

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI
TÜRK KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA
VASCULAR ENDOTHELİAL GROWTH FACTOR
POLİMORFİZMLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan
HALUK ÖZHAN ŞENTÜRK

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. MEHMET BAKİ YOKEŞ

ŞUBAT, 2009

İSTANBUL

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE


Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Yüksek Lisans öğrencisi **Haluk Özhan ŞENTÜRK** tarafından hazırlanan “**Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserli Hastalarda VEGF Polimorfizmleri**” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi : 24.02.2010

(Jüri Üyesinin Ünvanı , Adı , Soyadı ve Kurumu) :

İmzası :

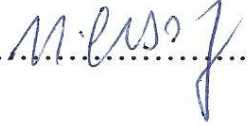
Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.Baki YOKEŞ
Danışman–HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi

.....


Jüri Üyesi : Doç.Dr.Sedat ALTIN
Yedikule Göğ.Has.Eği.ve Arş.Has. Öğr.Üyesi

.....

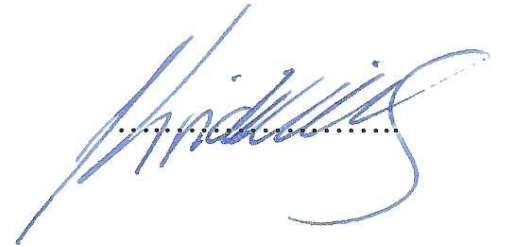
Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Nagehan ERSOY
HAL.Üniv. Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi

.....


Jüri Üyesi : Doç.Dr.İbrahim GÜNÇER
Yedikule Göğ.Has.Eği.ve Arş.Has. (Yedek)

.....

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Kürşat ÖZDİLLİ
HAL.Üniv. Hemşirelik ABD Öğr.Üyesi (Yedek)

.....


ÖNSÖZ

Bu çalışma 2007-2010 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimimi tamamladığım, T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Baki Yokeş'e saygılarımı sunar, tez çalışmam sırasında daima destek ve yardımlarını gördüğüm, engin bilgi birikimini bizlerle cömertçe paylatığı için saygı ve teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışmada kullanılan hasta materyali ve bilgilerini temin eden Yedikule Göğüs Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Başhekimisi Sayın Doç. Dr. Sedat Altın ve Cerrahi Polikliniğinde görevli Sayın Dr. Zeki Günoğlu' na ayrıca teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum yüksek lisans arkadaşlarıma ve tüm bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren sevgili anne ve babama emekleri ve bana olan inançlarından ötürü sonsuz teşekkürü borç bilirim.

İstanbul, Şubat 2010

Haluk Özhan Şentürk

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
TABLolar LİSTESİ	V
KISALTMALAR LİSTESİ	VI
Türkçe Özet	VIII
İngilizce Özet	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Akciğer Kanserinin Etiyolojisi	2
1.2. Genetik Yatkınlık	3
1.3. Anjiyogenez-Tümör İnvazyonu ve Metastaz	5
1.4. Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri	8
1.4.1. Epidermal Growth Faktör	9
1.4.2. Transforming Growth Faktör-β1	9
1.4.3. Hepatosit Growth Faktör	10
1.4.4. Fibroblast Büyüme Faktörü	10
1.4.5. Kök Hücre Faktörü	10
1.4.6. Nikotin ve Opioid Reseptörleri	10
1.4.7. Matriks Metallo Proteinazlar	11
1.4.8. PD-ECGF	11
1.4.9. VEGF	11
1.5. Akciğer Kanserinde Hedefe Yönelik Tedaviler	13
1.6. Anti VEGF Stratejileri	14
1.6.1. VEGF'e yönelik monoklonal antikolar	15
1.6.2. VEGF reseptörlerine yönelik tedaviler	15
1.6.3. VEGF reseptör tirozin kinaz inhibitörleri	15
2.AMAÇ	17

3.GEREÇLER	19
3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler	19
3.2. Kimyasallar	19
3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler	19
3.3.1. Kit ile DNA İzolasyonu	19
3.3.2. PCR Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri	20
3.3.3. Restriksiyon Enzimleri ve Restriksiyon Tamponları	20
3.3.4. Elektroforez Tamponları ve Jel sistemleri	20
3.3.5. Oligonükleotid Primerler	21
3.3.6. DNA Büyüklük Markörleri	21
3.3.7. Cihazlar	21
4.YÖNTEMLER	23
4.1. Parafin Doku Bloklarından Kit ile DNA İzolasyonu	23
4.1.1. Dokudan Parafinin Uzaklaştırılması	23
4.1.2. DNA İzolasyonu	23
4.2. DNA'nın Nitel ve Nicel Analizi	24
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	25
4.4. Restriksiyon Enzimi Analizi	27
4.5. Jel Elektroforezi	29
4.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi ve Etidyum Bromid Boyaması	29
4.6. VEGF +405G>C Polimorfik Bölgesinin Moleküler Analizi	30
5. SONUÇLAR	31
5.1. Örneklerin Tanımı	31
5.2. DNA İzolasyonu	31
5.3. VEGF +405G>C Lokusunun Moleküler Analizi	32
6. TARTIŞMA	34
7. KAYNAKLAR	37
8. ÖZGEÇMİŞ	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 1.1. Anjiogeneze etki eden elamanlar	6
Şekil 1.2. Anjiogenez ve tümör invazyonu	6
Şekil 5.1. Genomik DNA örneklerinin % 0.7'lik jelde görüntülenmesi	31
Şekil 5.2. VEGF +405 F-R PCR ürünü % 2 agaroz jelde görünümü	32
Şekil 5.3. BsmFI kesim ürünlerinin % 2 agaroz jelde görünümü	33

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Tablo 3.1. VEGF +405 polimorfik bölgesini için kullanılan primer dizileri	21
Tablo 4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçerikleri	25
Tablo 4.2. PCR Isı Döngü Şartları	27
Tablo 4.3. Restriksiyon Enzimi Kesim Şartları	29
Tablo 4.4. VEGF Gen Polimorfizmi	30
Tablo 5.1. VEGF +405 Genotip Frekansları	33

KISALTMALAR LİSTESİ

KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
TAPMG	: Toraks Derneği Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu
FISH	: Flörosan in-situ hibridizasyon
EGF	: Epitelyal büyüme faktörü
AHH	: Hydrocarbon Hydroxylase
GST	: Glutasyon S-transferaz
NAT	: N-asetil tranferaz
EGFR	: Epitelyal büyüme faktörü reseptörü
TGF-β1	: Transforming Growth Faktör-β1
HGF	: Hepatosit Growth Faktör
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
SCF/c-kit	: Stem Cell Faktör
MMP	: Matriks Metallo Proteinazlar
PD-ECGF	: Platelet Derived- Endothel Cell Growth Factor
HIF-1	: Hypoxia-inducible transcription factor-1
NO	: Nitric oxide
flt-1	: Vascular Endothelial Growth Factor Reseptör-1
ADH	: Antidiferik Hormon
KT	: Kemoterapi
5'UTR	: 5' ucu transle olmayan bölge
3' UTR	: 3' ucu transle olmayan bölge
MDY	: Mikro damar yoğunluğu
TNM	: Akciger kanserinde evreleme biçmi
MgCl₂	: Magnezyum klorür
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
mM	: Milimolar
TBE	: Tris -Borik asit- EDTA
BPB	: Bromfenol Mavisi

EtBr	: Etidyum Bromid
bç	: Baz çifti
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
SAM	: S-adenosylmethionine
U	: Ünite
mM	: Milimol
µl	: Mikrolitre

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Haluk Özhan Şentürk
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Baki YOKEŞ
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans, Şubat 2010

TÜRK KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA VASCULAR ENDOTHELİAL GROWTH FACTOR POLİMORFİZMLERİ

ÖZET

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) malign tümörlerin gelişiminde, büyümesinde ve metastazında önemli bir süreci teşkil eden angiogenesiste kritik rol oynar. VEGF +405G>C polimorfizimi için C varyant alleli taşıyan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri hastalarda cerrahi müdahale sonrası belirgin artan sağ kalım oranları tespit edilmiştir. İlave olarak VEGF +936C>T polimorfizimi için T varyant alleli taşıyan hastalar arasında sağ kalım oranları artma eğilimi göstermektedir. Ayrıca +936C>T ve +405G>C varyant allellerinin artan sayısı ile belirgin artan sağ kalım oranları rapor edilmiştir. Çalışmada VEGF +405G>C polimorfiziminin erken dönem küçük hücre dışı akciğer kanserli hastalarda cerrahi müdahale sonrası 5 yıllık sağ kalım üzerine etkisi test edilmesi amaçlanmaktadır.

Birçok erken evre KHDAK'li hasta, potansiyel küratif tedaviye rağmen kanser relapsı ile karşılaşmakta ve bu nedenle ölmektedir. Evre I KHDAK'li olup, nüks-metastaz ihtimali göreceli olarak yüksek olan hasta subgrubunun tespit edilmesi, bu hastalara agresif adjuvan tedavi uygulanması için bir dayanak oluşturabilir ve adjuvan tedavi sonrası bu hastalarda daha iyi bir sağ kalım elde edilebilir.

Anahtar Kelimeler: VEGF, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK), polimorfizm

GENERAL KNOWLEDGE

Name and Surname : Haluk Özhan Şentürk
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist. Prof.Dr.Mehmet Baki YOKEŞ
Degree Awarded and Date : Master – February 2010

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR POLYMORPHISMS IN TURKISH NON-SMALL-CELL LUNG CANCER PATIENTS

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) play an important role in the angiogenesis, which is an essential process in the development of malignant tumors. Three single-nucleotide polymorphisms (+405G>C in the 5'-untranslated region, -460T>C in the promoter region, and +936C>T in the 3'-untranslated region) are common and related to VEGF protein production. It is hypothesized that such polymorphisms may affect survival outcomes among early-stage non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. In the frame work of this thesis, we investigated the effect of VEGF +405G>C polymorphism on the survival rate of the NSCLC patients in five years after the surgical operation.

Patients with early-stage lung cancer have a chance for cure, but many will experince disease recurrence and ultimately die as a result of their lung cancer. Although TNM stage is the best clinical measure of a tumor aggressiveness and prognosis, there are clearly important differences within a stage grouping. The ability to refine prognosis with molecular markers that are readily accessible would be helpful.

Keywords: VEGF, Non-Small-Cell-Lung-Cancer (NSCLC), polymorphism

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, halen kansere bağılı ölümlerin başta gelen nedeni olup, prognozu son derece kötü olan bir hastalıktır. Akciğer kanserlerinin %80'ini küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) teşkil etmektedir. Tanı anında hastalığın evresi en önemli prognostik faktördür. Son yıllarda değişik mekanizmalarla etki gösteren, daha az yan etkisi olan çok sayıda yeni ajan KHDAK'nin tedavisinde kullanılmıştır. Tedavideki tüm gelişmelere rağmen, beş yıllık sağkalım %10-15 civarındadır.

Yeni etkin tedavi modellerinin geliştirilmesi kanserli hücrenin davranış ve biyolojisinin anlaşılması ile ilişkilidir. Bu nedenle son yıllarda akciğer kanseri moleküler biyolojisindeki çalışmalara hız verilmiş ve bu konuda önemli bir bilgi birikimi sağlanmıştır. Son 20 yıl içinde akciğer kanseri moleküler biyolojisinde ortaya çıkan gelişmeler ile uygun hasta gruplarında, konvansiyonel sitotoksik kemoterapinin yanı sıra yeni geliştirilmiş spesifik ajanların tedavide kullanımları gündeme gelmiştir.

Yeni damar yapımı (anjiogenez, neovaskülarizasyon) vücutta fizyolojik olarak yara iyileşmesi; embriyogenez, menstrüel siklus vb. durumlarda söz konusudur. Patolojik anjiogenez ise başta tümörler olmak üzere kollajen doku hastalıkları (romatoid artrit vb.), retinopatiler ve psöriasis gibi hastalıklarda mevcuttur (Parkin ve diğ., 1999). Onkolojide; tümör dokusunda gerçekleşen bu patolojik anjiogenez 1970'lerden itibaren ilgi konusu olmuştur. Günümüz teknolojisiyle birlikte anjiogenez mekanizmaları anlaşılmaya çalışılmış ve anti-anjiogenik tedavi yaklaşımları geliştirilmeye başlanmıştır. Açıktır ki; kanserli bir hastaya anti-anjiogenik tedavi uygulamak suretiyle; yara iyileşmesi, gebelik vb. gibi bir durumun olmadığı ortamda hastaya hiçbir yan etki olmadan, sadece tümörün etrafındaki damar yapımı bloke edilerek etkili ve spesifik bir tedavi yaklaşımı yapılmış olacaktır (Fidaner ve diğ., 2001; Siegfried ve diğ., 2001). Tümör ilişkili anjiogenez; spesifik büyüme faktörlerine, endotel hücre reseptörlerinin aktivasyonuna ve endotel hücrelerinin çoğalma kapasiteleri ile buna hizmet eden hücre dışı matriks

komponentlerine bağlıdır. Anjiogenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı Vascular Endotelial Growth Factor (VEGF)' dır.

