurguladığımız için farklı hücre sayılarında endostatinin etkisini gözleme fırsatımız olmadı. Ayrıca Du ve arkadaşları mesane kanser hücre hattında gerçekleştirdikleri çalışmada Western Blot yöntemi ile endostatinin MMP-2 protein seviyesinde indüksiyona neden olduğunu bildirmektedirler (116). Tüm bunlardan endostatinin etkisinin oldukça kompleks olduğunu görmekteyiz.

Çalışmamızda biyokimyasal parametrelerin korelasyon analizinde HT-29 hücrelerinin proMMP-2 aktivitesi ile canlılıkları arasında olumlu, orta derecede anlamlı bir korelasyon ($p=0.007$ ve $r = .423$) olduğunu saptadık. Endostatinin hücre canlılığı ve proMMP-2 aktivitesi üzerine etkisini gösteren grafiklerin her ikisinin de aynı profilde olduğu dikkat çekmektedir. Bu bulgu MMP'lerin fizyolojik olarak HT-29 hücrelerinin canlılığında da etkin olabileceğini ve hücre canlılığını etkileyen sinyal ileti yolları ile MMP'lerin regülasyonunda görevli

sinyal yollarının bir noktada kesişebileceğine işaret etmektedir. Bu konunun ileri çalışmalarımızda araştırılmaya değer bir konu olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızdaki hücre kontrol grubunda gözlenen aktif MT-1 MMP düzeyleri, ortama farklı konsantrasyonlarda endostatin eklenmesi ile daha düşük düzeyde saptandı. Bununla birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Literatürde Kim ve arkadaşları endostatinin MMP-2 aktivitesini bloke etmesini, endostatinin direkt olarak proMMP-2 ile etkileşerek ya da MMP-2 ve MT-1 MMP nin katalitik bölgesine bağlanarak gerçekleştirdiğini bildirmektedirler (3).

Endostatinin TIMP-2/MT-1 MMP oranına etkisini incelediğimizde ise, bu oranın kontrol grubuna göre 1 µg/ml, 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml ve 40 µg/ml endostatin eklenen deney gruplarında anlamlı olarak arttığı saptandı. TIMP-2/MT-1 MMP oranındaki bu anlamlı azalma, aynı koşullarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan kontrol grubuna göre deney gruplarında azalma yönünde farklılık gösteren MT-1 MMP düzeylerini destekleyebilir şeklinde yorumlanabilir.

Endostatinin HT-29 hücrelerinin invazyon yetenekleri üzerine olan etkisi incelendiğinde; hücre kontrol grubuna göre endostatin eklenen tüm deney gruplarındaki hücrelerin invazyon yeteneklerinin azaldığı gözlemlendi. Fakat bu azalma istatistiksel değerlendirmede anlamlı saptanmadı. Literatür incelediğinde endostatinin HT-29 hücrelerinin invazyonu üzerine etkisini araştıran bir çalışma mevcut değildir. Bununla birlikte HT-29 hücresi dışında yukarıda sözü edilen iki çalışmada (3, 121) endostatinin HUVEC, HT1080 ve HCS-3 hücrelerinde invazyonu azaltıcı etkisi gösterilmiştir. Çalışmamızda invazyon ile MT-1 MMP arasında pozitif yönde çok güçlü korelasyon bulundu ($p=0.000$ ve $r = .991$). Buna paralel olarak invazyon ile TIMP-2/MT-1MMP oranı ters yönde çok güçlü anlamlı bir korelasyon bulundu ($p=0.000$ ve $r = -.962$).

