T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERLERİNDE NGAL EKSPRESYONU ve APOPTOZİSLE İLİŞKİSİ

Harun ÇİFTÇİ

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA(TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

KONYA-2014

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Harun ÇİFTÇİ tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ali ÜNLÜ
Selçuk Üniversitesi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK
Selçuk Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Murat KAÇMAZ
Kırıkkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Tülin ÇORA
Selçuk Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV
Selçuk Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu …… tarih ve …… sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tevfik TEKELİ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER **Sayfa No**

SİMGELER VE KISALTMALAR v
ŞEKİLLER vii
ÇİZELGELER viii
ÖNSÖZ ix
1. GİRİŞ 1
1.1. Kanser 3
1.2. Kanser Tarama Testlerinin Önemi 6
1.3. Akciğer Kanseri 7
1.4. Kanserde Hücre Ölümü 9
1.5. Apoptozis 11
1.5.1. Apoptozis Nedenleri 11
1.5.2. Morfoloji 12
1.5.3. Apoptozisin Moleküler Düzenleyicileri 13
1.5.3.1. Kaspazlar 13
1.5.3.2. Bcl-2 Ailesi 15
1.5.3.3. p53 16
1.5.3.4. Tümör Nekrozis Faktör (TNF) Ailesi 16
1.5.4. Apoptozis Mekanizması 17
1.5.4.1. Ekstrensenk Yol 17
1.5.4.2. İntresenk Yol 18
1.5.4.3. Diğer Yollar 19
1.6. Apoptozis ve Hastalıklar 20
1.7. Apoptozis Kanser İlişkisi 22
1.7.1. Akciğer Kanserin ve Apoptozis 23
1.8. Tedavide Apoptozis 24
1.9. Apoptozis Belirleme Yöntemleri 24
1.9. 1. Hematoksilen-eozin Boyama 24
1.9.2. Giemsa Boyama 25
1.9.3. Floresan Mikroskopi 25
1.9.4. Elektron Mikroskopi 26
1.9.5. Faz Kontrast Mikroskopu 26
1.9.6. Anneksin-V Yöntemi 26
1.9.7. TUNEL Yöntemi 27

1.9.8. M30 Yöntemi 27
1.9.9. Kaspaz-3 Yöntemi 27
1.9.10. Agaroz Jel Elektroforezi 27
1.9.11. Western Blotting 28
1.9.12. Flow sitometri 28
1.9.13. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 28
1.10. NGAL (nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin) 29
1.10.1. Böbrek ve NGAL 31
1.10.2. İmmünite ve NGAL 32
1.10.3. Neoplazi ve NGAL 33
1.10.4. Kalp Yetmezliği ve NGAL 34
1.10.5. Aterosklerotik Hastalıklar ve NGAL 35
1.11. NGAL Ekspresyonu 37
2. GEREÇLER ve YÖNTEM 39
2.1. Hastaların Seçimi 39
2.2. Serum Örnekleri Çalışma Protokolü 39
2.3. NGAL Tayini 40
2.4. M30 tayini 40
2.5. İmmünohistokimya Analizleri 41
2.6. İstatistiksel Analiz 42
3. BULGULAR 44
4. TARTIŞMA 48
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 54
6. ÖZET 56
7. SUMMARY 58
8. KAYNAKLAR 59
9. EKLER 65
Ek A. Etik Kurul Raporu 65
10. ÖZGEÇMİŞ 66

SİMGELER VE KISALTMALAR

24p3R	Beyin-tip organik katyon iletim reseptörü
5v40	:Tümör gelişimini provoke eden molekül
A2U	Alfa 2 globulin
A459	:İnsan akciğer adenokarsinoma epitelyal hücre dizisi
AIF	:Apoptoz indükleyici faktör
ALAPS	:Otoimmün lenfoproliferativ sendromlar
Apaf-1	:Apoptozisi aktive eden faktör-1
Bak	:Bcl-2 homolog antagonisti/katil.
Bax	:Apoptosis regulator (bcl-2-ilişkili protein 4)
Bcl-2	:B-cell lymphoma 2
BH1, BH2, BH3,	:Bcl-2'nin homolojik etki bölgeleri
Bid	:Bcl-2 etkileşim bölgesi
Bim	:Bcl-2 hücre ölümünün etkileşim mediatörü
BLG	:Beta-lactoglobulin
BNIP3	:Bcl-2/adenovirus EIB 19 kDa-etkileşimli protein 3
BRUCE 94	:Trans-Golgi ağı korunmuş 528 kDa çevresel zar proteini
CAD	:Kaspasla aktifleşen deoksiribonükleaz
CARD	:Kaspase devreye alım bölgesi
Caspaz	:Cysteine Aspartic Acid Specific Protease
c-IAP1 (HIAP2) ve	:Hücresel apoptosis inhibitör proteini 1 ve Hücresel
c-IAP2 (HIAP-1)	apoptosis inhibitör proteini 2
CK 18	Sitokeratin 18
CYFRA 21-1	:Sitokeratin 19 fragmanı
DISC	:Ölüme sebep olan sinyal kompleksi
FADD	:Fas ilişkili Ölüm bölgesi
Fas	:Apoptoz indükleyici reseptör/ligand
FITC	:Fluoresein isotiyosiyanat
Gaad 45	:Büyümeyi durduran ve DNA hasarı-indükleyen protein
HPV	:Human papillomavirus E6 onko proteini
HRP	:Horse radish peroxidase conjugated monoclonal
IAP	:Apoptozis inhibitör proteini
ICAD	:Kaspazla aklifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü

KHAK	:Küçük hücreli akciğer karsinomunda
KHDAK	:Küçük hücreli dışı akciğer karsinomunda
KML	:Kronik myeloid lösemi
MCF7	:Meme kanseri hücre dizisi
Mcl-l	:Anti-apoptotik Bcl-2 ailesinin üyesi
MMP	:Matriks metalloproteinaz
MOMP	:Mitokondriyal dış membran geçirgenliği artışı
MTS 1/CDK41	:Multipl tümör supresör geni 1/siklin bağımlı kinaz 4 inhibitörü
NAIP	:Noronal apoptosis inhibitör proteini
NF-kB	:Aktive edilmiş B hücrelerinin kappa nükleer faktörü
NM23-H1	:Endoplazmik retikilum ilişkili (SET) proteinler
NOXA	:Pro-apoptik üyelerden
NT-proBNP	:NGAL salınımlı kardiyak stres belirteçleri
PARP	:Poli (ADP-riboz) poilmeraz
PCNA	:Proliferating cell nuclear antigen
PDK1	:Fosfoinositid bağımlı kinaz-1
PIG	:p53 indükleyici gen
PGDS	:Prostoglandin D synthase
PS	:Fosfatidilserin
PUMA	:p53 ekspresyonunu arttırdığı apoptozis düzenleyicisi
RABP	:Retinoik asit bağlayıcı protein
RBP	:Retinol-bağlaycı protein
Smac/diablo	:İkinci mitokondrial kaspaz activatörü/Direkt IAP bağlı düşük pI'li protein
TCR	:T Hücre resptörü
TdT	:Terminal deoksinukleotidil transferaz
TIMP-1	:MMP-9 un inaktivasyonu için sorumlu ana mekanizma
TMB	:3,3',5,5'-Tetrametil-benzidin çözeltisi
TNFR-1	:Tümör nekrosiz faktör-alfa
TRADD	:TNF-R1 ilişkili ölüm bölgesi
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü
XIAP	:Hücresel apoptosis inhibitör proteini 3