Sonuç olarak son yıllarda kanser tedavisi için yapılan araştırmalarda tümör çoğalması ve metastazının mekanizmalarının anlaşılması için uğraşılmakta ve bu mekanizmaları hedef alan tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Anti-anjiogenik tedavi de bu görüşle ortaya atılmış, gerek tek başlarına gerekse konvansiyonel tedavilere ek olarak kullanılmaya başlanmış ve yan etkilerinin klasik ilaçlara göre az olmasıyla kanser tedavisinde önemli bir yer bulmuştur. Tümör biyolojisi ve onkogenez konularındaki hızlı gelişmelere paralel olarak, birçok başka tümörlerde olduğu gibi, KHDAK'de de yeni moleküler hedefler bulunmuştur. Bu biyolojik yolları hedef alan yeni ajanlar KHDAK'nin tedavisinde güncel araştırma konusu olmuşlardır.

1.1. Akciğer Kanserinin Etiyolojisi

Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken, sigara içme alışkanlığındaki artışa paralel olarak sıklığı giderek artmış ve dünyada en sık görülen kanser türü haline gelmiştir. Tüm dünyada kanser olgularının %12,8'inden ve kanser ölümlerinin %17,8'inden akciğer kanseri sorumludur. Akciğer kanseri tüm dünyada her yıl yaklaşık 1,3 milyon ölüme neden olmaktadır. Akciğer kanserinin en sık nedeni uzun süreli olarak tütün dumanına maruz kalmak olmakla beraber, tüm akciğer kanserli hastaların %15'e ulaşan bir oranı sigara içmeyenlerden olmaktadır. Akciğer kanseri birçok faktöre bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu nedenler arasında; genetik faktörler, radon gazı, asbest ve hava kirliliği gibi faktörler sorumlu tutulmaktadır.

Ülkemizde Sağlık Bakanlığının tüm sağlık kuruluşlarında tanı alan kanser olgularının kaydedildiği pasif kanser kayıt sistemi verilerine göre akciğer kanseri insidansı 11.5/100.000'dir. Sağlık Bakanlığının şimdiye kadar kuşkuyla bakılan verilerine karşılık, 2001 yılında İzmir ölçeğinde ilk defa topluma dayalı gerçek kanser insidans verileri yayınlanmıştır. İzmir Kanser İzlem Denetim Merkezi'nin 1993-1994 yılları verilerine göre akciğer kanseri tüm kanserler içinde erkeklerde %38,6'lık oranla en büyük bölümü oluşturmaktadır. Kadınlarda ise %5,2'lik oranla 7. sıradadır. İzmir il sınırında yaşayan olgular baz alınarak hesaplanan yaşa-standardize insidans, erkeklerde 61.6/100000, kadınlarda 5.1/100000 dır. Sağlık

Bakanlığı verilerine göre akciğer kanseri sıklığı batı bölgelerimizde en yüksek (Akdeniz 41.0/100.000, Ege ve İç Anadolu 39.5/100.000) Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerimizde en düşük (sırayla 17.7/100.000, 11.7/100.000) değerlerdedir.

Ülkemizdeki akciğer kanseri özelliklerini belirlemek amacıyla Toraks Derneği Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu (TAPMG) tarafından yapılan ulusal, hastane bazlı retrospektif çalışmada, 11849 akciğer kanserli olgunun % 90,4'ü erkek, % 9,6'sı kadın olup, olgular büyük oranda (% 56,7) 46-65 yaşları arasında yer almaktadır. Olguların yaklaşık %90'ında sigara kullanma öyküsü saptanmıştır (% 77,9 aktif sigara içici, % 10,8 sigarayı bırakmış). Histopatolojik olarak ABD ve Japonya'da en sık adenokanser saptanırken Asya ülkelerinde skuamöz hücreli kanser hala en sık kanser tipidir. Ülkemizde en sık skuamöz hücreli kanser (yaklaşık % 45) görülmekte, bunu benzer oranla (yaklaşık % 20) küçük hücreli kanser ve adenokanser izlemektedir. Büyük hücreli kanser % 2 oranıyla en az görülen kanser tipidir.

1.2. Genetik Yatkınlık

Tüm sigara içicilerinin sadece % 10-20' sinde akciğer kanseri gelişimi, genetik yatkınlığın önemine işaret etmektedir (Siegfried ve diğ., 1999; Wei ve diğ., 1997). Akciğer kanserli hastaların hem sigara içen hem de içmeyen akrabalarında akciğer kanseri riski 2,4 kat artmıştır. Artmış ailesel riskin; yaş, cinsiyet, mesleki maruziyet ve sigara içiciliğinden bağımsız olduğu ve akciğer kanserine predispozisyon yaratan nadir bir otozomal genin Mendelyen kodominant kalıtımı ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Wei ve diğ., 1997; Davidson ve diğ., 1993). Son 20 yıl içinde akciğer kanseri moleküler biyolojisinde ortaya çıkan gelişmeler ile belirli hasta gruplarında adjuvan tedavi, konvansiyonel sitotoksik kemoterapi veya yeni gelişmekte olan özel hedeflenmiş ajanların tedavide kullanımları gündeme gelmiştir. Bu nedenle son yıllarda moleküler biyolojiye dayanan uzun süreli sağkalımı belirleyebilecek yeni evreleme sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (Cox ve diğ., 2001; Groeger ve diğ., 1997).

Karsinogenez çok basamaklı bir süreçte değişik karsinojenlerin (kimyasal, fiziksel ve viral) etkisiyle oluşan genetik ve epigenetik hasarlanmalarla gerçekleşir. Kanserlerde oluşan genetik değişiklikler, kromozomal düzeyde (kromozom

kayıpları) ya da tek bir nükleotid düzeyinde (tek ya da multipl baz değişiklikleri ya da DNA promotor bölge metilasyonu) oluşabilir.

Kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör süpresör genler), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjiogenez, invazyon, metastaz) sonucunda tümöral kitle oluşur (Akbulut ve diğ.,1997: 180; Lecture ve diğ., 1996: 228-231).

Bazı genlerin, özellikle de karsinojen metabolizması ile ilişkili genlerdeki kalıtsal polimorfizmin çeşitli çevresel maruziyetler ile stümlasyonu sonucu bireyde akciğer kanseri gelişme olasılığının arttığı gösterilmiştir. Bunun dışında, DNA tamiri, hücre büyümesi, sinyal iletimi ve hücre siklus kontrolü ile ilişkili genler de akciğer karsinogenezinin değişik aşamalarında hasar görebilir. Akciğer kanserlerinde görülen genomik dengesizlik; pek çok kromozomal (anöploidi) ve yapısal sitogenetik anormallikleri (delesyon, amplifikasyon, nonresiprokal translokasyonları) içerir. Anöploidi, mitotik check-point (kontrol noktası) fonksiyonlarındaki kayıp ile ilişkilidir. Günümüzde genomik hibridizasyon, flörosan in-situ hibridizasyon (FISH) gibi teknikler sayesinde bu genetik ve preneoplastik hücresel değişiklikler daha ayrıntılı incelemektedir. Klinik olarak akciğer kanseri gelişene kadar 10-20 adet genetik hasarın oluşması gerektiği bilinmektedir (Fong ve diğ., 2002).

Akciğer karsinogenezinde majör genetik olaylar şöyle sıralanabilir (Jacobson ve diğ., 1999);

- Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu
- Tümör süpresör genlerin inaktivasyonu
- Hücre siklus regülasyonunda görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- Büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin değişiklikler

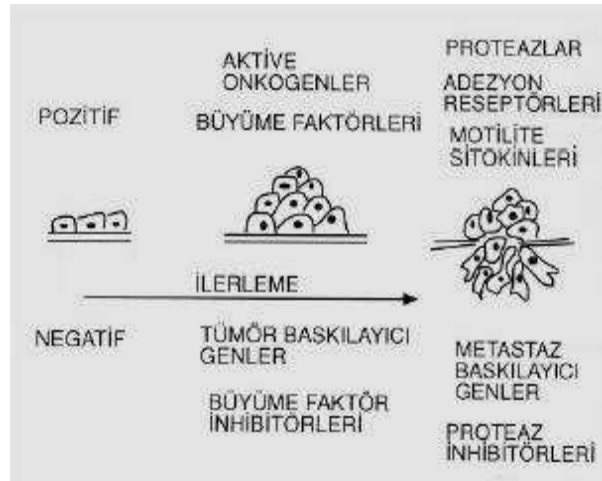
Mutasyon iki ana gen sınıfını hedef alır. Hücre çoğalmasını uyarıcı genler (onkogenler) ve tümör baskılayıcı genler. Epiteyal büyüme faktörü (EGF) reseptörünü kodlayan ERBB1 geni ve RAS protoonkogenleri daha çok KHDAK olgularında izlenen mutasyonlardan sorumludur. Son yıllarda proto-onkogen olarak adlandırılan normal ve genellikle hücrenin bölünmesi ile ilgili işlevlerde rol alan genlerin sigara dumanı, radyasyon, kimyasal ajanlar ve virüsler gibi eksojen etkenlerle onkogen haline geçerek karsinogenezde birçok gelişmelere yol açtıkları

anlaşılmıştır. Akciğer kanseri ile ilgili aktive onkogenlerin 6 familyası vardır: En önemlileri ras (H-ras, K-ras, N-ras) ve myc (N-myc, C-myc, L-myc)'dir (Richardson ve diğ., 1993). Baskılayıcı genler içinde en fazla araştırılanı ise p53 geni mutasyonudur. p53, 17p kromozomuna yerleşmiş nükleer bir fosfoprotein olup özellikle DNA hasarına cevap olarak hücre siklusunu, DNA sentezi ve onarımını, hücre differansiyasyonunu ve apoptozisi kontrol eden genleri düzenleyen proteini kodlar. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olgularının % 90'ında ve KHDAK olgularının ise % 50'sinden fazlasında bu kromozom lokalizasyonunda anormal mutasyonlar izlenebilir.

Akciğer kanseri riski ile ilişkili 2 kalıtsal faktör; Aryl Hydrocarbon Hydroxylase (AHH) sistemi ve Debrisoquin metabolik fenotipidir. Her ikisi de sitokrom p450 sisteminin parçalarıdır. AHH enzim sistemleri polisiklik aromatik hidrokarbonları ve arilaminleri güçlü karsinojenlere aktive edebilir. Ayrıca glutatyon S-transferaz (GST-M 1) ve N asetil transferaz (NAT), NNK (CYPZD 6) tütüne spesifik karsinojenler son yıllarda üzerinde durulan önemli maddelerdir (Minna ve diğ., 1999: 111).