Sonuç olarak hem doku düzeyinde hem de in vitro çalışmadan elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda araştırmamızın sonuçları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- ✓ Kolon tümörü ile yapılan kısıtlı sayıda çalışmalarda örnek sayılarının az olduğu dikkat çekmektedir ve bu çalışmalarda aktif MMP-2 ve MMP-9'un kolon tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre yüksek olmasının klinikopatolojik değişkenler ile ilişkisi araştırılmamıştır. Bununla birlikte son yıllarda oldukça geniş kolon tümörü ile yapılan çalışmaların bu enzimleri immünohistokimyasal yöntemler ile değerlendirildiğini ve MMP-2'ye odaklanıldığını, MMP-9 ile ilgili herhangi bir bulgu verilmediğini görmekteyiz. Bu anlamda çalışmamızda 50 kolon tümör dokusunda aktif MMP-9 ile tümör invazyon derinliği "pT1-2 vs pT3-4" ve uzak metastaz varlığı arasında saptadığımız korelasyon bulguları, kolon kanser progresyonu ve jelatinazların ilişkilendirildiği ve ilişkilendirileceği yeni çalışma sonuçlarının tartışılmasında literatüre zenginlik katacağını düşünmekteyiz.
- ✓ Literatür rektum tümörleri ve MMP-2 ve MMP-9'un aktivasyonları yönünden incelendiğinde yine aynı şekilde kısıtlı sayıda küçük örnek gruplarında (n=10) gerçekleştirilmiş çalışmalar ile karşılaşılmaktadır. Son yıllarda rektum tümörlerine yönelik geniş örnek grubu ile gerçekleştirilmiş çalışmalar olmasına rağmen burada kullanılan yöntemler immünohistokimyasal yöntemlerdir. Bununla birlikte, bu proteinazların fonksiyonel durumları, bu enzimlerin aktiviteleri ile ilişkilidir. Bu anlamda rektum tümör aktif MMP-9 ve tümör aktif MMP-9/Pro MMP-9 oranı (rMMP-9), Tümör aktif MMP-2/ProMMP-2 (rMMP-2), ile tanı anı metastaz ve perinöral invazyon varlığı arasında, tümör dokusu proMMP-9 ve proMMP-2 ile lenf nodu metastazı, tümör dokusu TIMP-2 düzeyleri ile nüks arasında saptadığımız anlamlı ilişkiler rektum tümörleri için özgün olarak kabul edilebilir.
- ✓ Ayrıca anjiogenez göstergesi olarak araştırdığımız VEGF düzeyleri ile ilgili olarak kolon tümörlerinde klinikopatolojik değişkenler ile herhangi anlamlı bir ilişki göstermemekle birlikte; rektum tümör dokusu VEGF düzeyleri ile perinöral invazyon arasında saptanan anlamlı ilişkilerin ve rektum tümör VEGF düzeyleri ile tümör çapı

arasında gösterilen korelasyonun rektum tümör progresyonunu inceleyen literatür için orijinal olduğunu düşünmekteyiz.

- ✓ Çalışmamızın endojen anjiogenez inhibitörü olan endostatinin tümör hücre invazyonuna ilişkin hipotezi, MMP'lerin endojen endostatin oluşumunda da etkin olduklarını dikkate alarak, tümörlü dokuda eşlenik normal dokuya göre olası yüksek MMP-2 aktivitesine paralel olarak endostatin düzeyinin de tümörlü dokuda yüksek olması idi. Yine endostatinin MMP-2 inhibisyonuna aracılık ederek tümör invazyonu üzerine olası azaltıcı etkisi öngörüldü. Bu anlamda, endostatinin MMP'ler ve tümör hücre invazyonu üzerine spesifik etkilerini tanımlayabilmek amacı ile de rekombinant endostatin varlığında *in vitro* deneylerden yararlandı. Doku çalışmalarımızın sonucunda tümör dokusunda yüksek endostatin ekspresyonunun eşlenik normal dokulara göre anlamlı olmaması ve *in vitro* deneylerimizin sonucunda da rekombinant endostatinin invazyon üzerine etkisinin olmamasına yönelik bulgumuz hipotezimizi desteklemedi. Bununla birlikte doku endostatin protein düzeyleri ile invazyona ilişkin klinikopatolojik değişkenler arasında anlamlı ilişki saptanmaması *in vitro* bulgularımızı desteklemektedir. Literatürde kolorektal kanserde endostatin ekspresyonunu inceleyen çalışma olmaması nedeni ile bu yöndeki bulgularımızı karşılaştırma olanağımız olmamıştır.

In vitro koşullarda rekombinant endostatinin HT-29 kolon adenokarsinoma hücre dizisinde proMMP-2 sekresyonu ve pro-MMP-2'nin MT-1 MMP aracılı aktivasyon mekanizmasında ve buna ilişkin kanser hücre invazyonunun azalmasına yönelik olası mekanizmalarının incelenmesine yönelik çalışma bulgularımız ise aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- ✓ Rekombinant endostatin (0.1-40 µg/ml konsantrasyon aralığında) hücre canlılığını kontrol grubu hücrelerine göre anlamlı olarak azaltmaktaydı. Bu bulgu endostatinin bu hücrelerde anti-anjiogenik aktivitesinin yanında anti-tümörojenik etkisinin de olabileceğine işaret etmektedir.