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 1.1. Kanser oluşum mekanizması 5
Şekil 1.2. Hücredeki apoptozis ve nekroz aşamaları 13
Şekil 1.3. Apoptotik stimulasyon 16
Şekil 1.4. Apoptozis oluşumundaki yollar 21
Şekil 1.5. Apoptozisin İntrensenk ve Ekstrensenk yolları 21
Şekil 1.6. Apoptozisin organellerde gerçekleşen süreçlere göre belirlenme yöntemleri 25
Şekil 1.7. Apoptosis-indüklenmiş membran değişimlerinin Annexin V ile tanımlanma şeması.....26
Şekil 1.8. Lipokalin fold"şematik gösterimi. 29
Şekil 1.9. NGAL'ın Biyolojik rolü 36
Şekil 1.10. Reseptör aktivasyonu ile NGAL regülasyonu 36
Şekil 2.1. NGAL için kalibrasyon grafiği 44
Şekil 2.2.M30 için kalibrasyon grafiği 44
Şekil 2.3. Kanserli doku kesitinde immünohistokimyasal boyama yöntemiyle görüntülenen apoptotik hücreler.....45
Şekil 2.4. Kanserli doku kesitinde immünohistokimyasal boyama yöntemiyle görüntülenen yaşayabilir hücreler.....46
Şekil 2.5. Kanserli dokuya komşu sağlam doku kesitinde immünohistokimyasal boyama yöntemiyle görüntülenen apoptotik hücreler 46
Şekil 2.6. Kanserli dokuya komşu sağlam doku kesitinde immünohistokimyasal boyama yöntemiyle görüntülenen yaşayabilir hücreler 46

ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 1.1. 1985-2015 yılları arasındaki kanser ölümleri ve ortaya çıkacak yeni olgular 7
Çizelge 1.2. Apoptoz ile Nekroz arasındaki farklar.....14
Çizelge 1.3. Bazı hastalıklarda NGAL ile yapılan çalışmalar ve sonuçları.....39
Çizelge 2.1. NGAL için grup istatistiği 45
Çizelge 2.2. M30 için grup istatistiği.....45
Çizelge 2.3. Doku örneklerindeki kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 için apoptotik indeksler 47
Çizelge 2.4. M30 ve NGAL verileri için Spearman's korelasyon Çizelgesu 47

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının planlamasında, yürütülmesinde ve deneysel çalışmalarımın her aşamasında, akademik bilgi, birikim ve tecrübesinden yararlandığım danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Deneysel çalışmalarımla ilgili gerek teorik ve gerekse pratik bilgilerle destekleri esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ali ÜNLÜ'ye, Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV'e, Doç. Dr. Aysel KIYICI'ya ve Prof. Dr. Tülin ÇORA'ya; doku örneklerinin temini için Prof. Dr. Güven Sami SUNAM, Yrd. Doç. Dr. Murat ÖNCEL ve ekibine, dokulardaki kaspaz antijen düzeylerinin belirlenmesi aşamasındaki çalışmalar için Prof. Dr. Ender ERDOĞAN'a, dokuların patolojik incelemelerini gerçekleştiren Yrd. Doç. Dr. Pınar KARABAĞLI'ya; immünohistokimyasal analizler ve ELISA testlerinde yardımlarını gördüğüm doktora öğrencileri Nurcan EVLİYAOĞLU'na, Gülsüm TEKİN'e; Nedime KOYUNCUYA ve Arş. Gör. Fatma Gül GÜN'e teşekkürlerimi sunarım.

Harun ÇİFTÇİ

1. GİRİŞ

Genetik faktörlerin yanında, giderek artan sanayileşmenin bir sonucu olarak meydana gelen çevre kirliliği, tarımda kullanılan çeşitli kimyasallar, gıdaların hazırlanmasında kullanılan katkı maddeleri, sigara kullanımı, radyasyon, bazı virüsler ve kötü beslenme alışkanlığı nedeniyle günümüzde kanser ve çeşitlerinin görülme sıklığı artırmıştır (Janssen-Heijnen ve Coeberg 2003).

Kanser; DNA molekülünde oluşan bir seri somatik değişimler sonucunda meydana gelen düzensiz hücre proliferasyonu olarak tanımlanabilmektedir. Bu değişimler DNA molekülünde bir dizi mutasyonun ortaya çıkması şeklinde sonuçlanırlar (Pienta ve ark 1989, Alberts ve ark 2002).

Kanser, bir çok faktörün neden olduğu kompleks bir hastalık olup, gelişiminde veya baskılanmasında çeşitli organik ve inorganik maddelerin rolü araştırılmıştır (Cunzhi ve ark 2003). Kanserin erken evrede teşhis edilip hastalırın tedavi olanağına kavuşabilmeleri ve kanserlerin yol açtığı ölümlerin önlenebilmesi için; çeşitli parametreleri içeren belirteçler üzerinde çalışmalar hızlanmıştır. Tümör belirteçleri, ilgili tümör veya doku tarafından suprafizyolojik düzeylerde üretilen, biyokimyasal veya immünokimyasal yöntemlerle hastanın doku, kan veya diğer vücut sıvılarında kantitatif ölçümleri yapılabilen hormon, enzim, metabolit, immunoglobulin, protein yada metallo-protein yapısında olan maddelerdir. Ayrıca tümörle ilişkili antijenler, onkogen ve onkogen ürünlerini de içerebilir (Maggino ve Gadducci 2000). Biyomarkırlar klinik semptomlardan önce saptanabilirse veya ilaç tedavisine cevabı aynı zamanda gösterebilirse klinik onkolojide anlamlı bir terapötik etkinlik sağlayabilirler (Ludwig ve Weinstein 2005).

Biyokimyasal reaksiyonların aktivasyonu veya inhibisyonunu kapsayan biyolojik süreçlerde NGAL (nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin) gibi biyoorganik moleküllerin de rol oynadığı bilinmektedir. NGAL molekül ağırlığı 25 kDa olan bir protein olup onkojen 24p3, uterokalin ve lipokalin2 olarak da adlandırılır. NGAL sentezi neoplazilerde de indüklendiğinden, bu proteinin düzeyinden; kanserojenez ve insan tümorlerinin ilerleme safhalarını belirlemek amacıyla faydalanılır. Daha önce yapılan çalışmalarda NGAL ekspresyonunun çeşitli kanser türlerinde arttığı gösterilmiştir (Hanai ve ark 2005).

Apoptozis morfolojik olarak özel bir hücre ölüm şekli olup, ekstrensenk ve intrensenk moleküler mekanizmalarca kontrol edilir. Apoptozis genetik olarak kontrol edilen, gelişim ve doku homeostazisinde rol oynayan fizyolojik bir süreçtir. Apoptozis mekanizmalarındaki düzensizlikler kanserin de içinde bulunduğu bazı hastalıklara yol açar (Evan ve Vousden 2001).

Hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücresel lezyonların ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücresel intihar programının apoptoza neden olduğu bilinmektedir. Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybından sorumludur. Apoptotik hücre sayısı, organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur (Thompson 1994, Ballian ve ark 2007, Schwartzman ve Cidlowski 1993).

Çok hücreli organizmalarda genetik olarak hücre hasarının engellenmesi ya da hücrenin tamamen yok edilmesi apoptoz vasıtasıyla gerçekleşir. Böylece hasarın yayılması ve tümör oluşumu gibi zararlı olasılıklar engellenmiş olur. Apoptozis olayının oluşmasından önce hücresel replikasyon işlemi durur (DNA onarımı). Eğer bu esnada DNA tamiri gerçekleşemezse apoptoz ile sonuçlanan olaylar serisi başlar. Bu sırada apoptozun başlayıp başlamaması hasarın boyutuna, hücrenin tipine ve tümor geliştirme riskine bağlıdır. Apoptozis sadece intrauterin gelişme esnasındaki organogenez ve sinaptogenez olaylarında değil, aynı zamanda farklılaşmış dokuların olgunlaşmasında da gereklidir. Çünkü apoptoz vücudun bütünündeki hücre sayısının sabit tutulmasını ve immün sistem faaliyetlerinin gerçekleşmesini sağlar (Evan ve Littlewood 1998).