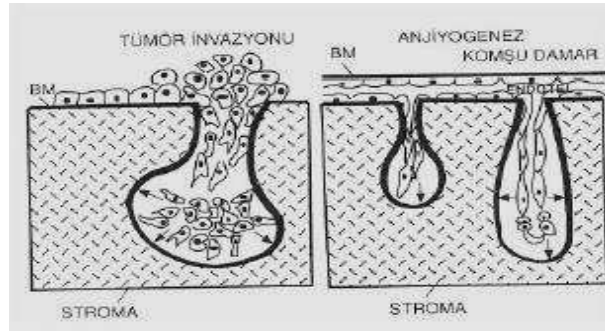
1.3. Anjiyogenez-Tümör İnvazyonu ve Metastaz

Kanser hastalarında tedavinin yetersiz olmasının en büyük nedeni tümör invazyonu ve metastazdır. Metastaz primer tümörün en erken oluşum evresinden itibaren başlar ve zaman içinde tümörün büyümesine paralel olarak büyür. Tümörler histolojik tiplerine göre farklı metastaz gücüne sahiptirler. Pek çok epitel kökenli tümörde tümör hücresinin yayılımı tümörün damarlanmasından kısa bir süre sonra meydana gelmektedir. Tümör oluşumu pozitif yönde (aktive onkogenler, büyüme faktörleri, proteazlar, motilite sitokinleri) ve negatif yönde (tümör baskılayıcı genler, büyüme faktör inhibitörleri, metastaz baskılayıcı genler, proteaz inhibitörleri) etkili olan elemanların pozitif yönde doğru kaymaları sonucunda meydana gelir (Ataerg ve diğ., 1999) (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. İnvazif kansere dönüşüm sırasında pozitif ve negatif yönde kontrol. Kontrolsüz proliferasyon sonucu bazı büyüme faktörleri ve aktive olmuş onkogenler artarken, süpresör onkogenlerde azalma meydana geliyor. İnvazyonu kolaylaştıran gen ürünlerinde artış olurken invazyonu kolaylaştıran proteinlerde kayıp meydana geliyor. (Cancer: Principles and Practice of Oncology,1997.den)

Metastaz oluşumunda ise tümör hücreleri, önce primer tümör bölgesinde çoğalır, interstisyel stromaya girer, buradaki kan damarları yoluyla dolaşıma katılırlar. Dolaşıma katılan tümör hücreleri hedef organa ulaşarak, hedef organın prekapiller venüllerinde endotel bazal membranına penetre olarak metastatik kolonileri başlatırlar (Ataerg ve diğ.) (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Anjiyogenez ve tümör invazyonu. Solda: İn situdan invazif karsinomaya dönüşüm sırasında bazal membranda lizis meydana gelerek interstisyel stromaya yayılım oluyor. Sağda: Anjiyogenezin erken safhalarında komşu damarın bazal membranında lizis meydana geliyor ve endotel stromaya doğru geçiyor. Stromada lateral proteoliz ile genişleme meydana gelerek lümen oluşuyor. (Cancer: Principles and Practice of Oncology, 1997.den)

Anjiyogenezis yeni kapiller damar gelişimi olup embriyonik gelişme, yara iyileşmesi ve organ hipertrofisi gibi fizyolojik olaylar döneminde görülmektedir. Ancak kontrolsüz anjiyogenezis birçok patolojik durumun varlığında; diyabetik

retinopati, ateroskleroz, kronik enflamasyon, tümör büyümesi ve metastazından sorumlu tutulmaktadır. Anjiogenezis ekstrasellüler matriks, solubl faktör ve hücreler arasındaki etkileşim sonucu; endotelial hücrelerin differansiasyonu, migrasyonu ve proliferasyonu ile seyreden kompleks bir işlemdir (Nie ve diğ., 2000).

Anjiogenesis birçok neoplastik ve non-neoplastik hastalığın etiopatogenezinden ve ilerlemesinden; özellikle solid tümörlerin büyüme ve metastaz yapmasından sorumlu tutulmaktadır. Tümörde hipervaskülarizasyonun başlangıçtaki bir enflamatuvar olaya cevap veya tümörün nekrotik ürünlerine bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (Mangi ve diğ., 2000).

Çoğu insan tümörü başlangıçta aylarca, hatta yıllarca vaskülarizasyonsuzdur. Fakat sonra vaskülarize olur ve hücre alt grupları anjiogenetik fenotipi başlatır. Prevasküler dönemde tümör iyi perfüze olur, nadiren 2-3 mm³ ten büyük ve milyon veya daha fazla hücre içerir. Prevasküler dönemde veya mikrometastaz döneminde hücreler hızla çoğalır, genişler, vaskülarize olur; yeni damar oluşumu yeterli olmazsa hücreler nekroza uğrar (Mangi ve diğ., 2000).

Tümör hücreleri bir veya daha fazla pozitif regülatörle uyarıldığında anjiogenik protein ekstrasvasküler matrikse geçer ve anjiogenesisi başlatır. Kanserli hastaların biyopsi örneklerinde anjiogenesisin saptanması metastaz veya rekürens tahminini sağlar. Hematolojik malignansilerde de anjiogenesisin prognostik rolü vardır. Kemik iliğinin lenfoid dokuya benzediği kabul edilmektedir. Lenf nodu, karaciğer, dalak ve lenfohematopoetik doku büyümesi ve fonksiyonu intravasküler yataktaki dolaşıma bağlıdır (Bruyn ve diğ., 1970). Tümörler yeni damar yapımını gerçekleştiremedikleri takdirde etraf damarlardan difüzyonla beslenir ve en fazla 0,5 – 1 cm³'lük hacme kadar büyüeyebilirler. Bu hacimden sonra çoğalmaları ve metastaz yapabilmeleri için anjiogenez gereklidir (Folkman ve diğ., 1971).

Tümör ilişkili anjiogenez; spesifik büyüme faktörlerine, endotel hücre reseptörlerinin aktivasyonuna ve endotel hücrelerinin çoğalma kapasiteleri ile buna hizmet eden hücre dışı matriks komponentlerine bağlıdır.

Anjiogenezde birçok ajan rol alır. Bunlar; tümör hücrelerinden, monosit, fibroblast gibi ortamdaki diğer hücrelerden ve kollajen matriksin yıkımı sonrasında açığa çıkabilirler (Klagsbrun ve diğ., 1996).

1.4. Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri

Kanser hücreleri, çeşitli hormonlar üretirler ve bu hormonların hücre yüzeyindeki reseptörleriyle etkileşimi sonucunda kendi büyümelerini otokrin yollarla stimüle ederler (Fernandes ve diğ., 1999). Neoplastik hücrelerin birçok büyüme faktörünün salınımı ile çoğalma avantajı sağladıkları bilinmektedir (Perez ve diğ., 1998: 222). Pek çok büyüme faktörü ve reseptörü akciğerde kanser hücreleri ve normal hücreler tarafından eksprese edilmektedirler (Siegfried ve diğ., 1999)

Eğer bir tümör hücresi, hem bir büyüme faktörü hem de reseptörünü taşıyorsa kendisini uyaran büyüme halkasına sahip demektir. Buna 'Otokrin Büyüme Halkası'denir. Otokrin hücreler normal hücrelerde de bulunur, ancak sadece fizyolojik uyarılara yanıt verirler. Dengeli büyüme için karşılıklı düzenleyici sistemler bir arada bulunur. Kanser hücrelerinde ise bu dengeler bozulmuştur (Hastürk ve diğ., 2000: 33-34). Ancak tek bir büyüme faktörü kanser gelişimini regüle edemez.

Pek çok büyüme faktörü ve reseptörü "multiotokrin loop" oluşturarak etki gösterirler. Metastaz ve invazyonun da bu büyüme faktörleri ve reseptörlerinin etkileşimi sonucunda ortaya çıktığı kabul edilmektedir (Siegfried ve diğ., 1999; Takanami ve diğ., 2000). KHDAK'lerinde karakteristik olarak K-ras ve EGFR ve ligandları aktive olurken, KHAK'de nöropeptidler ve reseptörleri aktive olur (Heasley ve diğ., 1998: 19-21).

Kan desteği olmayan kanser kolonileri çap olarak 1 mm'den daha fazla büyümeyizler. Yeterli kan desteği olmayan koloniler istirahat halinde değillerdir (yani hücre siklusunun G0 fazındaki gibi değillerdir): bu durumdaki koloniler tipik olarak daha hızlı proliferasyon olurlar fakat artmış proliferasyon hızına kompensatuar olarak hücre ölümü de artar. Kan akımı sağlandıktan sonra, hücre ölüm hızı azalır ve tümör hızla büyür.

Tümörler neovaskularizasyon olmaksızın ancak 1-2 mm boyuta ulaşabilirler. Tümörün büyümesi için yeni damar yapıları ile desteklenmesi gerekir (Aikawa ve diğ., 1999: 111; Pezella ve diğ., 1999: 139-141). Mikrodamar dansitesi bu yeni damarlanmanın morfolojik bir göstergesi olarak saptanmıştır ve metastaz ve sağkalımda azalma ile ilişkili bulunmuştur. Yeni damarların oluşumu, kompleks bir süreçtir ve endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu stümüle eden faktörler arasındaki dengeye bağlıdır. Bu olaylar kaskadının tetiklenmesi için tümör

hücrelerinden çeşitli enzimler, büyüme faktörleri ve anjiogenik maddeler salınması gerekir. Vasküler büyüme faktörleri olarak başlıca PD-ECGF, VEGF ve HGF tanımlanmıştır (O'Byrne ve diğ., 2000).

1.4.1. Epidermal Growth Faktör (EGF)

Transforming Growth Faktör-a(TGF-a) ve EGF Reseptörü (EGFR)EGF ve TGF-a, hücre proliferasyon ve differansiyasyonunu uyaran mitojenik etkileri gösterilmiş olan peptidlerdir. EGF, yüzey reseptörü aracılığı ile etkilerini gösterir (Groeger ve diğ., 1997). EGFR, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoproteindir. Tirozin kinazlar hem normal hücre büyümesi ile hem de malign transformasyon ile ilişkili proteinlerdir (Raymond ve diğ., 2000).

Pek çok çalışmada aberran EGFR sinyalizasyonu ve EGFR regülasyon bozukluğunun tümör gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lei ve diğ., 1998). EGFR'nün apoptozis inhibisyonu, hücre motilitesinde artış, protein sekresyonunda artış, adezyon, invazyon, hücre yaşam süresinde artış, diferansiyasyon, anjiyogenez ve metastaz gelişimi gibi pek çok olayda önemli rol aldığı gösterilmiştir (Baselga ve diğ., 2001). Yüksek düzeyde EGFR ekspresyonu ileri evre hastalık, metastatik fenotip gelişimi, sağkalımda azalma ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (Rabiasz ve diğ., 1992). KHDAK' lerinin % 13-80'inde EGFR aşırı ekspresyonu saptanmıştır. Özellikle yassı hücreli akciğer kanserlerinde normal dokunun 2-3 katı EGFR ekspresyonu söz konusudur (Perez ve diğ., 1998: 54).

1.4.2. Transforming Growth Faktör-β1 (TGF-β1)

Hücre fonksiyonlarının regülasyonunda rol oynayan bir polipeptit olup, normal epitelyal hücrelerin büyümesini inhibe eder (Takanami ve diğ., 1996). TGF-β peptidleri, hücre büyümesi, diferansiyasyonu, adezyon, migrasyon, anjiogenez, ekstrasellüler matriks formasyonu ve immün fonksiyonları etkileyen multifonksiyonel polipeptidlerdir (Takanami ve diğ., 1997). Neoplastik hücreler inhibitör aktivitelere karşı direnç geliştirirler. Neoplastik hücrelerde TGF-β1 ekspresyonu gösterilmiştir. TGF-β1'in anjiogenezde, stromal formasyonda ve immün fonksiyonlarda rolü olup, tümör progresyonuna etkisi olduğu gösterilmiştir. TGF-β1, angiogenezi stümüle eder, immün fonksiyonları baskılar, adezyon molekül ekspresyonu ve ekstrasellüler

matriks komponentini arttırarak metastatik potansiyeli arttırır (Hasegawa ve diğ., 2000).

1.4.3. Hepatosit Growth Faktör (HGF)

Plazmada bulunan ve trombositlerden sentezlenen HGF, esas olarak karaciğer rejenerasyonunda rol oynar. Epitel hücre proliferasyonu, migrasyon ve differansiyasyonunda rol oynar. HGF, normal akciğerde çok düşük düzeyde eksprese edilir. Yaralanma sırasında HGF ekspresyonu artar. Embriyonal akciğerde tomurcuklanma ve dallanmayı uyarır. KHAK ve KHDAK'lerinde HGF ekspresyonu artmıştır. Opere edilebilir KHDAK'lerinde yüksek HGF düzeyi kötü prognozu gösterir (Hastürk ve diğ., 2000: 77).

1.4.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Mezenkimal, nöronal ve epitelyal hücreler üzerine mitojenik etki gösterir. Tümör anjiyogenezini uyarır (Akbulut ve diğ., 1997: 74).

1.4.5. Kök Hücre Faktörü (SCF/c-kit)

SCF çeşitli sitokinlerin yardımıyla myeloid ve lenfoid öncü hücrelerinin proliferasyonunu arttırır, ciltteki mast hücreleri ve bazofillerin aktivasyonunu uyarır (Hastürk ve diğ., 2000: 99).

1.4.6. Nikotin ve Opioid Reseptörleri

Akciğer kanseri hücrelerinde nikotin ve opioid reseptör ekspresyonu mevcuttur. Opioidler, kanser hücrelerini baskılar ve apoptozisi uyarırlar. Aksine nikotin reseptörleri, opioidlerin apoptotik etkilerini antagonize ederler (Takanami ve diğ., 1996). Nikotin-opioid etkileşimi, akciğer kanserinin 3/4'ünde gösterilmiştir (Minna ve diğ., 1993: 77).