- ✓ Rekombinant endostatin uygulanan tüm deney grubu hücrelerinde proMMP-2 aktivite düzeylerinin, kontrol grubu hücrelerine göre anlamlı olarak azaldığı saptandı. Korelasyon analizi sonucunda proMMP-2 aktivitesi ile canlılığın olumlu, orta derecede korele olduğu gösterildi. Bu bulgu; MMP'lerin fizyolojik olarak HT-29 hücrelerinin canlılığında da etkin olabileceğini ve hücre canlılığını etkileyen sinyal ileti yolları ile MMP'lerin regülasyonunda görevli sinyal yollarının bir noktada keşilebileceğine işaret etmektedir. Bu konunun ileri çalışmalarımızda araştırılmaya değer bir konu olduğunu düşünmekteyiz.
- ✓ Rekombinant endostatinin, MT-1 MMP aktivitesini bloke etmesine yönelik bulgularımız sonucunda; rekombinant endostatin eklenen deney gruplarında aktif MT-1 MMP düzeyinde kontrol grubuna göre saptanan azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bununla birlikte 1 µg/ml, 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml ve 40 µg/ml endostatin eklenen deney gruplarında TIMP-2/MT-1 MMP oranının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı saptandı.
- ✓ Rekombinant endostatinin, kanser hücrelerinin invazyonunu bloke etmesine yönelik bulgularımız sonucunda; endostatin eklenen tüm deney gruplarında hücrelerin invazyon yeteneklerinin, kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi. Fakat bu azalma istatistiksel değerlendirmede anlamlı saptanmadı. Doku endostatin düzeyleri ile invazyona ilişkin klinikopatolojik değişkenler arasında anlamlı ilişki saptanmaması in vitro bulgularımızı desteklemektedir. Bununla birlikte invazyon ile MT-1 MMP arasında pozitif yönde çok güçlü korelasyon bulundu ($p=0.000$ ve $r = .991$). Buna paralel olarak da invazyon ile TIMP-2/MT-1 MMP oranının ters yönde çok güçlü anlamlı bir korelasyon içinde olduğu saptandı ($p=0.000$ ve $r = -.962$).

Çalışmamızda; MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonlarını, bu enzimlerin regülasyonlarında görevli inhibitör ve aktivatör proteinler ile anjiogenetik stimülatör ve inhibitör proteinlerin düzeylerini kolon ve rektum olmak üzere iki ayrı homojen grupta inceledik ve bu proteinler ile klinikopatolojik değişkenler arasında anlamlı bulgular saptadık. Elde ettiğimiz bu bulguların; kolon ve rektum tümörlerinin prognozuna yönelik çalışmalar için yararlı olacağı görüşündeyiz.

Ayrıca HT-29 hücrelerinde rekombinant endostatinin hücre canlılığı ve MMP-2 regülasyonunda inhibisyon etkisine yönelik bulgularımız ve ayrıca endostatinin TIMP-2/MT-1 MMP oranı üzerine ilişkin bulgularımız, endostatinin kolon kanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik ileri çalışmalarda incelenmeye değer aday molekül olduğuna işaret etmektedir.

ALTINCI BÖLÜM

6. KAYNAKLAR

1. Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996; 86: 353-364.
2. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N et al. Vasios G, Lane WS et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997; 88: 277-285.
3. Kim Yong-Mi, Jang WJ, Lee O.H, Yeon J et al Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase 2. *Cancer Research*, 2000; 60: 5410-5413.
4. Xie K, Wei D, Shi Q and Huang S. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2004; 15, 297-324.
5. Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 1237- 1241.
6. Seiki M and Yana I. Roles of percellular proteolysis by membrane Type-I matrix metalloproteinases in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Sci*, 2003; 94: 569-574.
7. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, 2000; 2 (10): 737-744.
8. Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, et al. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Letter*, 2000; 486: 247-251.
9. Zucker S and Jeffrey V. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2004; 23: 101-117.
10. Mook ORF, Frederiks WM, Noorden CJF. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004; 1705: 69-89.
11. Kapitejin E, Liefers GJ, Los LC, Kranenbarg EK, et al. Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *Journal of Pathology*, 2001; 195: 171-178.