Bu çalışmada, çeşitli faktörlere bağlı olarak oluşan akciğer kanserinde NGAL düzeylerinin; farklı mekanizmalarla devre dışı kalmasıyla normal hücrelerin kanserleşmesine neden olan apoptozisle ilişkisi araştırılmıştır. Literatürde akciğer kanserlerinde, NGAL ve apoptozisle ilgili çalışmalara rastlanmıştır. Fakat akciğer kanserinde NGAL, M30 ve kaspaz antijen düzeylerinin birlikte çalışıldığı ve aralarındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmalara rastlanmamıştır. Akciğer kanserinde apoptosizin indüklenmesinde NGAL'in etkisi, kanserli doku ve bu dokuya komşu sağlam dokudaki apoptotik indekslerin değerlendirilmesi ve akciğer kanserinde

apoptosizin hangi yolaklarla mümkün olduğunun ortaya konulması önem arz etmektedir. Bu yönleriyle çalışmamızın özgün olduğunu ve literatüre katkı yapacağını beklemekteyiz. Araştırmamıza, Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Kliniği'ne, akciğer kanseri tanısı ile kabul edilen ve cerrahi operasyon geçiren 40-70 yaşları arasındaki hastalar, dışlama kriterleri dikkate alınarak dahil edilmiştir. Çalışmamızda, ELISA yöntemiyle hastaların serum NGAL ve M30 düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca kanserli ve kanserli dokuya komşu sağlam doku örneklerindeki kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 antijen düzeyleri de immünohistokimyasal boyama yöntemleriyle belirlenmiştir.

1.1. Kanser

Kanser, spontan veya mutajenler aracılığıyla oluşan kromozom hasarları ile gen mutasyonlarının gen ekspresyonunu değişime uğratması sonucu, hücrelerin sürekli bölünmesiyle karakterize olan bir düzen bozukluğudur. Bu düzen bozukluğu, sağlıklı bir hücrenin malign hücreye dönüşümünün gerçekleştiği çok basamaklı karsinojenez süresince oluşur (Knudson 1971, Franks ve Teich 1986). Karsinojenez; inisiyasyon, promosyon ve progresyon olarak adlandırılan üç evreden oluşur.

İnisiyasyon; hücrelerin genetik değişikliğini uyaran ajanlarla karşılaşması ile tümörleşmenin başlaması,

Promosyon; tümörleşme gösteren hücrelerin proliferasyonlarını arttıran ajanlarla etkileşmeleri ile tümörün ilerlemesi,

Progresyon ise düzeni bozulan hücrelerin sırasıyla lokal büyüme, invazyon, ve metastazı içeren gelişimi olarak tanımlanırlar (Alberts ve ark 2002).

Kanser oluşumu temelde karsinojenlere maruz kalım veya DNA onarım mekanizmalarındaki hatalar sonucu rastgele replikasyon hatalarıyla meydana gelebilmektedir (Lengauer ve ark 1998). Çoğunlukla kanser tek bir hücreden köken alır; fakat normal bir hücrenin malign fenotip özelliği kazanması mutasyonların artışı ile oluşur (Alberts ve ark 2002).

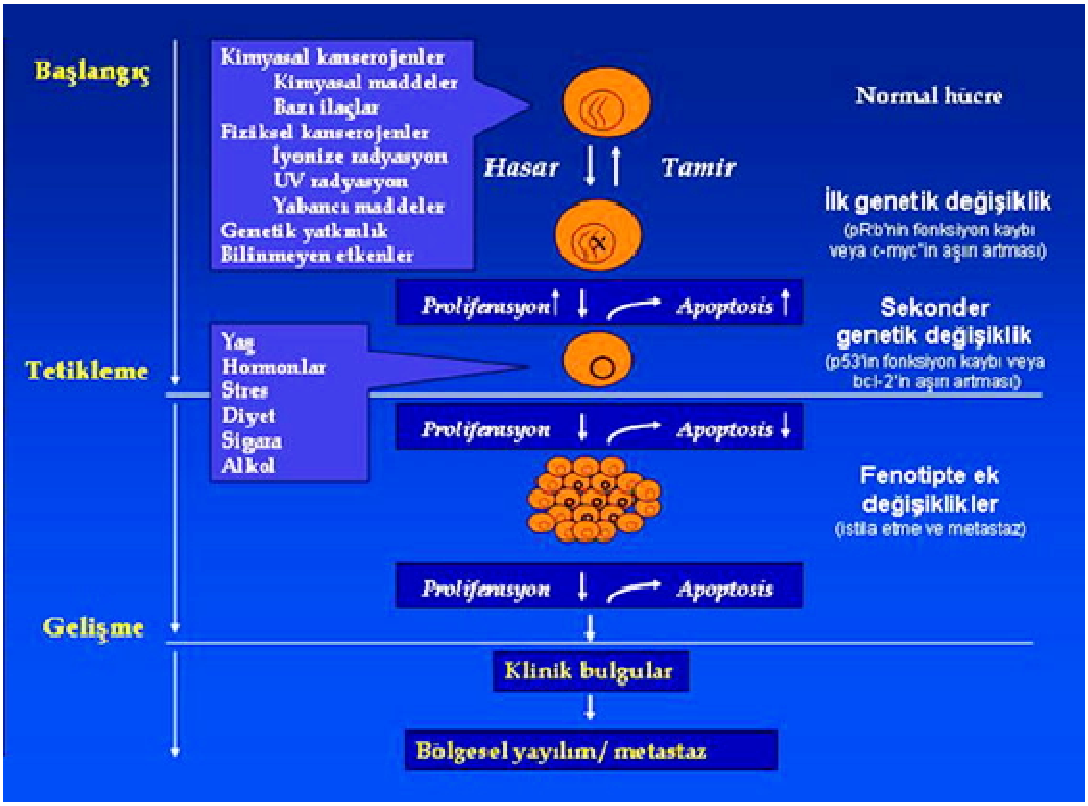
Hücre çoğalmasını kontrol eden genlerin değişikliğe uğraması sonucu ortaya çıkan bu düzen bozukluğuna yol açan karsinojenlerin başlıcaları; nükleotid dizisinde tipik değişimlere neden olan pestisit ve toksik atıklar gibi kimyasal karsinojenler,

tipik kromozom kırık ve translokasyonlarına neden olan iyonize radyasyon ve hücre içine yabancı DNA sokan virüslerdir (Alberts ve ark 2002).

Karsinojenez sürecini tamamlayan kanser hücresi, düzensiz hücre büyümesi ve doku invazyonuna/metastazına neden olmaktadır (Briasoulis ve Pavlidis 1997).

Kanserin genetik özelliği değerlendirildiğinde, hücrenin malign fenotipi kazanması için hücre proliferasyonunu, sürvisini, DNA onarımını, motilitesini, invazyonunu ve anjiojenezini düzenleyen farklı genlerde mutasyon oluşması gerekir. Mutasyonun gerçekleştiği gen grupları; tümör baskılayıcı genler, DNA onarım genleri, karsinojen metabolizmasını aktive ve deaktive eden genler, hücre siklusu genleri, hücre siklusunu düzenleyici genler, hücre ölümüne neden olan genler, hücre sinyallerini düzenleyici genler, hücre farklılaşmasında etkin olan genler, hücresel senesens (yaşlanma) genleri, metastaz ve invazyon genleridir. Bu tip mutasyonlar genelde, transdüksiyon sinyallerini aktive ederek aberrant (normalden sapmış) hücre proliferasyonu oluşturur ve dokular için gerekli olan kendilerine özgü farklılaşma programlarını bozarak kansere yol açarlar (Sporn 1996, Alberts ve ark 2002).