1.4.7. Matriks Metallo Proteinazlar (MMP)

Bronsiyal in-situ karsinomdan invaziv ve metastatik akciğer kanserine progresyon, bazal membranın yıkımı, çevre dokulara invazyon, lenf ve kan damarlarına intravazasyon, damar dışına ekstrevasasyon ve sekonder bir dokunun invazyonu sonucunda oluşur (Bolon ve diğ., 1999). Tümörün yayılımı için çeşitli derecelerde doku yıkımı gereklidir. Ekstrasellüler matriksin degradasyonu ve bazal membrana penetrasyonu tümörün invazyonu ve metastatik yayılımda önem taşır. Bu yeteneğe sahip olan MMP ailesi, proteolitik enzimlerden oluşup, KHDAK gelişiminde önemli bir yeri olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. MMP-2 (Gelatinase A)'ın aşırı ekspresyonu KHDAK' lerinde kötü prognozu gösteren bağımsız bir risk faktörüdür (Passlick ve diğ., 2000). Aynı şekilde MMP-9 bazal membrandaki tip 4 kollajeni parçalayan bir endopeptidazdır ve kötü prognozu gösteren bağımsız bir risk faktörü olarak bilinmektedir (Cox ve diğ., 2000).

1.4.8. PD-ECGF

Endotelial hücre proliferasyonu uyaran bir faktördür. Nükleik asit sentezinde kullanılan timidin fosforilaz enzim aktivitesine benzer etkisi olduğu gösterilmiştir. Özellikle karaciğer, akciğer, dalak ve lenf nodlarında PD-ECGF ekspresyonu yüksektir. O' Bryne ve arkadaşlarının 223 opere KHDAK'li hastada yaptıkları immunohistokimyasal çalışmada, VEGF ve PDECGF'nin prognostik değeri olan anjiyogenik büyüme faktörleri olduğu ve mikrodamar dansitesinin de KHDAK'lerinde prognostik öneme sahip olduğu bildirilmiştir.

1.4.9. VEGF

Anjiyogenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı VEGF' dür. VEGF 46 kilodalton ağırlığında, homodimerik, heparin-binding glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF A, B, C, D, E, ya da aminoasit sayılarına göre VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ ve VEGF₁₄₅ gibi isoformları bulunmaktadır (51). Fakat bunların dördü de endotel proliferasyonu, in vitro migrasyon ve in vivo permeabilite açısından benzer fonksiyonlar gösterirler (Houch ve diğ., 1991). VEGF, endotelial hücre büyümesinde rol oynayan

anjyogenik bir faktördür. Damar permeabilitesini artırır. Endotele spesifik mitojenik faktör olarak etki gösterir. Ekspresyonu çeşitli genlere ve proteinlere bağlı olarak değişim gösterir (Aikawa ve diğ., 1999). Mutant p53 proteini ve mutant ras ekspresyonu VEGF ekspresyonunu artırır (Rak ve diğ., 2000). VEGF₁₈₉ isoform ekspresyonunun tümör anjiyogenezi, postoperatif relaps ve sağkalım ile korelasyonunun diğer isoformlara göre daha yüksek olduğunu ve KHDAK'lerinde prognostik bir belirleyici olarak kullanılabileceği bildirmiştir (Yuan ve diğ., 2001). VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) olarak sıralanabilir. Bunlardan VEGF-R1 ve R2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGF-R3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (Kliche ve diğ., 2001). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonunu sağlar (Dvorak ve diğ., 1995). Nitric oxide (NO) ise anjiogenezin VEGF bağımlı bir mediyatörüdür. VEGF'in NO sentez enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşan NO, endotel hücre migrasyonunda rol alır (Laka ve diğ., 2000). Basta ras, src ve her-2 onkogenleri olmak üzere VEGF düzeyi; p53 gen mutasyonu, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, FGF-4, PDGF, TGF- β , IGF-1, TNF- α ve NO gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmekte ve tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonu artmaktadır (Ria ve diğ., 2000). Düşük glukoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1)'de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır (Longo ve diğ., 2002). Ayrıca, VEGF muhtemel temel anjiogenik faktör olma özelliği yanında; VEGF'e maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında fenestrasyon, veziküler organeller ve transselüler gap oluşumuna olanak sağlayarak vasküler permeabiliteyi artırır (Bates ve diğ., 2002). Endotel hücreleri için migratuar özelliğinin yanı sıra VEGF; hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile ürokinaz ve doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırır (Ferrara ve diğ., 1997). VEGF bazı ilginç özelliklere sahiptir. Aşağıda belirtilen bu özellikler kanser tedavisinde faydalı olmaktadır (Barry ve diğ., 2000: 44-47);

- VEGF, olgunlaşmış ve proliferasyon göstermeyen kan damarı endotel hücrelerinde kendi reseptörlerini indükler. Bu normal, istirahat halindeki endotel

hücrelerinin VEGF reseptörü yoktur ama VEGF'ye maruz kaldıklarında reseptörü üretirler.

- VEGF, kan damarlarının oluşumuna yol açan diğer birçok büyüme faktörünün üretimini ve aktivitesini indükler.
- VEGF, c-ras ve VEGF üretimini daha ileriye götüren diğer onkogen ve büyüme faktörleri tarafından indüklenir.
- Normal gelişim için diğer faktörlere de gereksinim duyan normal kan damarlarının aksine, VEGF tarafından indüklenen kan damarları sızdırma özelliğine sahiptir. Örneğin, fibrinojen gibi VEGF ile indüklenen plazma proteinleri yeni oluşan damarlardan dışarı sızarlar. Böylece, tümörün etrafında süngerimsi bir jel oluşur. Bu jel VEGF içerir: bu durum anjiogenezi daha da ilerletir.
- VEGF'ün, indüklenmiş epitel hücrelerinde apoptozisi baskıladığı görülmektedir. Non-metastatik paraneoplastik sendromlar tümörün kendisine veya metastazına bağlı olmaksızın gelişen bir grup bulgu ve semptomu içerir. Ektopik ACTH salgılanmasına bağlı olarak Cushing sendromu, ADH'nin artmış üretimine bağlı "uygunsuz ADH sendromu", jinekomasti, kemik metastazı olmaksızın ortaya çıkan hiperkalsemi, akantozis veya hipertrikozis gibi deri lezyoları, lökomoid reaksiyon, trombositopeni veya trombositoz gibi hematolojik değişiklikler de izlenebilir. Oldukça sık görülen ve ilerlemiş hastalığın bir bulgusu olan trombositozis ise metastatik kemik iliği tutulumuna, myeloproliferatif hastalıklara, ilaçlara, akut hemarojik episodlara ve tümörün yaptığı büyüme faktörlerine bağlıdır. Bu bulgular genellikle primer tümörün tedavisi ile geriler ve nüks durumlarında tekrarlayabilir (Haydaroglu ve diğ., 2000).

1.5. Akciğer Kanseri Hedefe Yönelik Tedaviler

Akciğer kanserinin tedavisinde yoğun bir şekilde uygulanan KT rejimlerinin etkileri geliştirilmeye çalışılmıştır. Ancak bu çabalara rağmen bu gruptaki hastaların prognozunda ilerleme sağlanamamıştır. Son 20 yıldır akciğer kanseri moleküler biyolojisinde ortaya çıkan gelişmeler ile özel olarak hedeflenmiş ajanların tedavide kullanımları gündeme gelmiştir. EGF reseptörünün hem kanser biyolojisindeki patogenetik yeri, hem de tümör gelişimindeki yeri göz önüne alındığında en çok

EGFR inhibitörlerinin akciğer kanseri tedavisindeki rolü araştırılmıştır. EGFR inhibitörü ajanlar KHDAK'de yüksek oranda eksprese edilen EGFR'nin bloke edilmesi tirozin kinaz aktivitesinin inhibe edilmesi ve sonuçta hücre aktivasyonu ve proliferasyonunun inhibisyonuna neden olurlar. Gefitinib (ZD1839,ressa) ve Erlotinib (OS 774,Tarceva) daha önce KT ile tedavi edilen hastalarda yoğun olarak kullanılan ve araştırılan ajanlardır. Bu ajanlar KHDAK'de ümit veren ajanlar olmakla birlikte rolleri tam anlaşılmış değildir, yapılan faz III çalışmalarda platin temelli kombine KT'lere eklenmeleri ile de sağ kalım avantajı sağlanamamıştır. Ancak seçilmiş hastalarda daha etkin olabilecekleri belirtilmektedir. Japon ırkında, sigara içmeyen ve adenokarsinomlu özellikle kadın hastalarda daha iyi sonuçlar bildirilmiştir. Gefitinib ileri evre KHDAK tedavisinde FDA onayı alarak 3.sıra KT ajanı olmuştur. Ayrıca moleküler hedefe yöneltilmiş tedaviler arasında hücre sinyal iletim inhibitörleri, matriks metalloproteinaz inhibitörleri, antianjiogenesis tedaviler (VEGF'ü hedefleyen Bevacizumab), antisens tedaviler, antikor tedaviler ve immünoterapiler yer almaktadır (Akkoçlu ve diğ., 2005).

Tümörler, anjiogenik faktörlerin üretimiyle karakterize dokular olduklarından, bunların ekspresyonunun ya da etkilerinin inhibisyonu tümör anjiogenezinin baskılanmasında indirek ancak etkili bir yaklaşımdır. Öncelikli hedefler içinde en çok tercih edilenler VEGF ve VEGF reseptörleridir (Güllü ve diğ., 2000).

1.6. Anti VEGF Stratejileri

VEGF'in endotel hücreleri üzerinde bulunan transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması ile tetiklenen sinyal yolu, birçok seviyede farklı açılardan inhibe edilerek, VEGF'in etkinliği önlenmektedir (Jung ve diğ., 2002; Kim ve diğ., 2002). Bu mekanizmaları 3 grupta toplayabiliriz;

- VEGF inhibitörleri
- VEGFR inhibitörleri
- Monoklonal Antikorlar

1.6.1 VEGF'e yönelik monoklonal antikorlar

rhuMab VEGF (Bevacizumab, Avastin); anti-anjiyogenik ve anti-tümör etkinliği olan rekombinant insan monoklonal VEGF antikorudur. Faz I çalışmalarında kemoterapi ile birlikte kullanıldığında serum VEGF seviyelerini ölçülemeyecek seviyelere kadar düşürdüğü ve farklı tümörlerde büyümeyi inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca yakın zamanda yapılmış randomize faz III çalışmasında metastatik kolorektal kanserli hastalarda konvansiyonel tedaviye kıyasla klasik IFL tedavisiyle kombine edildiğinde hastalarda survinin önemli derecede arttığı, tümör progresyonunda ciddi azalmanın olduğu ve tromboembolik komplikasyonda herhangi bir artış olmadığı tespit edilmiştir. (Margolin ve diğ., 1999).

VEGF-trap; Faz I çalışmaları devam eden ve monoklonal antikorlara göre VEGF'e olan affinitesi çok daha yüksek olan spesifik VEGF antagonistidir. Cilt altı uygulaması ise bir diğer önemli avantajıdır (Dupont ve diğ., 2003).

1.6.2. VEGF reseptörlerine yönelik tedaviler

VEGF sistemi aynı zamanda monoklonal antikorlarla ya da spesifik tirozin kinaz inhibitörleri aracılığıyla VEGF'in reseptörleri hedef alınarak da inhibe edilebilir. Bunlar anjiyenezde direk veya indirek olarak rol alan VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (Flk-1), Tie-1 ve Tie-2 gibi reseptörleri hedef alan küçük moleküllerdir. Bunların içinde ise en önemlisi, özellikle tümör dokusunda endotel hücre proliferasyonu ve kemotaksisinden sorumlu olan Flk-1 (VEGFR-2)' dir (Ferrara ve diğ., 1999).

1.6.3. VEGF reseptör tirozin kinaz inhibitörleri

SU5416; klinik olarak test edilmiş ilk VEGF reseptör tirozin kinaz inhibitörüdür. Parenteral uygulanan kinolon derivesi olarak SU5416, VEGFR-2 (Flk-1)'i inhibe eder (Kuenen ve diğ., 2002). Kısa yarılanma ömrü, aktif plazma konsantrasyonu için sık aralıklarla kullanılması ve özellikle gemcitabine/cisplatin kemoterapisi ile kombine kullanımda ortaya çıkan pulmoner emboli, myokardiyal enfarktüs ve serebrovasküler olay geliştirmesi kullanımını kısıtlamaktadır (Hurwitz ve diğ., 2003).