12. Konishi K, Fujii T, Boku N, Kato S, et al. Clinicopathological differences between colonic and rectal carcinomas: are they based on the same mechanism of carcinogenesis? *Gut* 1999; 45:818-821.
13. Kim Tae D, Song KS, Li G, Choi H, et al. Activity and expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinases in human colorectal cancer. *BioMed Central Cancer*, 2006; 18 (6):211-221.
14. Libby P and Lee RT. Matrix matters. *Circulation*, 2000; 102 (16):1874-1876.
15. Bosman F, Stamenkovic I. Editorial: Preface to extracellular matrix and disease. *Journal of Pathology*, 2003; 200:421-422.
16. Bosman F and Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *Journal of Pathology*, 2003; 200:423-428.
17. Miyamoto S, Katz BZ, Lafrenie RM and Yamada KM. Fibronectin and integrins in cell adhesion, signalling and morphogenesis. *Ann. Acad Sci*, 1998; 857:119-129.
18. Güner G. Bölüm 20 Bağ dokusu proteinleri. In: Onat T, Emerk K. editors. *Temel Biyokimya*, Birinci baskı, Ankara, 1996, 826-863.
19. Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol*, 1996; 8:618-624.
20. Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost*, 2001; 86:36-355.
21. Nagase H, Visse R, Gillian M. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 2006; 69 (3):562-573.
22. Visse R and Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 2003; 92:827-39.
23. Beurden Snoek P M and Hoff VW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, 2005; 38:73-83
24. Björklund M and Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005; 1755:37-69.
25. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378:151-160.

26. Murphy G, Stanton H, Cowell G, Butler G, et al. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation, *APMIS*, 1999; 107:38-44.
27. Seiki M and Yana I. Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinases in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Sci*, 2003; 94:569-574.
28. Barantes SH, Bernardo M, Toth M, Fridman R. Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Cancer Biology*, 2002; 12:131-138.
29. Baramova EN, Bajou K, Remacle A, Hoir CL, et al. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Letters*, 1997; 405:157-162.
30. Barrantes HS, Toth M, Bernardo M, Yurkova M, et al. Binding of active (57 kDa) membrane type1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem*, 2000; 275:12080-12089.
31. Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, et al. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J*, 2000; 19:1187-1194.
32. Sasaki T, Hohenester E, Timpl R. Structure and function of collagen derived endostatin inhibitors of angiogenesis. *IUBMB Life*, 2002; 53:77-84.
33. Hohenester E, Sasaki T, Mann K, Timpl R. Variable zinc coordination in endostatin. *J. Mol Biol*, 2000; 297:1-6.
34. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res*, 2005; 65 (10):3967-3979.
35. Bix G and Iozzo V. Matrix revolutions: 'tails' of basement-membrane components with angiostatic functions. *Trends in Cell Biology*, 2005; 15:52-59.
36. Zorick TS, Mustacchi Z, Bando SY, Zatz M. High serum endostatin levels in Down Syndrome: implications for improved treatment and prevention of solid tumours. *Eur J Hum Genet*, 2001; 9:811-814.
37. Abdollahi A, Hahnfeld P, Maercker C, Gröne HJ, et al. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Molecular Cell*, 2004; 13 (5):649-663.

38. Digtyar AV, Pozdnyakova NV, Feldman NB, Lutsenko SV, et al. Endostatin: Current concepts about its biological role and mechanisms of action. *Biochemistry (Moscow)*, 2007; 72 (3):235-246.
39. Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integrative Cancer Therapies*, 2005; 4 (4):315-321.
40. Loureiro RMB, D'Amore PA. Transcriptional regulation of VEGF. *Cytokine&Growth Factor Reviews*, 2005; 16:77-89.
41. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2:563-572.
42. Zigrino P, Löffek S, Mauch C. Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochime*, 2005; 87:321-328.
43. Deryugina EI and Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 2006; 25:9-34.
44. Ay E. Kolorektal kanser gelişiminde p21, p27, p57 siklin bağımlı kinaz inhibitör genleri (CDK1) ile p53 ve p73 tümör supressör geni ekspresyon düzeyi değişimlerinin belirlenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 2005, 1-100.
45. Ponz de Leon M and Di Gregorioc. Pathology of colorectal cancer. *Digest Liver Dis*, 2001; 33:372-386.
46. Klump B, Nehls O, Hisch CJ, Gittinger FS, et al. Molecular lesions in colorectal cancer: Impact on prognosis. Original data & review of the literature. *Int J Colorectal Dis*, 2004; 19:23-42.
47. Paddenberg R, Faulhammer P, Goldenberg A, Kummer W. Hypoxia induces increase of endostatin in murine aorta and lung. *Histochem Cell Biol*, 2006; 125 (5):497-508.
48. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrek JD. Investigation of bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 1988; 175 (1):231-237.

49. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994; 218:325-9.
50. U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227:680-684.
51. Morimoto T, Aoyagi M, Tamaki M, Yoshino Y, et al. Increased levels of tissue endostatin in human malignant gliomas. *Clin Cancer Research*, 2002; 8:2933-2938.
52. Kurien BT and Scofield RH. Protein Blotting: A Review. *J Immunology Methods*, 2003; 274:1-15.
53. Tommy B, Sigurdson E, Rogatko A, Broccoli D. Telomerase inhibition using azidothymidine in the HT-29 colon cancer cell line. *Annals of Surgical Oncology*, 2003; 10 (8):910-915.
54. Freshney RI. Measurement of Viability and Cytotoxicity In: Freshney RI, ed. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. Third edition, USA, John Wiley and Sons, 1994, p.287-307.
55. Jiang MC, Liao CF, Lee PH. Aspirin inhibits matrix metalloproteinase 2 activity, increases E-cadherin production, and inhibits in vitro invasion of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 282:671-677.
56. Chen WS, Liu JH, Wei SJ, Liu JM, et al. Colon cancer cells with high invasive potential are susceptible to induction of apoptosis by a selective COX-2 inhibitor. *Cancer Sci*, 2003; 94 (3):253-258.
57. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951; 193:265-275.
58. Albin A, Iwanoto Y, Kleiman HK, Martin GR, et al. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 1987; 47:3239-3245.
59. Jia XO, Zhong N, Han LH, Wang JH, et al. Effect of NS-398 on colon cancer cells. *World J Gastroenterology*, 2005; 11 (3):353-356.
60. Aksakoğlu G. Sağlıkta araştırma teknikleri ve analiz yöntemleri. Birinci baskı, İzmir, Dokuz Eylül Üniversitesi Matbaası, 2001, sayfa 318-320.

61. Ornestein DL and Cohn KH. Balance between activation and inhibition of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is altered in colorectal tumors compared to normal colonic epithelium. *Dig Dis Sci*, 2002; 47 (8):1821-1830.
62. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 1997; 74:111-122.
63. Turpeenniemi TH. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancer. *Biochimie*, 2005; 87:287-297.
64. Joo YE, Seo KS, Kim J, Kim HS, et al. Role of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in colorectal carcinoma. *J. Korean Med Sci*, 1999; 14:417-423.
65. Kikuchi R, Noguchi T, Takeno S, Kubo N, et al. Immunohistochemical detection of membrane-type-1-matrix metalloproteinase in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2000; 83:215-218.
66. Pesta M, Holubec L Jr, Topolcan O, Cerna M, et al. Quantitative estimation of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Res*, 2005; 25 (5):3387-91.
67. Collins HM, Morris TM, Watson SA. Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. *Br J Cancer*, 2001; 84 (12):1664-1670.
68. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg*, 2000; 87 (9):1215-1221.
69. Murashige M, Miyahara M, Shiraishi N, Saito T, et al. Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human colorectal tumors. *Jpn J Clin Oncol* 1996; 26 (5):303-309.
70. Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weiss H, et al. Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann Surg* 2001; 233 (6):786-792.