Bu olaylar sonucunda oluşan kanserin kazanılmış özellikleri; büyüme sinyali üretimi, büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçış, sınırsız replikatif potansiyel, artmış anjiojenez, doku invazyonu ve metastazdır (Şekil 1.1). Kazanılmış özellikler sonucunda karsinojenezde aktiflenen mekanizmalar sonrasında hücre kanseröz özellik kazanır (Hannahan ve Weineberg 2000). Kanser tipine ve alt tipine göre değişmekle birlikte bu ortak özellikler her kanser hücresinde mevcuttur.



Şekil 1.1. Kanser oluşum mekanizması (http://www.saglikpaneli.com/)

Tümörde prognozu etkileyen en önemli faktör; tümörün histolojik yapısı, büyüklüğü ve büyüme hızını içine alan tümörün biyolojik davranışıdır. Primer tümör ne kadar geniş yayılma gösteriyorsa, prognoz o kadar kötüdür. Organ metastazlarının bulunuşu ise çok kötü prognoz demektir (Hiçyılmaz 2007).

Normal hücre DNA hasarının onarımına yol açan koruyucu mekanizmalara sahiptir. Bu tamir edici ara yollar çoğunlukla kanser hücrelerinde de vardır. Normal bir hücre tamir edebileceğinden daha fazla hasara maruz kalınca, organda olabilecek hasarı önlemek için intihar etme ara yolunu harekete geçirir. Bu hücre ölüm yolları, kanser hücrelerinde genellikle değişmiş olarak bulunur ve bu değişiklik normal olarak ölmesi beklenen hasar görmüş hücrelerin yaşamasına yol açar (Loewe ve Lin 2000).

Kanser hücreleri hipoksik ortamda ve besin maddeleri azlığında da varlıklarını sürdürürler. Bu iki olumsuz durum ve hipoksi indükleyen gen serisi etkisiyle de neoplastik değişikliklerin daha da artması sağlanır. Yeni fenotipik karakterlerin kazanılması invazyon ve metastazı kolaylaştıran faktörleri içermekte olup hücre zarını delerek ektrasellüler matrikse ve vasküler kompartımana göç eder.

Böylece uzak bölgelerdeki kanser kolonilerini besleyen yeni kan damarları oluşumuna yol açılmış olur (Sporn 1996).

Kanserleşmenin başlangıcı kromozom ve genlerdeki düzensizliklerdir. Bu düzensizliklerin incelenmesi ile kanserin gelişimi, yayılması ve önceden belirlenmesi gibi önemli tanı aşamalarında kullanılabilirliği pek çok araştırmacının ilgisini çekmiştir.

1.2. Kanser Tarama Testlerinin Önemi

Kanser olgularının arttığını ve gün geçtikçe de artacağını gösteren etyolojik ve epidemiyolojik araştırmalara ait bulguların verileri şu şekildedir: Türkiye'de meydana gelen ulusal düzeydeki ölümlerin temel hastalık gruplarına göre yüzde dağılımına bakıldığında, kanserin kardiyovasküler hastalıklardan sonra % 13,1 oranı ile ikinci sırada yer aldığını belirtmektedir (Ozar 2009).

Türkiye'de kanser istatistiklerine göre ülkemizde her yıl yaklaşık 98 bin erkek ve 63 bin kadın kansere yakalanmaktadır. Erkeklerde en sık görülen kanserler akciğer (%25,7) ve prostat iken (%11,8), tütüne bağlı kanserler erkeklerde önemini korumaya devam etmektedir. Kadınlarda en sık görülen meme kanseri (%23,4), her 4 kadın kanserinden birisi olmaya devam etmektedir. Çocukluk çağı kanserlerinde ise lösemi, en sık görülen kanser türüdür. Gençlerde ise (15-24 yaş grubu) erkeklerde testis kanseri ve kemik kanserleri, kadınlarda ise tiroid ve Hodgkin Hastalığı en sık karşılaşılan kanser türleridir (T.C. Sağlık Bakanlığı 2009).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün; Amerika Birleşik Devletlerinde yaptığı ölüm oranı istatistiklerine göre ise kanser, % 22,7 oranla kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada ölüm sebebi olarak bulunmuştur. Geçmişte yapılan istatistiksel verilere bağlı olarak Amerikan Kanser Birliğinin 2009 yılı için verdiği tahmini rakamlara bakıldığında, beklenen 766,130 erkek kanser hastasının % 25' inde prostat kanseri; %15'inde akciğer kanseri ve %10'nunda kolon kanserine, beklenen 713,220 kadın kanser vakalarının %27'sinin meme kanseri, %14'ünün akciğer kanseri ve %10'unun kolon kanserine yakalanacağı belirtilmektedir. Bu rakamlara göre erkeklerde prostat kanserinin kadınlarda ise meme kanserinin en başta yer aldığı, hem kadın hem erkeklerde ise akciğer ve kolon kanserlerinin her iki

grupta da önemli oranda risk oluşturabileceği öne sürülmektedir (WHO 2006, Ozar 2009).

WHO, kanserden ölüm ve olgularının değerlendirilmesi sonucu 2015 yılı tarihi itibarı ile gelişmiş ülkelerde 3 milyon ölüm ve 5 milyon olgu, gelişmekte olan ülkelerde ise 6 milyon ölüm ve 10 milyon olgu olacağını öne sürmektedir. Bu rakamlar doğrultusunda kanserin erken teşhis edilmesinin ve çalışma açısından meme, akciğer, prostat ve kolon kanser gruplarının öncelik kazanmasının önemi ortaya çıkmaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge1.1. 1985-2015 yılları arasındaki kanser ölümleri ve ortaya çıkacak yeni olgular (WHO 2006)

Yıl	**Bölge**	**Ölümler (milyon)**	**Yeni olgular (milyon)**
1985	Gelişmiş ülkeler	2	4
	Gelişmekte olan ülkeler	3	5
	Dünya	5	9
2015	Gelişmiş ülkeler	3	5
	Gelişmekte olan ülkeler	6	10
	Dünya	9	15

1.3. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, dünya ortalamasına göre erkeklerde prostat kanserinden sonra, kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sırada olup morbidite ve mortalitenin önemli bir kısmını oluştuşmaktadır. 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 türlerinden biri haline gelmiştir (Spiro ve Porter 2002). Tüm dünyada kanser olgularının %12,8'inden ve kanser ölümlerinin %17,8'inden akciğer kanseri sorumludur (Parkin ve ark 2005).

Akciğer kanseri, doğal seyri nedeni ile ileri- metastatik halde yada lokal ileri evre–toraks içi yaygın vaziyette tanı almaktadır. Bu nedenle tanı sırasında hastaların %70'inde cerrahi tedavi şansı bulunmamaktadır (Ece 2010). Ülkemizde ileri evre

hastaların oranı %86,7 olup, bu oran Avrupa (%80) ve ABD'den (%85) bildirilen rakamlara göre daha yüksektir (Goksel ve Akkoclu 2002).

Akciğer kanserinin tanıdan itibaren beş yıllık mortalitesi %85-90 arasındadır (Beckles ve ark 2003). Akciğer kanserinin gelişiminde sigara içimi en önemli etyolojik faktördür. Sigara içenlerde içmeyenlere göre akciğer kanseri riski 20 kat yüksektir. Sigaraya başlama yaşı, sigara içme süresi, içilen sigara sayısı ile tütün ve sigara tipi riski etkilemektedir. Çevresel sigara dumanı maruziyeti de akciğer kanseri riskini arttırmaktadır (Hirayama 1981, Jemal ve ark 2008).