SU6668; VEGF, bFGF ve PDGF reseptörlerini inhibe eden oral kullanımlı antianjiojenik ajandır (Herbst ve diğ., 2002). Günde tek dozluk uygulamalar hastalar tarafından tolere edilebilirken doz arttıkça nefes darlığı, göğüs ağrısı ve perikardiyal effüzyona sebep olabilmektedir (Rosen ve diğ., 2001).

SU11248; ise geniş spektrumlu oral tirozin kinaz inhibitörüdür ve VEGF, PDGF, c-Kit ile Flt-3 kinaz aktivitesini inhibe eder (Mendel ve diğ., 2002).

PTK787/ZK22854; oral VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptör inhibitörüdür. Ataksia, vertigo, hipertansiyon ve venöz tromboembolizm görülen yan etkileridir. Hepatik metastazı olan kolorektal kanserli hastalarda kan akımını belirgin azalttığı gözlemlenmiştir. Kombine faz II ve III çalışmaları sürmektedir (Trarbach ve diğ., 2003).

2. AMAÇ

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Bu hastaların üçte birinden daha azı erken evrede yakalanmakta ve küratif cerrahi tedaviye rağmen anlamlı oranda relapslar meydana gelmektedir. Relapsların büyük çoğunluğu ise toraks dışı uzak metastazlar halinde izlenmektedir. Geri kalan hasta grubunda ise tedavi sınırlı bir etkinlik göstermektedir. Bu durum, bu hastalarda izlenen olumsuz seyri açıklayabilecek prognostik faktörlerin önemini ortaya koymaktadır.

Hastalığın prognozunda en önemli değişken tümörün evresidir. Cerrahi rezeksiyon sonrası 5 yıllık sağ kalım oranı evre IA tümörlerde yaklaşık %70 iken evre IIB tümörlerde %40 dır. Farklılığın nedeni çoğu erken evre tümörde hali hazırda mikroskobik düzeyde yayılmanın gerçekleşmiş olmasıdır. Günümüz modern kanser araştırmalarında standart klinik değişkenlerle (Tümör boyutu, farklılaşma ve evre gibi) tümörün intrinsik genetik ve biyokimyasal karakteristikleri harmanlanarak prognoz ve tedaviye yanıtın öngörülmesi amaçlanmaktadır. Bu karakteristik özelliklerin tanımlanmasında gen ekspresyonu çalışmaları dan (northern blot ve pcr ile) veya seçili aday protein molekülünün düzeyinin ölçümünden (immunoblot veya immunohistokimyasal teknikler kullanılarak) yararlanılır. Hücre döngüsünün regülasyonu, apoptoz ve anjiyogenesisten sorumlu pek çok gen ve protein prognostik biyomarker görevi görür.

Angiogenesis malign tümörlerin gelişiminde, büyümesinde ve metastazında önemli bir süreci teşkil eder. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) angiogenesisinde kritik rol oynar. Artan VEGF ekspresyonu tümör büyümesi ve metastaz ile ilişkilidir.

Angiogenik faktörleri veya reseptörlerini kodlayan genlerdeki polimorfizimler protein ifade oranlarını ve/veya aktivitesini değiştirebilir. Bu fonksiyonel polimorfizimler, düşük penetransta olmalarına karşın, bir popülasyonda bireyler arasında bir hastalığa olan yatkınlık derecesinin ve şiddetinin farklılaşmasına

katkıda bulunabilir. Tek başlarına bazı polimorfizimler, çevresel faktörlerin etkisi veya kombinasyonu ile anjiogenik pathwaylere etki edebilir ve bu şekilde kansere yatkınlık derecesini ve şiddetini değiştirebilir. Anjiogenik genlerdeki polimorfizimlerin rollerinin araştırılması tümör anjigenezisini daha iyi anlaşılmasını, riskli grupların saptanması ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesi için faydalı olabilir. Solid kanserlerdeki anti-anjiogenik tedavinin etkinliğinin geliştirilmesi bireydeki anjiogenik potansiyelin genotipik esaslara dayalı olarak tahmin edilmesiyle mümkün olabilir.

Üç tek nükleotid polimorfizimi (5'UTR bölgesinde +405G>C, promotor bölgesinde -460T>C ve 3' UTR bölgesinde +936C>T) genel ve VEGF protein üretimi ile ilişkilidir. VEGF +405G>C polimorfizimi için C varyant alleli taşıyan KHDAK'li hastalarda cerrahi müdahale sonrası belirgin artan sağ kalım oranları tespit edilmiştir. İlave olarak VEGF +936C>T polimorfizimi için T varyant alleli taşıyan hastalar arasında sağ kalım oranları artma eğilimi göstermektedir. Ayrıca +936C>T ve +405G>C varyant allellerinin artan sayısı ile belirgin artan sağ kalım oranları rapor edilmiştir.

Çalışmada VEGF +405G>C polimorfiziminin erken dönem küçük hücre dışı akciğer kanserli hastalarda cerrahi müdahale sonrası 5 yıllık sağ kalım üzerine etkisi test edilmesi amaçlanmaktadır. Bunu yaparken doku düzeyinde VEGF protein ifade oranları ve tümör doku kesitlerinde gözlenen mikrodamar yoğunluğu ile karşılaştırma yapılması hedeflenmektedir. Primer meme kanseri vakalarında doku kesitlerinde gözlenen mikro damar yoğunluğu ile nodal metastaz ve sağ kalım arasında bağlantı saptanmıştır. Benzer şekilde, diğer birçok kanser türünde vaskularite ve invaziv davranış arasında bağlantı rapor edilmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda VEGF Polimorfizimleri ve doku düzeyinde ifade oranları tek bir çalışma olarak yayınlanmamıştır. Bu şekilde literatürde bir boşluk doldurulabilir.

3. GEREÇLER

3.1 Çalışmada Kullanılan Örnekler

Bu çalışma retrospektif bir olup araştırmadaki hasta grubu örnekleri, Ocak 1999 ile Aralık 2007 tarihleri arasında İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri teşhisi konulan hastalardan alınmıştır. Başlangıç materyali olarak kan örnekleri mevcut olmadığından patolojik parafin doku blokları kullanılmıştır. DNA analizi parafin bloklardan alınan 10-15 µm.lik kesitlerden DNA izole edilerek yapılmıştır. Hastaların cinsiyet, yaş, doğum yeri, meslek gibi demografik bilgilerine ve ayrıca sigara içim durumu, miktar ve süresi bilgileri patoloji arşivi hasta kayıt dosyalarından elde edilmiştir.

Bu çalışmada KHDAK tanısıyla torakotomi yapılmış olan, patolojik evreleme sonucunda T1 veya T2-N0M0 evrelerindeki, rezeksiyonu komplet olarak başarılı ve kayıtlarına ulaşılmış, operatif mortalite gelişmemiş toplam 66 hasta değerlendirildi.

3.2 Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan tüm katı ve sıvı kimyasallar moleküler biyolojik kullanıma uygun olup, aksi belirtilmediği takdirde marka olarak Sigma (ABD) ya da Merck (ALMANYA) tercih edilmiştir.

3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler

3.3.1 Kit ile DNA İzolasyonu

Parafin doku blok kesitlerinden DNA izolasyonu amacıyla QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, ALMANYA) kullanılmıştır.

3.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri

10x MgCl ₂ 'süz Tampon (Fermentas, LİTVANYA)	: 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 750 mM Tris-HCl (pH 8.8) % 0.1 Tween 20
MgCl ₂ (Fermentas, LİTVANYA)	: dH ₂ O'da 25 mM
Deoksiribonükleotidler (dNTP) (Fermentas, LİTVANYA)	: 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Taq DNA Polimeraz (Fermentas, LİTVANYA)	: Rekombinant Taq DNA Pol

3.3.3 Restriksiyon Enzimleri ve Restriksiyon Tamponları

BsmFI (FaqI) (Fermentas, LİTVANYA)	: 2 u/μl
Reaksiyon Tamponu (Fermentas, LİTVANYA)	: Tango Buffer + SAM 33 mM Tris-acetate (pH 7.9) 10mM magnesium acetate 66 mM potassium acetate 0.1mg/ml BSA 0.05mM S-adenosylmethionine
Tanıma Dizisi	: 5' GGGAC(N) ₁₀ ^ 3' 3' CCCTG(N) ₁₄ ^ 3'

3.3.4. Elektroforez Tamponları ve Jel sistemleri

10X TBE	: 890 mM Tris-Base 890 mM Borik Asit 20 mM Na ₂ EDTA.2H ₂ O (pH 8.3)
10X Bromfenol Mavisi (BPB)	: 2.5 mg/ml BPB
Etidyum Bromid (EtBr)	: 10 mg/ml
% 1 veya %2' lik Agaroz Jel	: 0.5X TBE Tamponunda %1 veya %2 (w/v) agaroz

3.3.5. Oligonükleotid Primerler

Tablo 3.1 VEGF +405G>C polimorfik bölgesi için kullanılan primer dizileri

Genetik Polimorfizm	Primer Dizisi
VEGF 405G>C polimorfizmi	F-5'-TGT GCG TGT GGG GTT GAG GG-3' R-5'-GTC TGT CTG TCT GTC CGT CA-3'

3.3.6. DNA Büyüklük Markörleri

GeneRuler 50 bç DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)	: 50, 100, 200, 250, 300, 400,500, 600,700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü
GeneRuler 100 bç DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)	: 80, 100, 200, 300, 400, 500,600,700,800,900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü
	:
	:

3.3.7. Cihazlar

Otoklav (BBS, TÜRKİYE)	: Dik Tip Otoklav
Tartılar (Presica, İSVİÇRE)	: Hassas Terazi, XB 220 A
Santrifüjler (Eppendorf, ALMANYA)	: Minispin Plus
Derin Dondurucular (Arçelik, TÜRKİYE)	: -20°C, 2021 D
Dokümantasyon Sistemi (BİO-RAD, İTALYA)	Bio-RAd Universal
Yatay Elektroforez Sistemleri (İNGİLTERE)	Flowgen

Isı Bloğu (İNGİLTERE)	Techne DB 2D
Güç Kaynakları (İTALYA)	BİO-RAD PowerPac Basic
Manyetik Karıştırıcılar (ALMANYA)	Heidolph, MR 301
Buzdolabı (TÜRKİYE)	Beko 8740, Arçelik
Spektrofotometre (JAPONYA)	Schimadzu UV 1601
Thermo-Cycler (İNGİLTERE)	Techne TC-512
Vorteks (ALMANYA)	Heidolph REAX
Su Banyosu (TÜRKİYE)	Nüve BM 402
Su Arıtma Sistemi (FRANSA)	Milipore Milli Q

4. YÖNTEMLER

4.1. Parafin Doku Bloklarından Kit ile DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu amacıyla QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, ALMANYA) kullanılmış ve iki aşamalı olarak aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

4.1.1. Dokudan Parafinin Uzaklaştırılması

- 25-50 mg formalinle tespit edilmiş, parafin bloğa gömülmüş doku örneklerinden 10µ kalınlığında 10-20 yaprak kesilerek, 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alındı.
- 1 ml ksilol eklendi, 56 °C'de 15 dakika beklendi. 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü. Bu işlem 3-4 defa tekrarlandı.
- 1 ml %100 etanol eklendi, 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü.
- 1 ml %80 etanol eklendi, 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü.
- 1 ml %60 etanol eklendi, 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü.
- 1 ml %40 etanol eklendi, 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü.
- 1 ml çift distile su eklendi, 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü.

4.1.2. DNA İzolasyonu

- Dokular 200 µl "lisis buffer" ve 40 µl proteinaz K ile karıştırıldı, 37 °C'de 1 gece bekletildi.