71. Ring P, Johansson H, Hoyhtya M, Rubin K, et al. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) in human colorectal cancer: A predictor of tumor stage. *Br J Cancer*, 1997; 76:805-811.
72. Pesta M, Holubec L Jr, Topolcan O, Cerna M, et al. Clinicopathological assessment and quantitative estimation of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-7 and Inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Research* 2007; 27:1863-1868.
73. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, et al. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 107 (4):541-550.
74. Sis B, Sagol O, Kupelioglu A, Sokmen S, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-2, cathepsin D, and tenascin-C expression in colorectal carcinoma. *Pathol Res Pract* 2004; 200:379-387.
75. Zeng ZS and Guillem JG. Colocalization of matrix metalloproteinase-9 mRNA and protein in human colorectal cancer stromal cells. *Br J Cancer*, 1996; 74:1161-1167.
76. Islekel H, Oktay G, Terzi C, Canda AE, et al. Matrix metalloproteinase-9,-3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables. *Cell Biochemistry and Function*, 2007; 25 (4):433-441.
77. Waas ET, Lome RM, DeGroot J, Wobbes T, et al. Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 2002; 86:1876-1883.
78. Moran A, Iniesta P, Garcia-Aranda C, De Juan C, Diaz-Lopez A, Sanches-Pernaute A, Torres AJ et al. Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. *Oncol Rep*, 2005; 13(1):115-20.
79. Jung SA, Yang SK, Kim JS, Shim KN, et al. The expression (TIMPs) and angiogenesis in relation to the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in submucosally invasive colorectal carcinoma. *Korean J Gastroenterol* 2005; 45(6): 401-408.
80. Sounni NE and Noel A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochimie*, 2005; 87:329-342.

81. Malhotra S, Newman E, Eisenberg D, Scholes J, et al. Increased membrane type 1 matrix metalloproteinase expression from adenoma to colon cancer: a possible mechanism of neoplastic progression. *Dis Colon Rectum* 2002; 45:537-542.
82. Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, Ezumi K, et al. A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 2007; 95:652-662.
83. Bendardaf R, Lamlum H, Vihinen P, Ristamaki R, et al. Low collagenase-1 (MMP-1) and MT-1 MMP expression levels are favourable survival markers in advanced colorectal carcinoma. *Oncology*, 2003; 65:337-346.
84. Gervaz P, Bouzourene H, Cerottini JP, Chaubert J, et al. Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. *Dis Colon Rectum*, 2001; 44:364-72.
85. Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sorensen FB, Laurberg S, et al. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut*, 2005; 54:374-84.
86. Gervaz P, Bucher P, Morel P. Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. *J Surg Oncol*, 2004; 88:261-6.
87. Hilska M, Roberts PJ, Collan YU, Laine VJ, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2007; 121:714-713.
88. Schwander OA, Schlamp R, Broll H, Bruch P. Clinicopathologic and prognostic significance of matrix metalloproteinases in rectal cancer. *Int J Colorectal Dis*, 2007; 22:127-136
89. Unsal Kilic D, Uner A, Akyurek N, Erpolat P, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression correlated with tumor response in patients with locally advanced rectal cancer undergoing preoperative chemoradiotherapy. *Int. J. Radiation Oncology Biol Phys*, 2007; 67:196-203.
90. Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, Arndt M, et al. Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma. *Cancer*, 2001; 92:2680-2691

91. Lii BH, Zhao P, Liu SZ, Yu YM, et al. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in colorectal carcinoma invasion and metastasis. *World J Gastroenterol*, 2005; 11:3046-3050.
92. Wang M, Liu YE, Grene J, Sheng S, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Oncogene* 1997; 14:2767-74.
93. Tunuguntla R, Ripley D, Sang QXA, Chegini N. Expression of matrix metalloproteinase -26 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-3 and TIMP-4 in benign endometrium and endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 2003; 89:453-9.
94. Lizarraga F, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 is expressed in cervical cancer. *Anticancer Research*, 2005; 25: 623-7.
95. Bigg HF, Morrison CJ, Butler GS, Bugoyevitch MA, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 2001; 61:3610-8.
96. Morelli D, Lazzerini D, Cazzaniga S. Evaluation of the balance between angiogenic and antiangiogenic circulating factors in patients with breast and gastrointestinal cancers. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1221-5.
97. Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, Koura AN, et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch Surg*, 1997; 132:541-546.
98. Kang SM, Maeda K, Onoda N, Chng YS, et al. Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of tumor vascularity and liver metastasis. *Int J Cancer*, 1997; 74:502-507.
99. McCawley LJ and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumour progression. *Mol Med Today*, 2000; 6:149-56.