Türkiye'de akciğer kanserinin oluşumunda rol oynayan diğer önemli bir faktör asbest ile temastır. Havayla kolay taşınan ve aerodinamik yapıda bir mineral bileşiği olan asbest, liflerle karşılaşan kişilerde, özellikle de sigara içenlerde, akciğer kanseri riskini artırır. Sigara içen kişilerde asbest ile temas kanser riskini 90 kat arttırmaktadır (Goksel ve Akkoclu 2002). 1990'lı yıllara kadar akciğer kanserlerinin %3-4 kadarının asbeste maruz kalınmasından kaynaklandığı düşünülmekteydi (Omenn ve ark 1986). ABD dahil bir çok gelişmiş ülkelerin Asbest kullanımına sınır getirmesi bu oranı 2008'li yıllarda %1,5'a kadar düşürmüştür (ATSDRD 2009).

Radyoaktif bir madde olan radon; uranyum madenlerinde, toprak ve kayalarda doğal olarak bulunur. Uranyum madeninde çalışan işçilerde ve radon yayan inşaat malzemesinden yapılan evlerde yaşayan insanlarda, akciğer kanseri riski belirgin olarak artmıştır. Şehirde yaşayan insanlarda, akciğer kanseri insidansı kırsal kesime göre 1,2-2,3 kat daha fazladır. Bu muhtemelen hava kirliliğinin, sigara ve mesleki kanserojenlerin etkisini arttırmasına bağlıdır (Ozar 2009).

Tüberküloz, bronşektazi, pnömoni, abse, pulmoner emboli, interstisyel akciğer hastalıkları gibi akciğerde skatris bırakan hastalıklarda ve skar dokusunun kanser gelişimine zemin oluşturduğu akciğer tüberkulozu geçiren olgularda, akciğer kanseri gelişme riskinin 8 kat daha fazla olduğu belirtilmektedir (Tatar ve ark 2000).

Akciğer kanserinde diyetin % 5 oranında etkili olduğu ileri sürülmektedir. Vitamin A ve Beta karotenden fakir diyet akciğer kanseri riskini artırmakta, diyetinde Beta karoten / retinol miktarı yüksek olan olgularda ise akciğer kanserinin göreceli riski 0,59'a düşmektedir. Vitamin E ve selenyum benzer şekilde antioksidan etkiyle riski azaltmaktadır (İtil 2000).

Epidemiyolojik çalışmalarda, birinci derece akrabalarında akciğer kanseri bulunan bireylerde, akciğer kanseri riski 2,6 kat arttığı belirlenmiştir (Kreuzer ve ark 1998).

Kadınlarda, sigara içen bir kadının içmeyene göre riskinin 1,5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Erkeklere oranla da kadınlarda risk 1,5-3 kat daha fazladır. Pasif sigara maruziyeti veya diğer bir deyişle çevresel sigara maruziyetinde ise riskin 1,2-1,3 kat arttırğı bildirilmektedir. Ailede akciğer kanseri olan ve sigara içen bir kadında riskin 30 kat arttığı gösterilmiştir (WHO 2006, Ozar 2009).

Ayrıca motorlu taşıtlara, fabrika bacalarına bağlı hava kirliliklerinin, evlerde uygun nitelikte olmayan odun-kömür yakarak ısınmanın da kanser yapıcı maddelerin oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir. Hava kirliliğinin akciğer kanseri riskini arttırabileceği düşünülmektedir (Ozar 2009).

Akciğer kanserinin teşhisinde hastalığın tümör olarak gelişmesi aşamasında ön ve arka akciğer filmi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans, bronkoskopi ve biyopsi yöntemleri kullanılmaktadır. Hastalığın tanısında önemli belirleyici olarak; Onkofetal Antijenler [karsino embriyonik antijen (CEA)], büyüme hormonu (GH), enzimlerden alkalen fosfotaz, kreatin kinaz BB izoenzimi (CK-BB), nörofizin ve sitokeratin 19 fragmanı (CYFRA 21-1) kullanılmaktadır (Baysal ve Criss, 2004). Fakat bu belirteçlerin çoğu kanser hücrelerinin varlığını tespitte düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduklarından hastalığın erken evrede tanınması ve hastalığın izlemi açısından yetersiz kalmaktadırlar (Sheng ve ark 2009). Dolayısıyla, akciğer kanserinin erken tanı ve tedavisini kolaylaştırmak için geliştirilecek moleküler tekniklere, prognoz değerlendirilmesine ve alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır

1.4. Kanserde Hücre Ölümü

Hücre, fizyolojik strese maruz kaldığında genellikle yapısını korur. Hücrenin adaptif gücü aşıldığında ise hücre zedelenmesi oluşur. Hücre zedelenmesi bir noktaya kadar geri dönüşlüdür, fakat kalıcı stres durumunda geri dönüşümsüz hale gelir ve ölümle sonuçlanır. Hücre ölümü, vücutta homeostazı sağlamak için hücre bölünmesi kadar önemlidir. Hücre ölümü, embriyonik ve yetişkin hayatı boyunca meydana gelen aşırı hücre oluşumunu dengeler. Yapılan araştırmalarda

kemoterapötiklerle birlikte ve diğer faktörlerin, hücreyi apoptoz dışındaki diğer ölüm mekanizmalarına da yöneltiği belirtilmektedir. Bu mekanizmalar; otofaji, mitotik katastrof, otofagositoz ve nekrozdur (Stepien 2007, Batu 2008).

Otofaji

Otofaji; hücresel homeostazın sağlanması için gerekli lizozomal katabolik bir süreçtir. Otofaji antikanser tedaviye yanıt olarak gerçekleşebilmektedir. Bu yanıt, hücrenin yaşamasını sağlayabileceği gibi ölümüne de neden olabilir. Otofaji sürecinde fazla, yaşlı ve gereksiz sitoplazmik makro moleküller, endoplazmik retikulum benzeri izolasyon zarlarının içinde birikerek otofagozomları oluşturur. Otofagozomlar taşıyıcı veziküllerle birleşerek lizozomal enzimleri alır ve hücresel bileşenlerin yıkımı başlar (Lorin 2008, Batu 2008).

Otofagositoz

Otofagositozda makro moleküller hücre içine endozomlar aracılığıyla alınır. Lizozom, endozom zarıyla birleşerek makro molekülün yıkımına başlar. Otofagositoz sürecinde yaşlı veya hasar görmüş organel, endozomla kaplanıp lizozomla birleşir ve yıkılır (Batu 2008).

Mitotik katastrof

Anormal mitoz sonucu gelişen bir çeşit hücre ölümüdür. Birçok çeşit sitotoksik ajan mitotik katastrofa neden olur. Mitozda anormal kromozom segregasyonu sonucu olarak DNA'da meydana gelen hasar söz konusudur. Mitotik katastrof, iyonize edici radyasyon ile indüklenen hücre ölümünün ana şekli olarak da değerlendirilmektedir (Chow 2010).

Nekroz

Klasik hücre ölümü nekroz olarak adlandırılmaktadır. Nekroz, sitoplazmik şişme, enerji kaybı, hücre-içi komponentlerin entegrasyonunun ve plazma membranının bütünlüğünün bozulması ile karakterizedir. Şiddetli bir travma veya zararlı bir uyarı ile meydana gelebilir ve genellikle hücreleri gruplar halinde etkiler. Morfolojik olarak, endoplazmik retikulum ve mitokondride şişme, plazma membran iyon transportunun bozulması, hücrelerin şişmesi ve parçalanması tipiktir. Hücrelerin

parçalanması ile hücre içeriği ve lizozomal enzimler hücre dışı ortama dökülür. Hücre dışına çıkan enzimlerin komşu hücre ve dokuları zedelemesiyle inflamatuar yanıt oluşmaktadır (Lossi 2003).