- Üzerine 20 µl proteinaz K eklendi, 1-2 saat 55 °C’de bekletildi
- Üzerine 200 µl “bağlanma buffer” eklendi, +70 °C’de 10 dakika beklendi.
- Üzerine 100 µl isopropanol eklendi, karıştırıldı.
- Filtreli tüplerin altını örnek sayısı kadar dizip üzerine filtreli tüp koyduktan sonra kapağını kapatıp üstlerine numaraları yazıldı.
- Karışım filtreli tüplere konuldu, 1 dakika 8.000 rpm’de santrifüj edildi.
- Alttaki tüp atıldı, yerine temiz tüp kondu.
- Filtreli tüpün üzerine 500 µl “uzaklaştırıcı buffer” eklendi, alt üst edildikten sonra 1 dakika 8.000 rpm’de santrifüj edildi.
- Alttaki tüp atıldı, yerine temiz tüp kondu.
- Filtreli tüpün üzerine 500 µl “yıkama buffer” eklendi, alt üst edildikten sonra 1 dakika 8.000 rpm’de santrifüj edildi.
- Alttaki tüp atıldı, yerine temiz tüp kondu.
- Son iki basamak tekrarlandı. Sonra alttaki tüpün içindeki sıvı döküldü ve tekrar filtreli tüpün altına konup maksimum hızda 13.000 rpm’de tekrar santrifüj edildi.
- 1.5 ml ependorf tüpün kapağına numara yazılıp filtreli tüp bu ependorfun içine kondu ve üzerine 200 ml. +70 °C’de ısıtılmış “sulandırma buffer” eklendi, 1 dakika 8.000 rpm’de santrifüj edildi.

4.2. DNA’nın Nitel ve Nicel Analizi

İzole edilen genomik DNA, ekstraksiyon prosedürü sırasında DNA fragmentasyon olasılığına karşı test edilir. Bu amaçla yüzde % 0.7’ lik (ağırlık/hacim) jel hazırlanır, elde edilen örnekler jele yüklenir ve yürütülür, elektroforez işlemi sonrası UV ışık altında tek ve sıkı bir bant gözlenmesi DNA örneğinde fragmentasyon olmadığı şeklinde yorumlanır. Çıkarılan DNA’nın miktarı ve kalitesi, bu özellikleri bilinen bir DNA standardı ile karşılaştırılarak tahmin edilir.

DNA izolasyonunda kullanılan yöntemin yanı sıra DNA kaynağı olarak kullanılan materyalin niteliği de elde edilen verimi etkiler. Materyalin işlenme biçimi,

yaşı ve saklanma koşulları önemlidir. Örneğin parafine gömme işlemi sırasında ortamdaki fenolün yeterince uzaklaştırılmaması izolasyon sonrasında gerçekleştirilecek PCR reaksiyonunda inhibe edici etki gösterir. Parafine gömülü dokulardan DNA izolasyonu sonucu genomik DNA 500-600 baz çiftlik fragmanlar şeklinde elde edilir. Bu sebeple izolasyon sonrası PCR reaksiyonunda kalıp DNA görevi görecektir. Fragmanlar hedeflenen bölgenin uzunluğunu belirler. Tipik jel görüntüsü smear şeklindedir, genomik DNA jelde kuyucukların hemen altında yer alır. Ayrıca mitokondrial DNA bant oluşumu gösterebilir.

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm. dalga boyundaki ışığı maksimum emme özelliği taşıdığından, bu dalga boyundaki emme derecesi nükleik asitlerin miktarının bir ölçüsüdür. Buna göre DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm. dalga boylarında elde edilecek değerlerden belirlenebilir. 1 optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml. tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml. ve oligonükleotidler için ise 20 µg/ml'ye karşılık gelmektedir. İzole edilen DNA çift iplikli ise, miktarının belirlenmesi için aşağıdaki formülden yararlanılır.

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) = \text{seyreltme faktörü} \times A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

260 ve 280 nm dalgaboyları arasındaki oran DNA'nın saflığı ve kalitesi hakkında fikir verir. Bu oran en iyi saflaştırılmış DNA'da yaklaşık 1.8'dir. 1.8'den büyük değerler RNA kontaminasyonunu, düşük değerler ise protein kontaminasyonunu işaret eder.

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) moleküler genetikte kullanılan en temel tekniklerden biridir. Belirli DNA dizilerinin enzimatik sentezi için kullanılan bir metottur ve bir çeşit in vitro klonlamadır. Genetik tanı, gen klonlaması, babalık tayini, nokta mutasyonları analizi, prenatal tanı da ve birçok diğer uygulama alanı olması nedeniyle çok önemli bir keşif olarak biyoloji bilminde yeni ufuklar açmıştır.

Her PCR, istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur. PCR'ın temel prensibi, iki kısa sentetik oligonükleotid primerin her birinin DNA'da istenilen

bölgenin homolog zincirlerinin karşı uçlarına bağlanacak şekilde hibridize edilmesi ve bu bölgenin polimeraz enzimi ile çoğaltılmasının sağlanmasıdır.

Tipik bir PCR reaksiyonu çoğaltılacak DNA'yı, istenilen bölgeyi hedefleyen ileri ve geri primerleri, reaksiyon tamponunu, MgCl₂, dNTP'leri ve Taq polimeraz enzimini içerir. Taq polimeraz aktivitesi için serbest Mg⁺² iyonlarına ihtiyaç duyulur. Reaksiyon tamponu enzim aktivitesi için gerekli iyonları içerecek şekilde hazırlanır ve dNTP'lerde DNA sentezi için gerekli nükleotidleri sağlar. Nükleotidler iki değerlikli kationları yakaladığı için Mg⁺² konsantrasyonunu nükleotid konsantrasyonundan biraz daha fazla tutulmalıdır. Mg⁺² ve diğer tuzlar primerlerin kalıp DNA'ya hibridizasyonunu engelleyebilirler.

Kalıp denatürasyonu, primer bağlanmasını ve bağlanan primerlerin ısıya dayanıklı Taq polimeraz tarafından uzatılmasını içeren döngünün seri halde tekrarı, sınırları primerlerin 5' uçları tarafından belirlenen özel fragmanın üstsel artışı ile sonuçlanır. Bir döngüde primer uzaması ile sentezlenen ürün bir sonraki döngüde kalıp görevi göreceği için DNA kopyalarının sayısı teorik olarak her döngüde ikiye katlanacaktır. Oluşan ürün; başlangıç DNA miktarı ve döngü sayısına bağlıdır. Sonuç olarak 30 döngülük bir PCR hedef DNA dizisini milyonlarca kez katlayacak bir ürün verebilir. Ancak zamana bağlı olarak enzim aktivitesinde düşüş ve serbest nükleotidlerin azalması sonucu verimin düşmesi kaçınılmazdır. Standart bir PCR protokolü yoktur. Bileşenler çoğaltılacak DNA bölgesinin özelliklerine göre değişir.

PCR reaksiyonunda kullanılacak enzim tipinin seçimini yapılacak amplifikasyonun koşulları belirler. Bir tek enzim kullanıldığı gibi kombinasyon da oluşturulabilir. Termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*' dan elde edilen Taq DNA polimeraz ve modifikasyonları neredeyse tüm DNA amplifikasyonlarında kullanılır. Diğer DNA polimerazlar da birbirlerinden nükleotid ekleme hızları, yarılanma ömürleri, ısı tolerans farklılıkları, eksonükleaz özelliklerinin olup olmaması gibi yönleriyle ayrılırlar. Hot-start DNA polimeraz enzimleri non-spesifik ürün oluşumunu engellemesi, yüksek ısılara dayanabilmesi, düşük annealing ısılarında da çalışabilmesi gibi nedenlerle tercih edilmektedir.

Bu çalışmada yapılan polimeraz zincir reaksiyonu şartları Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçeriği

VEGF 405G>C Hedef Bölgesi Reaksiyon Bileşenleri	
Tampon (10X)	(NH ₄) ₂ SO ₄
MgCl₂ (mM)	2
dNTP (mM)	0.4
Primerler (pmol)	0.4
Taq Polimeraz (u)	1
DNA (ng)	50-100
Toplam Hacim(µl)	25

Tablo 4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon Koşulları

PCR Isı Döngü Şartları	
	VEGF 405G>C
Başlangıç	
Denatürasyonu	94°C, 5 dk
Denatürasyon	94°C, 30 sn
Bağlanma	55°C, 1 dk
Uzama	72°C, 1 dk
Son Uzama	72°C, 5 dk
Döngü Sayısı	30

4.4. Restriksiyon Enzimi Analizi

Restriksiyon endonükleazların doğal biyolojik fonksiyonu, bakteriyel savunma mekanizmasında oynadıkları roldür. Bakteriler hücre içine giren yabancı DNA'ları özel endonükleazlar aracılığıyla tanıyıp keserler ve bu sayede belirli bakteriyofajlara direnç gösterir ve büyümelerini sınırlarlar. Bu özel endonükleazlar restriksiyon enzimleri veya restriksiyon endonükleazları olarak adlandırılır. Günümüzde 300'e yakın farklı DNA dizilimini tanıyan yaklaşık 3000'den fazla restriksiyon endonükleaz varlığından söz edilmektedir.

Restriksiyon enzimleri veya diğer adıyla restriksiyon endonükleazları çift zincirli DNA'yı şeker fosfat bağından kopararak keser. Bu kesim çift zincirin karşılıklı fosfat bağlarında simetrik veya asimetrik şekilde olabilir. Kesim simetrik

ise DNA parçaları herhangi bir şekilde birbirine tutunamayacağı için küt uç oluşur, fakat enzim DNA'nın her iki zincirini tam karşılıklı kesmemiş ise yapışkan uçlar oluşur ve bu uçlardaki bazlar hidrojen bağı kurarak birbirine tekrar yapışabilir. Her restriksiyon enzimi DNA üzerinde 4-6 baz çiftlik belirli bir diziyi tanır ve ancak bu tanıma bölgesi bulunduğu zaman DNA'yı bu bölgeden veya bu bölgeye belirli bir uzaklıktan ve de her tanıma bölgesi için bir kesim yapacak şekilde ayırır. Bu bakımdan restriksiyon endonükleazları moleküler biyolojide oldukça kullanışlı enzimlerdir ve günümüzde çeşitli bakterilerden saflaştırılan, farklı tanıma bölgelerine sahip, kör ve yapışkan uçlu kesim yapabilen pek çok restriksiyon enzimi ticari olarak mevcuttur. Farklı tanıma bölgelerine sahip pek çok enzimin var oluşu bu enzimlerin ilgili gen üzerinde oluşan bir mutasyonu veya polimorfizmi taramak için sıkça kullanılmasına olanak sağlamıştır. Tek bir baz çiftinin değişimi ile oluşan bir mutasyon restriksiyon enzim bölgesinin ortadan kalkmasına veya yeni bir kesme bölgesi oluşmasına neden olabilir. Restriksiyon enzim analizi ile tespit edilebilen mutasyonun saptanmasında kullanılan yaklaşım, mutasyonun bulunduğu bölgenin PCR ile çoğaltılması ve çoğaltılan DNA'nın mutasyona özgü restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra analiz edilmesinden ibarettir.

Tipik bir restriksiyon PCR ürünü, enzim tamponu, restriksiyon enzimi ve su içerir. Reaksiyon tamponu son konsantrasyon 1X olacak şekilde konur. Reaksiyon sıcaklığı kullanılan restriksiyon enziminin optimum çalışma sıcaklığı olmalıdır. Çok yüksek sıcaklıklar enzim bozulmasına ve deaktivasyona yol açarken çok düşük sıcaklık enzim aktivitesini düşürür veya tamamen durdurabilir. Yüksek enzim konsantrasyonu star aktivitesine yol açıp spesifik olmayan fazla kesilmelere yol açacağından enzim konsantrasyonu kullanılan DNA miktarına göre doğru ayarlanmalıdır. Enzim konsantrasyonunun düşük olması ise reaksiyon süresini uzatır. Reaksiyon süresi, kullanılan enzim ve DNA oranı ile enzimin türüne bağlıdır. Reaksiyon süresinin gereğinden fazla tutulması yine star aktivitesine yol açabilir. Bu yüzden enzim miktarı, DNA miktarı ve reaksiyon süresi doğru ayarlanıp optimize edilmelidir. Bu tezde kullanılan enzimlerin optimize olmuş şartları Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Restriksiyon Enzimi Kesim Şartları

Restriksiyon Enzimi	Miktar (U)	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)
BsmFI	1	37°C	Gece Boyu

4.5. Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi DNA fragmanlarını tespit etmek ve ayırmak için standart bir metottür. DNA fragmanları uygun bir tampon içine bir jele yüklenmiş olarak negatif elektrottan (katot) pozitif elektrota (anot) yürütülerek ayrılır. DNA iskeletindeki negatif yüklü fosfat gruplarının varlığı nedeni ile DNA molekülleri anoda doğru yürür. DNA bantları etidyum bromid (EtBr) veya gümüş boyaması ile görünür hale getirilir.