100. Garcia AG, Rodriguez AS, Jimenez A, Blanco AP, et al. Up-regulation of gelatinases in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *European Journal of Cancer* 2006; 42:3246-3252.
101. Abe A, Fukui H, Fujii S, Fujita M, et al. Involvement of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in vascularization and lymph node metastasis of colorectal cancers with submucosal invasion. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2007; 22:1071-1077.
102. Cheng J, Slavin R, Gallagher JA, Zhu G, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and receptor flk-1 in colon cancer liver metastases. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2004; 11:164-170.
103. Giralt J, Navalpotro B, Hermsilla E, de Torres I, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 in patients with recalc cancer treated with preoperative radiotherapy. *Oncology*, 2006; 71:312-9.
104. Yang D, Schneider S, Azuma M, Iqbal S, et al. Gene expression levels of epidermal growth factor receptor, survivin, and vascular endothelial growth factor as molecular markers of lymph node involvement in patients with locally advanced rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 2006; 6(4):305-11.
105. Chen W, Fu J, Liu Q, Ruan C, Xiao S. Retroviral endostatin gene transfer inhibits human colon cancer cell growth in vivo. *Chinese Medical Journal*, 2003; 116(10):1582-4.
106. Jia YH, Dong XS, Wang XS. Effects of endostatin on expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and neovascularization in colonic carcinoma implanted in nude mice. *World J Gastroenterol*, 2004; 10(22):3361-4.
107. Guenther U, Herbst H, Bauer M, Isbert C, et al. Collagen type XVIII/endostatin is differentially expressed in primary and metastatic colorectal cancers and ovarian carcinomas. *British Journal of Cancer*, 2001; 85(10):1540-1545.
108. Tien WY, Chang KJ, Chiu YF, Huang KW, et al. Comparison of angiogenic factor levels in tumour drainage and peripheral venous blood from colorectal cancer patients. *Annals of Surgical Oncology*, 2006; 13(11):1357-1363.

109. Schuppan D, Cramer T, Bauer M, Strefeld T, et al. Hepatocytes as a source of collagen type XVIII endostatin. *Lancet* 1998; 352:879-880.
110. Brammer RD, Bramhall SR, Eggo MC. Endostatin expression in pancreatic tissue is modulated by elastase. *British Journal of Cancer*, 2004; 92(1):89-93.
111. Schmidt A, Sommer F, Reiner M, Klotz T, et al. Differential endostatin binding to bladder, prostate and kidney tumour vessels. *BJU International*, 2005; 95:174-179.
112. Nasu K, Nishida M, Fukuda J, Kawano Y, et al. Hypoxia simultaneously inhibits endostatin production and stimulates vascular endothelial growth factor production by cultured human endometrial stromal cells. *Fertility and Sterility*, 2004; 82(3):756-759.
113. Nakoman C, Resmi H, Ay O, Acikel U, et al. Effects of basic fibroblast factor (bFGF) on MMP-2, TIMP-2 and type-1 collagen levels in human lung carcinoma fibroblasts. *Biochimie*, 2005; 87:343-351.
114. Nilsson UW, Garvin S, Dabrosin C. MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2007; 102:253-261.
115. Dkhissi F, Lu H, Soria C, Opolon P, et al. Endostatin exhibits a direct antitumor effect in addition to its antiangiogenic activity in colon cancer cells. *Human Gene Therapy*, 2003; 14:997-1008.
116. Du Z and Hou S. The Antiangiogenic activity of human endostatin inhibits bladder cancer growth and its mechanism. *The Journal of Urology*, 2003; 170:2000-2003.
117. Li L, Huang YH, Li Y, Wang FQ, et al. Antitumor activity of anti-type IV collagenase monoclonal antibody and its lidamycin conjugate against colon carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2005; 11(29):448-4483.
118. Yosef BY, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, et al. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circulation Research*, 2002; 90:784-79.
119. Yan Li, Moses Marsha A, Huang Sui, Ingber DE. Adhesion-dependent control of matrix metalloproteinase-2 activation in human capillary endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 2000, 113, 3979-3987

- 120.** Stahtea XN, Roussidis AE, Kanakis I, Tzanakakis GN, et al. Imatinib inhibits colorectal cancer cell growth and suppresses stromal-induced growth stimulation, MT-1 MMP expression and pro-MMP-2 activation. *Int J Cancer*, 2007; 121(12):2808-14.
- 121.** Nyberg P, Heikkila P, Sorsa T, Luostarinen J, et al. Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloprotease-2, -9, -13. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003; 278(25):22404-22411.