1.5. Apoptozis

Apoptozis; genetik kontrol mekanizmaları aracılığıyla ölmeye programlanmış olan hücrelerin, kendi DNA'larını ve sitoplazmik proteinlerini parçalayacak enzimleri aktive eden bir hücre ölüm sürecidir. Programlı hücre ölümü olup pek çok patolojik ve fizyolojik süreçte rol alır.

1.5.1. Apoptozis Nedenleri

Apoptozis nedenleri iki grupta sınıflanabilir.

A. Fizyolojik nedenlere bağlı apoptozis:

1- Embriyojenezde (implantasyon, organojenez, gelişimsel involüsyon ve meta morfoz) hücrelerin programlı ölümü,

2- Hormona bağlı doku involüsyonu (Menstürel siklusta, menopozda ovaryan atrezide, laktasyon gösteren memenin regresyonunda, kastrasyon sonrası prostat atrofisinde),

3- Çoğalma gösteren hücre gruplarında hücre sayısının devamlılığının (homeostazis) sağlanması (kemik iliği ve timustaki immatür lenfositler, germinal merkezdeki B hücreleri ve intestinal kriptlerdeki epitel hücreleri),

4- Potansiyel olarak zararlı self-reaktif lenfositlerin olgunlaşmalarını tamamladıktan sonra ya da önce elimine edilmesi,

5- Akut inflamatuar yanıtta nötrofiller, veya immün bir yanıtta görev alan konak hücrelerinin ölümü,

6- Sitotoksik T hücreleri tarafından gerçekleştirilen hücre ölümü (virüsle enfekte hücreler, neoplastik hücreler ve transplant reaksiyonu).

B. Patolojik nedenlere bağlı apoptozis

1- Radyasyon, sitotoksik kanser ilaçları, hafif derecede hipoksi, ısı..vb gibi etkenler ile oluşan DNA hasarı. DNA hasarı ve tümör supresör gen p53'ü de kapsayan mekanizma ile apoptozis indüklenir. DNA hasara uğrayınca hücrede p53

birikir ve tamir işlemi için zaman kazanmak üzere hücre siklusunu G1 fazında durdurur. DNA onarım süreci başarısız olduğu taktirde p53 apoptozisi tetikler. Ayrıca p53 mutasyona uğradığında veya yok olduğunda apoptozisi uyarmada yetersiz kalır. Bu durum bazı kanserlerde olduğu gibi hücrenin sağ kalımını sağlar (Batu 2008),

2- Katlanmış proteinlerin birikimi (Santral sinir sistemi ve diğer organlarda endoplazmik retikulumda stres oluşturan protein birikimi),

3- Bilinen bazı enfeksiyonlara bağlı hücre ölümü (adenovirüs, HIV enfeksiyonu ya da doku immün yanıtı oluşturan viral hepatitler),

4- Duktus obstrüksiyonundan sonra organ parankiminde patolojik atrofi (pankreas, parotis ve böbrek),

5- Tümörlerde hücre ölümü (çoğunlukla gerileyen tümörlerde olmakla birlikte bazen de aktif büyüyen tümörlerde).

1.5.2. Morfoloji

Apoptozisde morfolojik bulgular şunlardır:

Çevre hücrelerden ayrılma: Apoptozisde ilk olarak hücreler birbirleriyle olan temas bölgelerini ve mikrovillusları içeren yüzey oluşumlarını kaybederek komşu hücrelerden ayrılmaya başlarlar .

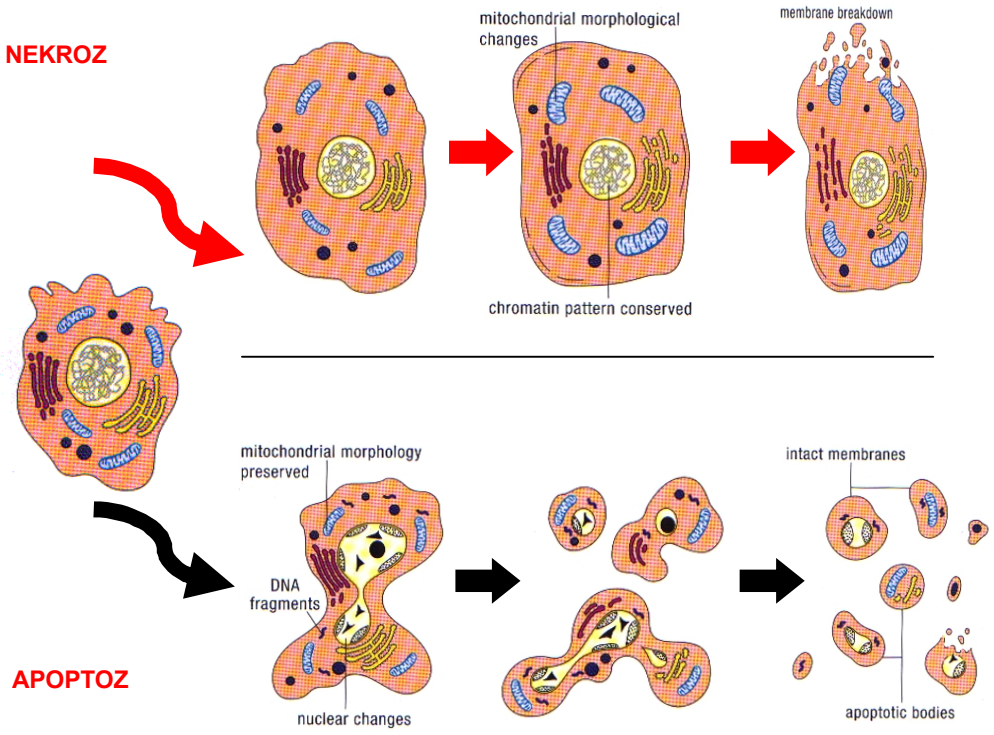
Hücre büzüşmesi: Hücre boyutları küçülür. Sitoplazma, yoğun olup organeller nispeten normal görünmekle birlikte sıkı paketlenmeler gösterir. Organel bütünlüğü korunur ancak bu organeller küçülerek hücre zarına bağlı cisimler oluştururlar.

Kromatin yoğunlaşması: Apoptozisin en karakteristik görüntüsünü oluşturur. Değişik boyut ve şekillerde kromatin birikimleri periferde hücre membranının altında bulunur. Nükleus iki ya da daha fazla parçaya bölünür .

Sitoplazmik kabarcıklar ve apoptotik cisimlerin oluşumu: Apoptotik hücre ilk önce yaygın yüzeyel tomurcuklanma gösterir. Daha sonra membranla çevrili sitoplazmada nükleer parçalarla birlikte veya onlar olmadan sıkı paketlenmiş organellerden oluşan apoptotik cisimlere parçalanırlar.

Apoptotik hücre veya cisimciklerin genellikle makrofajlar tarafından fagositozu: Apoptotik cisimcikler hızla fagositlerin lizozomal enzimleri tarafından sindirilir.

Hücredeki apoptozis ve nekroz aşamaları Şekil 1.2'de verilmiştir. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar da Çizelge 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Hücredeki apoptozis ve nekroz aşamaları (Altunkaynak ve Özbek 2008)

1.5.3. Apoptozisin Moleküler Düzenleyicileri

Apoptozisin her basamağı bir çok proteinin birlikte çalışmasını gerektirir. Bu proteinler, kaspazlar, Bcl-2 ailesi, p53 ve TNF ailesidir. En etkili proteinler, kaspazlardır.