4.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi ve Etidyum Bromid Boyaması

Agaroz jel elektroforezi DNA fragmanlarını moleküler ağırlıklarına göre ayırır. değişik agaroz konsantrasyonları değişik ayırım kapasitesi sağlar. Yüksek konsantrasyonlar kısa fragmanları ayırmada daha spesifiktir.

Agaroz jel, agarozun 0.5X TBE tamponu içinde çözülmesi ve kaynatılması ile hazırlanır. EtBr, son konsantrasyon 0,5 mg/ml olacak şekilde ve degradasyonu engellemek için jel solüsyonu 50°C'ye soğutulduktan sonra konur. Solüsyon jel kabına dökülür, taraklar yerleştirilir ve jel polimerize olması için beklenir. Polimerizasyondan sonra jel içinde 0,5 TBE tamponu bulunan yatay jel elektroforezi aparatına konur, taraklar jelden nazikçe çıkarılır ve böylece örnekleri yüklemek için kuyucuklar oluşturulmuş olur. Örnekler BPB yükleme tamponu ile son konsantrasyon 1X olacak şekilde karıştırılır ve mikropipet kullanılarak jeldeki kuyucuklara yüklenir. Elektrik akımı verilmesi ile birlikte DNA anoda doğru hareket etmeye başlar. Agaroz jeller genellikle 100-150 Voltta (V) 10-45 dakika yürütülür. Voltaj yükseldikçe agaroz jelin ayırma gücü azalır. DNA fragmanlarının optimum ayırımını sağlamak için 5V/cm akım uygulanmalıdır. Elektroforez tamamlandığında DNA bantları UV ışık altında gözlenebilir.

Bu çalışmada PCR örnekleri ve restriksiyon enzimi kesim ürünlerinin tamamı %2'lik agaroz jelde EtBr boyaması ile UV ışık altında gözlenmiş ve görüntülenmiştir.

4.6. VEGF +405G>C Polimorfik Bölgesinin Moleküler Analizi

Bu tezde Vascular Endothelial Growth Factor geni ifade oranlarını değiştirdiği bilinen VEGF +405G>C polimorfizmi ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) hastalarda cerrahi müdahale sonrası 5 yıllık sağ kalım üzerine etkisi PCR-RFLP metodu kullanılarak araştırılmıştır. Polimorfik gen bölgesi uygun primerler ve enzimler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve bunu takiben polimorfik DNA dizileri, restriksiyon enzim kesimi ve agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. PCR ürünleri ve kesim sonrası oluşan fragmanların boyları Tablo 4.4.'de gösterilmiştir. Saptanan polimorfizmlerin verileri istatistiksel olarak incelenmiştir.

Tablo 4.4. VEGF Gen Polimorfizmi

Polimorfik Bölge	SNP Numarası	Kesim Enzimi	Beklenen Allel Boyutu
VEGF 405G>C	rs2010963	BsmFI	C=304 G=203+101

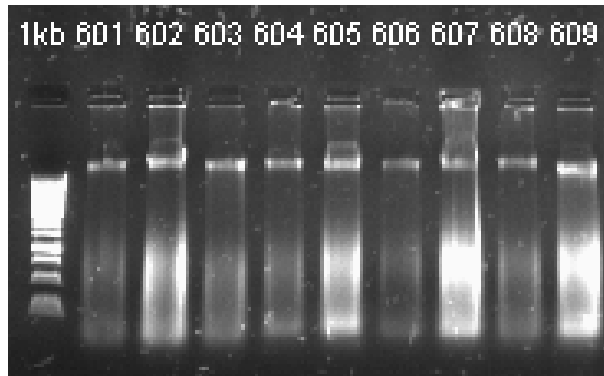
5. SONUÇLAR

5.1.Örneklerin Tanımı

Bu araştırmada Ocak 1999 ile Aralık 2007 yılları arasında KHDAK tanısıyla torakotomi yapılmış olan, patolojik evreleme sonucunda T1 veya T2-N0M0 evrelerindeki, rezeksiyonu komplet olarak başarılmış ve operatif mortalite gelişmemiş toplam 66 hasta değerlendirildi.

5.2 DNA İzolasyonu

Hasta grubuna ait parafin doku bloklarından kalın kesitler alınarak bölüm 4.1’de anlatılan yöntemlerle DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri 3 µl alınarak % 0.7 agaroz jelde incelenmiştir ve yürütölen prosedür sonucu oluşan fragmantasyon düzeyi ve olası mRNA kontaminasyonunun varlığı izlenmiştir (şekil 5.1.). Sağlıklı bireylerden alınan yanık içi epitelyum hücrelerinden izole edilen DNA deneylerde kontrol amaçlı olarak kullanılmıştır.



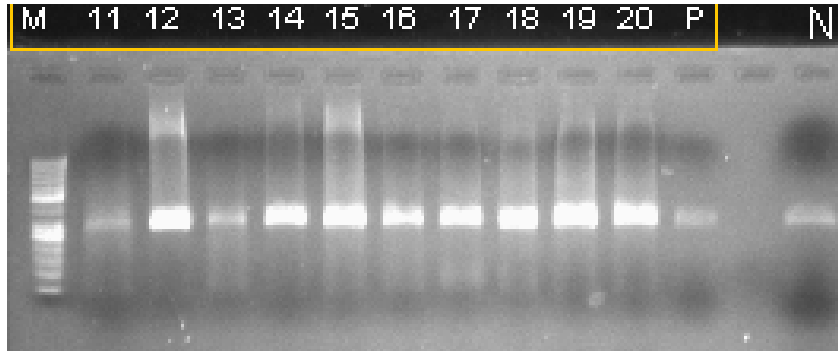
şekil 5.1. Genomik DNA örneklerinin % 0,7’lik agaroz jelde görönumü (1 kb markör)

5.3. VEGF +405 G>C Lokusunun Moleküler Analizi

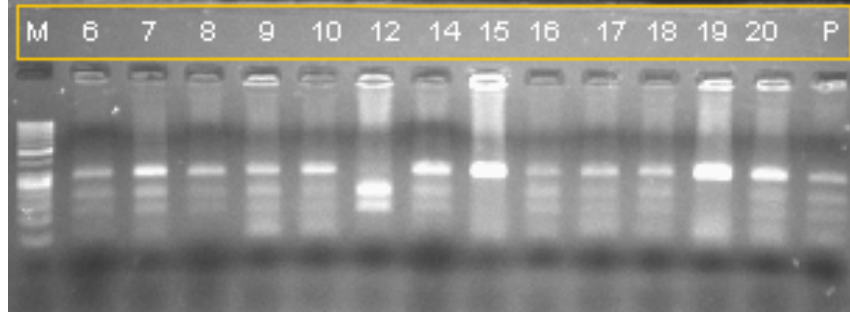
Bu çalışmada VEGF geni +405 bölgesinde yer alan polimorfizimlerin KHDAK hastalarda sağkalım üzerine etkisi test edilmeye çalışılmıştır. Özellikle azalan VEGF üretimi ile ilişkili VEGF +405C allelinin cerrahi rezeksiyon sonrası tek tek bireylerde sağkalım üzerine etkisi sorgulanmıştır.

Gerçekleştirilen bu retrospektif çalışmada araştırılan VEGF polimorfik bölge, hastalara ait DNA örnekleri kullanılarak bölüm 4.4.'te belirtilen şartlarda PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Çoğalan gen bölgeleri agaroz jel elektroforezi ve EtBr boyaması ile UV ışığı altında görüntülenmiştir. Başarılı bir şekilde amplifiye olan bölgeler bölüm 4.5.'te belirtilen şartlar kullanılarak restriksiyon analizine tabii tutulmuş ve ardından agaroz jel elektroforezi yöntemi ile incelenmiştir. Restriksiyon analizi ile belirlenen aleller DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır.

+405 G>C polimorfik bölgesi için C alelli düşük plazma VEGF düzeyi ile ilişkilidir. +405 G>C polimorfik bölgesinin MZF1 transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi içinde yer aldığı ve C alellinin bağlanma spesifitesini düşürdüğü düşünülmektedir. VEGF geni üzerinde +405 G>C mutasyonunu bulunduran polimorfik bölge, VEGF +405 Forward ve Reverse primerleri ile sınırlandırılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmış, 304 bç'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiş ve % 2 agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 5.2.). PCR ürünleri BsmFI restriksiyon enzimi ile kesilen amplifikasyon ürünleri % 2 agaroz jelde (% 0.5 EtBr içeren) görüntülenmiştir. G alelli için 304 bç'lik PCR ürününün BsmFI enzimi ile kesimi 203bç ve 101 bç'lik fragmentler oluşturmaktadır. C alelli için kesilmemiş tam uzunluktaki 304 bç'lik fragment gözlenir (Şekil 5.3.).



Şekil 5.2. VEGF +405 F-R PCR ürünü % 2 agaroz jelde görünümü (50 bç markör)



Şekil 5.3. BsmFI kesim ürünlerinin % 2 agaroz jelde görünümü (50 bç markör)

Tüm restriksiyon ürünlerinin kesim paternleri incelenerek hastaların taşıdıkları genotip frekansları ve aleller belirlenmiştir (Tablo 5.1.).

Tablo 5.1. VEGF +405 Genotip Frekansları

Genotip	Frekans	%
GG	3	4.5
GC	53	80.3
CC	10	15.2

Genotip dağılımının Hardy-Weinberg Dengesine uyumluluğu bakıldığında, X2 değeri 25,73 olarak hesaplanmaktadır. Genotip dağılımı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). Hastalardaki bu genotip dağılımı rastlantısal değildir.

6. TARTIŞMA

İnsan genomundaki genetik varyasyon, genetik ve çevresel faktörlerin birlikte karakterize ettiği kompleks hastalıklardan biri olan kanser araştırmaları için çok güçlü bir kaynaktır. Popülasyona atfedilen kanser kalıtımının az rastlanan gen hataları ile değil, genellikle DNA dizisindeki polimorfik varyasyonlarla ilişkili olduğu giderek anlaşılır hale gelmiştir. Bu görüş, akciğer kanseri dahil olmak üzere pek çok kanser oluşum mekanizması için kabul edilmiştir. Çoğu kanser türü, genomik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimlerinin bir sonucudur.

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Bu hastaların üçte birinden daha azı erken evrede yakalanmakta ve küratif cerrahi tedaviye rağmen anlamlı oranda relapslar meydana gelmektedir. Relapsların büyük çoğunluğu ise toraks dışı uzak metastazlar halinde izlenmektedir. Geri kalan hasta grubunda ise tedavi sınırlı bir etkinlik göstermektedir. Bu durum, bu hastalarda izlenen olumsuz seyri açıklayabilecek prognostik faktörlerin önemini ortaya koymaktadır.

Hastalığın prognozunda en önemli değişken tümörün evresidir. Cerrahi rezeksiyon sonrası 5 yıllık sağ kalım oranı evre IA tümörlerde yaklaşık %70 iken evre IIB tümörlerde %40 dır. Farklılığın nedeni çoğu erken evre tümörde hali hazırda mikroskobik düzeyde yayılmanın gerçekleşmiş olmasıdır. Günümüz modern kanser araştırmalarında standart klinik değişkenlerle (Tümör boyutu, farklılaşma ve evre gibi) tümörün intrinsik genetik ve biyokimyasal karakteristikleri harmanlanarak prognozun ve tedaviye yanıtın öngörülmesi amaçlanmaktadır. Bu karakteristik özelliklerin tanımlanmasında gen ekspresyonu çalışmaları dan (northern blot ve per ile) veya seçili aday protein molekülünün düzeyinin ölçümünden (immunoblot veya immunohistokimyasal teknikler kullanılarak) yararlanır. Hücre döngüsünün regülasyonu, apoptoz ve anjiyogenesisten sorumlu pek çok gen ve protein prognostik biyomarker görevi görür.

Memeli hücreleri yaşayabilmek için oksijen ve besin maddelerine ihtiyaç duyarlar ve bu nedenle kan damarlarının 100-200 µm yakınında olacak şekilde konumlanırlar, bu mesafe oksijenin difüzyon limitine eşdeğerdir. Çok hücreli organizmalarda büyüme için vaskulogenezis ve anjiogenezis ile yeni kan damarlarının oluşumu gereklidir. Bu süreç pro- ve anti anjiogenik moleküller arasındaki bir denge ile düzenlenir. Çeşitli hastalıklarda özellikle kanserde bu denge ortadan kaybolur. Kan damarları olmaksızın, tümörler kritik boyuta ulaşamazlar ve başka bir organa metastaz yapamazlar. Benzer şekilde, etkin kan dolaşımını olmaksızın tümörün her bölgesine efektif miktarda anti kanser ilaçlarını yönlendirmemiz mümkün olmazdı. Tümör büyümesi ve metastazının anjiogenezis bağımlı olması nedeniyle anjiogenezisi bloke etmek tümör büyümesini engellemede etkin bir strateji olarak kimi kanser türlerinde kullanılmaktadır. Kanserleşmekte olan dokular anjiogenik kapasite kazanmaktadırlar. Pro-anjiogenik moleküllerin etkisi anti-anjiogenik moleküllerce dengelendiği sürece anjiogenik şartel kapalı durumdadır ancak denge anjiogenezis yönünde bozulduğunda şartel açık konuma getirilir. Çeşitli sinyaller metabolik stres (hipoksi, yüksek pH ve hipoglisemi gibi), mekanik stres (örnek olarak, çoğalan hücrelerden kaynaklanan basınç), immün veya inflamator yanıt (dokuya geçmiş immün veya inflamator hücrelerin etkisi) ve genetik mutasyonlar (örnek olarak, onkogen aktivasyonu, anjiogenik düzenleyicilerin üretimini kontrol eden tümör süpresör genlerin delesyonu) dengenin bozulmasında etkindir. Çevrenin ve genetik faktörlerin etkileşiminin nasıl tümör anjiogenezisine ve büyümeye etki ettiği karmaşık bir konudur ve halen büyük ölçüde anlaşılamamıştır. Pro- ve anti-anjiogenik faktörlerin salınımı kanser hücrelerinden, endothelial hücrelerden, stromal hücrelerden, kan ve ekstraselüler matriksten kaynaklanabilir. Göreceli dağılımları ise büyük olasılıkla tümör tipine ve bölgesine göre değişkenlik göstermektedir. Aynı zamanda tümörün gelişim, regresyonu ve relaps evrelerinde farklılık gözlenmektedir.

Tümör içindeki damarların yoğunluğu, genel olarak anjiogenik ve muhtemelen metastatik potansiyellerin bir ölçütü olarak düşünülmektedir. Fontanini'nin çalışmasında olduğu gibi bazı çalışmalarda, erken evre rezektabl KHDAK'nde mikrodamar yoğunluğunun metastatik hastalık ve kötü prognoz için bağımsız bir faktör olduğunu gösterilmiştir.

Akciğer kanserlerinin büyük kısmı VEGF eksprese eder. Bu ekspresyonun, yüksek mikrodamar dansitesi, hematojen ve lenfojen metastaz ve kötü prognozla

ilişkili olduğu birçok çalışma tarafından gösterilmiştir. Salven ve arkadaşları KHDAK'de yüksek plazma VEGF düzeylerinin kemorezistans ve kötü sağkalımla ilişkili olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışma kapasamında VEGF geni üzerinde yer alan +405G>C polimorfizmleri KHDAK tanısı konmuş ve rezeksiyonu komplet olarak başarılımış 66 farklı bireyde çalışılmıştır. Çalışılan hasta grubundaki genotip dağılımının Hardy-Weinberg'e uymaması ve bu uyumsuzluğun istatistiksel olarak oldukça anlamlı olması ($p<0.001$) söz konusu hasta grubundaki genotip dağılımının raslantısal olmadığını göstermektedir. Çalışılan grupta "C" alelinin baskın olması, bu alelin KHDAK hastalarında cerrahi müdahale sonrasındaki yaşam süresi üzerinde pozitif etkisi olduğu söylenebilir. Türk popülasyonu üzerine ilk kez yapılan bu çalışmanın sonuçlarının mevcut literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

Birçok erken evre KHDAK'li hasta, potansiyel küratif tedaviye rağmen kanser relapsı ile karşılaşmakta ve bu nedenle ölmektedir. Evre I KHDAK'li olup, nüks-metastaz ihtimali göreceli olarak yüksek olan hasta subgrubunun tespit edilmesi, bu hastalara agresif adjuvan tedavi uygulanması için bir dayanak oluşturabilir ve adjuvan tedavi sonrası bu hastalarda daha iyi bir sağ kalım elde edilebilir.

7. KAYNAKLAR

7.1. Kitap

Akbulut, H. ve Akbulut, KG. 1997. Büyüme faktörleri. Ankara: ANTIP Anfi Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar.

Akbulut, H., Akbulut, KG. ve İçli, F. 1997. Karsinogenez. Ankara: Afi Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar.

Barry, B., Lowitz, W., Dennis, A. ve Casciato, M. Medical Oncology & Principles of Cancer Biology. 2001. New York: Marcel Dekker Inc,

Hastürk, S. ve Yüksel, M. 2000. Akciger kanserinin moleküler biyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi

Haydaroğlu, A. 2000. Akciger Kanserleri Tanı ve Tedavisi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi

Heasley, LE. ve Johnson, GL. Signal transduction abnormalities in lung cancer, Biology of lung cancer. 1998. New York: Marcel Dekker Inc.

Jacopson, DR. ve Brambilla, C. 1999. Ras mutations in lung cancer, Lung tumors fundamental biology and clinical management. New York: Marcel Dekker Inc,

Minna, JD., Sekikodo, Y. ve Fong, KM., Gazdar, AF. 1998. Molecular Biology of the Lung Cancer Principles and Practice of Oncology. London: Arnold.

Perez-Soler, R. ve Mendelson, J. 1998. Growth factor receptors as a target for therapy, (2.Basım). New Jersey: Blackwell Science Inc.

Pezella, F., Gatter, KC. ve Pastorino, U. 1998. Angiogenesis in lung cancer, Lung tumors fundamental biology and clinical management. New York: Marcel Dekker Inc.

7.2. Makale

Aikawa, H., Takahashi, H. ve Fujimura, S. 1999. Immunohistochemical study on tumor angiogenic factors in nonsmall cell lung cancer. *Anticancer Research*. 19,4305-4310.

Ataergin, A. 1999. Kanser tedavisinde Anjiyogenez İnhibitörlerinin Yeri. *Türkiye Klinikleri Journal Med Sci*. 19:100-105.

Baselga, J., O' dwyer, PJ. ve Thor, AD. 2001. Epidermal growth factor receptor: Potential target for antitumour agents. *CBCE*. 1,1-24.

Bates, DO., Hillman, NJ. ve Williams, B. 2000. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat*. 200, 587-597.

Bruyn, PP., Breen, PC. ve Thomas, TB. 2001. The microcirculation of the bone marrow. *Anat Rec*. 168, 55-68.

Cox, G., Jones, JL. ve Andi, A. 2001. A biological staging model for operabl non-small cell lung cancer. *Thorax*. 56,561-566.

Cox, G., Jones, JL. ve O'byrne, KJ. 2003. Matrix metalloproteinase 9 and the epidermal growth factor signal pathway in operable nonsmall cell lung cancer. *Clin Cancer Research*. 6, 2349-2355.

Dupont, J., Camastra, D. ve Gordon, M. 2000. A phase I study of VEGF trap in patients with solid tumors and lymphoma. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 22, 194-201.

Dvorak, HF., Brown, LF. ve Detmar, M. 2000. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol.* 146, 1029-39.

Fernandes, AM., Hamburger, AW. ve Gerwin, BI. Production of epidermal growth factor related ligands in tumorigenic and benign human lung epithelial cells. *Cancer Letters.* 142, 55-63.

Ferra, N. 1999. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237,1 -30.

Fidaner, C., Eser, SY. ve Parkin, DM. 2000. Incidence in Izmir in 1993-1994: first results from Izmir Cancer Registry. *Eur J Cancer.* 37(1): 83-92.

Folkman, J. 1970. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Eng J Med.* 285, 1182-1186.

Fong, KM. ve Minna, JD. 2002. Molecular biology of lung cancer: clinical implication. *Clinics In Chest Medicine.* 23,83-10.

Groeger, AM., Esposito, V. ve Mueller, MR. 1997. Advances in the understanding of lung cancer. *Anticancer Research.* 17, 2519-2522.

Groeger, AM., Odocha, O. ve Mueller, MR. 2000. Racial variation in lung cancer. *Anticancer Research.* 17, 2843-2848.

Herbst, RS., Hidalgo, M. ve Pierson, AS. 2002. Angiogenesis inhibitors in clinical development for lung cancer. *Semin Oncol.* 29, 66-77.

Hurwitz, H. ve Fehrenbacher, L. 2000. Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) prolongs survival in first-line colorectal cancer (CRC): results of phase III trial of bevacizumab in combination with bolus IFL (irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin) as first line therapy in subjects with metastatic CRC. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 7, 3646- 3654.

Jung, YD., Mansfield, PF., Akagi, M. 2002. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in nude mice model. *Eur J Cancer*. 38, 1133-40.

Kim, ES., Serur, A., Huang, J. 2002. Potent VEGF blockade causes regression of cooped vessels in a model of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99,11399-11404.

Klagsburn, M. ve D' amore, P. 1997. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 7, 259-70.

Kliche, S., Waltenberger, J. 2001. VEGF receptor signaling and endothelial function. *JUBMB Life*. 52(1-2), 61-66.

Laka, KP., Chakraborty, C. 2003. Role of Nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol*. 2, 149-55.

Lecture, GF. 1999. Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. *Chest*. 109, 14-19.

Lei, W., Mayotte, JE. ve Levitt, ML. 2000. Enhancement of chemosensitivity and programmed cell death by tyrosine kinase inhibitors correlates with EGFR expression in nonsmall cell lung cancer cells. *Anticancer Research*. 19, 221-228.

Longo, R., Sarmiento, R., Fanelli. 2002. Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis*. 5, 237-256.

Mangi, MH., Newland, AC. 2000. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 111, 43-51.

Margolin, K., Gordon, MS., Talpaz, M. 2000. Phase 1b trial of intravenous recombinant human monoklonal antibody (Mab) to vascular endothelial growth factor (rhuMab VEGF) in combination with chemotherapy (CHrX) in patients with

advanced cancer (CA): pharmacologic and long-term safety data. Proc ASCO.18,435-456.

Mendel, D., Laird, A. ve Xin, X. 2004. Development of a preclinical pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship for the angiogenesis inhibitor SU11248, a selective inhibitor of VEGF and PDGF receptor tyrosine kinases in clinical development. Proc Am Soc Clin Oncol.21, 167-189.

Nie, D., Tang, K., Diglio, C. ve Kenneth, VH. 1999. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. Blood. 95, 2304-2311.

O'byrne, KJ., Koukourakis, MI. ve Giatromanolaki, N. 2000. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in nonsmall cell lung cancer. Br J Cancer. Sayı: 82,1427-1432.

Parkin, GM., Pisani, P.ve Ferlay, J. 1999. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 49, 33-64.

Rak, J., Yu, JL., Klement, G. ve Kerbel, RS. 2000. Oncogenes and angiogenesis: signaling threedimensional tumor growth. J Invest Derm Symposium Proc. 5, 24-33, Aralık 2000.

Raymond, E., Faivre, S., Armand, JP. 2002. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. Drugs 2000. 60.

Rosen, L., Rosen, P. ve Kabbinavar, F. 2002. Phase I experience with SU6668, anovel multiple receptor tirosine kinase inhibitor in patients with advanced malignancies. Proc Am Soc Clin Oncol. 20, 97-103.

Siegfried, SM. 1999. Biology and chemoprevention of lung cancer. Chest. 113, 40-45.

Takami, I., Imamura, T., Hashizume, T. 1998. Expression of PDGF, IGF-II, bFGF and TGF- β 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Path Res Pract.* 192, 1113-1120.

Trarbach, T., Shleucher, N. ve Riedel, U. 2004. Phase I/II study of the oral vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor inhibitor PTK787/ZK222854 in combination with irinotecan/5-fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 22, 285-306.

Wei, Q. ve Spitz, MR. 1997. The role of DNA repair capacity in susceptibility to lung cancer. *Cancer and Metastasis Reviews.* 16, 295-307.

Yuan, A., Yu, CJ. ve Kuo, SH. 2001. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in nonsmall cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 19, 432-441.

8. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Şanlıurfa' da doğan Haluk Özhan Şentürk, ilk, orta ve lise eğitimini de bu şehirde tamamladı.

Yüksek öğrenimini Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yaptı ve 2004 yılında mezun oldu.

Yüksek lisans eğitimine Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde devam etti.