1.5.3.1. Kaspazlar

Kaspazlar; sistein aspartat-spesifik proteinazlardır ve aspartik asitten sonraki peptit bağını kırarlar. Bir çoğu apoptozisde rol alan 14 farklı kaspaz tanımlanmıştır. Kaspazlar, tek polipeptit zinciri halinde sentez edilirler ve üç tane bölgeleri vardır; efektör ölüm bölgesi (DED), kaspaz toplama bölgesi (CARD) ve ölüm bölgesidir (DD). Tüm kaspazlar hücre içinde inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik işlemle

kırılarak aktif olurlar. İnaktif kaspazın aktivasyonu; granzim B aracılığıyla sitotoksik T hücre granüllerinde bulunan aspartata özgü serin proteinazlar aracılığıyla veya aktif olan kaspaz proteinin inaktif olan kaspaz ile etkileşimi sonucu gerçekleşebilir. Kaspazlar, yapısal özelliklerine ve fonksiyonlarına göre üç grupta sınıflandırılırlar. Bunlar, inflamatuar kaspazlar (kaspaz 1, kaspaz 4, kaspaz 5), başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, kaspaz 8, kaspaz 9, kaspaz 10) ve efektör kaspazlardır (kaspaz 3, kaspaz 6, kaspaz 7).

Çizelge 1.2. Apoptozis ile Nekroz arasındaki farklar (Batu 2008).

ÖZELLİK	**APOPTOSİZ**	**NEKROZ**
Etyoloji	-Hücre yaşlanması -Büyüme faktörü eksikliği -Kanser ilaçları, Radyasyon -HIV, -Oksidatif stres -Yüksek doz glukokortikoid -Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu	-İskemi -Şiddetli Oksidatif Stres -Hipertemi -Hipoksi -Litik Viral Enfeksiyon -Toksik Maddeler
Biyokimyasal özellikler	-Kontrollüdür. -ATP gereklidir. -+4 ^{o}C gerçekleşmez. -DNA internükleozomal alanlarda 180 baz çiftinin (bp) katları olacak şekilde kırılır, -Prelitik DNA fragmantasyonu (erken evrede gerçekleşir).	-Kontrolsüzdür. -ATP gerekmez. -+4 ^{o}C gerçekleşebilir. -DNA rastgele parçalanır -Postlitik DNA fragmantasyonu (ölümün geç safhasında).
Morfoloji	-Hücre zarı bütünlüğünü korur ancak zarda kabarcıklar oluşur. -Kromatin nükleer zar civarında toplanır ve yoğunlaşır. -Hücre küçülür. -Organellerde parçalanma yoktur. -Hücre zarla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanır.	-Hücre zarının bütünlüğü bozulur. -Kromatin kümelenir. -Hücre şişer. -Organeller parçalanır. -Endoplazmik retikulum genişler -Büyük vaküoller oluşur. -Hücre lizisi meydana gelir.
Diğer	-Hücreler tek tek /birkaçı bir arada ölür -Fizyolojik şartlarda da gerçekleşir. -Hücreler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilir. -İnflamasyon görülmez.	-Hücreler gruplar halinde ölür. -Patolojik etkiler sonucu oluşur. -Lizozomal enzimler salınır. -İnflamasyona neden olur.

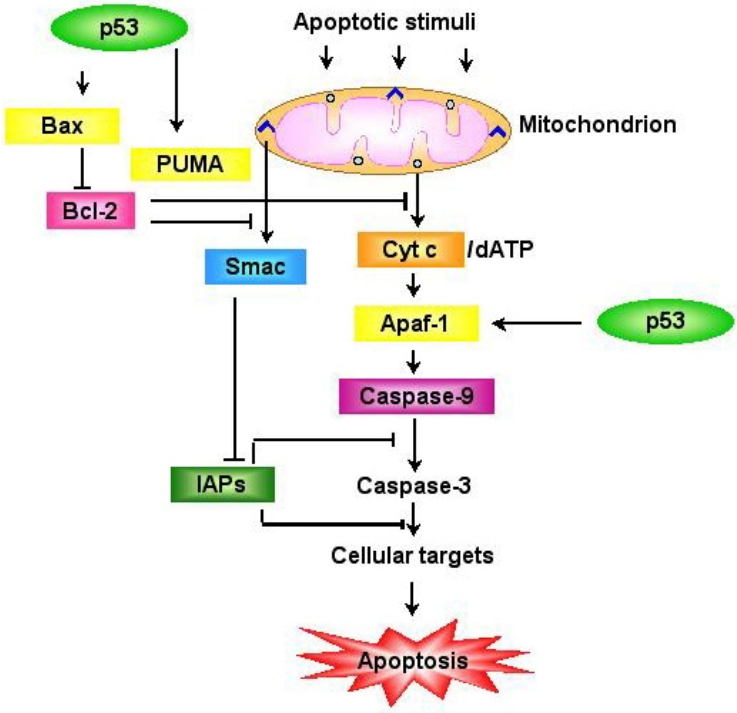
Ölüm reseptörleri aracılığıyla tetiklenen apoptotik sinyal, kaspaz 8 veya kaspaz 10 gibi başlatıcı kaspazların aktivasyonunu sağlarken mitokondriyal apoptotik

sinyaller kaspaz 9'u aktif hale getirir. Daha sonra bu kaspazlar diğer kaspazları aktifleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar. Bu kaskad sonunda efektör kaspazlar olan kaspaz 3, 6 veya 7 aktive olur. Bu aktivasyon, nükleaz inhibitörü, hücre iskeleti ve önemli hücre proteinlerinde bölünmeye yol açarak DNA'da parçalanmaya ve tipik morfolojik değişikliklere neden olur (Ulukaya 2003, Chowdhury ve ark 2006).

Yaşayan hücrelerde kaspaz aktivasyonu apoptozis inhibitör protenleri (IAP) adı verilen hücresel proteinler aracılığıyla kontrol altında tutulurlar (Salvesen ve Duckett 2002). İnsanlarda altı tane IAP tanımlanmıştır; NAIP, c-IAP1 (HIAP2), c-IAP2 (HIAP-1), XIAP, survivin ve BRUCE94. IAP proteinlerinin aşırı salınımı proapoptotik Bcl-2 ailesinin tetiklediği apoptozisi inhibe eder (Küçükaltun 2007).

1.5.3.2. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 proteinleri apoptozis regülasyonunda; hücre yüzeyi ile hücre içi ölüm sinyalleri arasında denetimi sağlayarak, apoptozisin oluşum safhasında ve kaspaz kaskadının aktivasyonunda önemli rol oynarlar (Sato ve ark 1994, Burlacu 2003). Bcl-2 ailesi iki düzineden daha fazla üyeye sahiptir ve birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri apoptozisi tetikleyici (en iyi bilinenler: Bax, bid, bcl-Xs, bad, bim, bak, PUMA, NOXA), diğeri ise apoptozisi baskılayıcı (en iyi bilinenler: bcl-w, bcl-Xl, Mcl-l) etkiye sahiptir (Ulukaya 2003). Bcl-2 ailesinin üyeleri; BH1, BH2. BH3 ve BH4 bölgelerinden en az birisini içerirler. Apoptozisi tetikleyen üyeler kendi aralarında; BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinden her üçünü içerenler (Bax, Bak) ve sadece BH3 içerenler (bid, bad, bim, PUMA, NOXA) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Apoptozisi baskılayan üyelerin hepsi bölgelerin dördünü içerirler. Ölüm sinyali olmadığı zaman Bcl-2 proteinleri hücre içinde ayrı kompartmanlarda bulunurlar. Ölüm sinyali alındığı zaman, apoptozisi indükleyen üyeler değişime uğrarlar, daha sonra mitokondrinin dış membranına entegre olurlar ve mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin salıverilmesine neden olurlar (Şekil 1.3). Bu olaylar gerçekleşirken apoptozisi baskılayan üyeler ise inaktif olurlar (Griffiths ve ark 1999, Küçükaltun 2007).



Şekil 1.3. Apoptotik stimulasyon (http://www.weizmann.ac.il/)

1.5.3.3. p53

p53 apoptozisi tetikleyen birçok farklı gen ürününün sentezini arttıran transkripsiyon faktörüdür. p53'ün sentezini artıran ve apoptozisi tetikleyen gen ürünleri; hücre döngü gelişim inhibitörleri, p53 aktivitesini kontrol eden düzenleyiciler, oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stres medyatörleri, ölüm reseptör sinyal yolunun komponentleri ve Bcl-2 ailesinin apoptozisi tetikleyen proteinleridir. p53 aynı zamanda transkripsiyondan bağımsız olarak da apoptozisi tetikleyebilir. p53, hücrede bir şekilde DNA hasarı oluştuğu zaman hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA tamiri için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse Bax'ın sentezini arttırarak apoptozisi tetikler (Küçükaltun 2007). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılırken, apoptoziste yaklaşık 300000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz.

1.5.3.4. Tümör Nekrozis Faktör (TNF) Ailesi

TNF bir sitokindir. 185 amino asitlik bir glikoprotein hormonudur, ancak bazı hücreler daha uzun veya daha kısa izoformlarını salgılayabilir. TNF; apoptozis, hücre proliferasyonu, immünmodülasyon, inflamasyon, allerji ve otoimmün hastalıklara

aracılık eder. TNF, transmembran proteini olarak sentez edilir. TNF'nin membrana entegre formu (mem-TNF) proteolitik bölünme ile soluble TNF halini alır. TNF, biyolojik fonksiyonlarını iki farklı reseptör aracılığıyla gerçekleştirir; tip 1 (TNF-Rl) ve tip 2 (TNF-R2) (Aggarwal 2000).

Hücrenin ölüm sinyalinin aktarımı, TNF-R1'in stoplazmik ölüm bölgesi aracılığıyla gerçekleşir. Bu durum kaspaz 8 aktivasyonuna veya mitokondri bağımlı döngünün aktivasyonuna, sonuç olarak da apoptozise neden olur (Küçükaltun 2007).

1.5.4. Apoptozis Mekanizması

Yapılan araştırmalar, ekstrensek ve intrensek olarak iki ana apoptotik yolun olduğunu, bu iki yolun birbiri ile bağlantılı olduğu ve bir yolda rol alan moleküllerin diğer yoldakini de etkilediğini göstermiştir. Bu iki yola ilave olarak T-hücre aracılı sitotoksisiteyi ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren bir yol daha vardır (Şekil 1.5), (Eröz ve ark 2012).

1.5.4.1. Ekstrensenk Yol

Ekstrensenk (reseptör aracılı apoptozis) yolda apoptozis, hücre ölüm reseptörleri olan Fas ve TNF-R1'in kendi ligandları ile etkileşime girmesi sonucu başlar (Şekil 2.4). Fas ligandı (FasL), sitotoksik T lenfositlerde ve doğal öldürücü (NK) hücrelerde bulunur (Ulukaya 2003, Hung ve Chow 2004). TNF-R1'in ligasyonu, TNF-R1'e TNF nin bağlanması ile gerçekleşir (Hung ve Chow 2004). Fas ve TNF-R1 kendi ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olurlar. Fas reseptörü, birbirine komşu iki Fas ligandının birbirleriyle bağlanması sonucu trimer kompleks halinden hexamer kompleks haline dönüşür. Daha sonra, Fas reseptörü kendisinin intrastoplazmik ölüm bölgesi olan FADD (Fas ilişkili ölüm bölgesi) ile, TNF-R1 ise kendi intrastoplazmik ölüm bölgesi olan TRADD (TNF-R1 ilişkili ölüm bölgesi) ile etkileşime girer. Böylece ölüme sebep olan sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Bu kompleks, prokaspaz 8'in efektör ölüm bölgesi (DED) ile birleşerek prokaspaz 8'in aktif formu olan kaspaz 8'in oluşumuna neden olur. Kaspaz 8; ya prokaspaz 3'ü aktive ederek hücre ölümüne sebep olur ya da Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'in c-terminal bölgesini keserek aktif formu olan tBid'in oluşmasına ve böylece apoptozisin intrensek yola doğru ilerlemesine neden olur. Hücreler, bu iki

yoldan birisine daha fazla yatkındırlar. Lenfositler, kaspaz 3 aktivasyon yolunu tercih ederken, hepatositler intrensek yola doğru ilerlemeyi tercih ederler.

1.5.4.2. İntrensenk Yol

Sitotoksik ilaçlar, oksidatif stres, iyonize radyasyon, DNA hasarı, büyüme faktör eksikliği gibi nedenlerle oluşabilen ölüm sinyali, Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini içeren üyeleri (bid, bad, bim, PUMA, NOXA) tarafından mitokondriye taşınır (Şekil 1.4). İntrensenk yolun (mitokondri aracılı apoptozis) en önemli bölümü, mitokondri dış membran gerçirgenliğinde oluşan artıştır.

MOMP (Mitokondriyal dış membran geçirgenliği)'un Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini içeren üyeleri tarafından oluşum mekanizmaları;

a) Timusta bulunan otoreaktif T hücrelerin ortadan kaldırılmaları, T hücre reseptörünün (TCR) uyarılması ile başlar. Uyarılmış olan TCR, inaktif halde bulunan Bim'in aktif hale gelmesine neden olur. Aktifleşen Bim; Bax ve Bak'ın birbirleriyle etkileşime girerek oligomerik hal almalarını sağlar. Bax/Bak oligomerizasyonu MOMP'u oluşturur. T lenfositlerde sitokin eksikliğinde IL-2 (İnterleulin-2) reseptörünün uyarılmasına bağlı olarak gözlenen apoptozis de bu yol ile gerçekleşir (Hung ve Chow 2004).

b) Aktif kaspaz 8 eksikliği. Bid'in c-terminal bölgesinin kesilmesine ve aktif formu olan tBid'in oluşmasına neden olur. Oluşan tBid, Bim ile aynı yolu izleyerek MOMP'a neden olur.

c) Sitotoksik T hücreleri, hedef aldıkları hücreleri FasL/Fas reseptörü aracılığıyla öldürürler. Bunu başaramadıkları zaman degranüle olarak perforin ve granzim B salınımına neden olurlar. Perforin, hedef hücre membranında cep (pot) oluşturarak Granzim B'nin hücre içine girişini sağlar. Granzim B; kaspaz 3, 8 ve Bid'i hedef alır. Granzim B, prokaspaz 3 ile başlayan süreci başlatabilir ancak tamamlayamaz. En sonunda granzim B, Bid'i aktif formu olan tBid haline dönüştürerek tBid aracılığıyla oluşan MOMP'u gerçekleştirir (Sutton ve ark 2000).

d) DNA hasarında p53; PUMA ve NOXA'nın sentezini arttırır. PUMA ve NOXA proapoptotik proteinler olan Bax ve Bak aracılığıyla MOMP'un oluşumunu sağlar (Chowdhury ve ark 2006). PUMA ve NOXA, Bax ve Bak'ı direk olarak aktive

edemezler. Antiapoptotik Bcl-2 veya Bcl-xl; Bim veya Bid'i bağlayarak Bim ve Bid'in Bax/Bak oligomerizasyonunu tetiklemelerini engellenebilir. İşte PUMA ve NOXA; Bcl-2 veya Bcl-xl'nin bağlayıcı bölgeleri için Bim ve Bid ile yarışır. Böylece serbestleşen Bim ve Bid, Bax ve Bak'ın birbirleriyle etkileşime girerek oligomerik hal almalarına ve MOMP oluşumuna neden olurlar (Moore ve ark 2007).

Hangi yol ile olursa olsun ölüm sinyalinin, MOMP oluşumunu gerçekleştirebilmesi mitokondriden apoptozisin aktivasyonuna neden olan başta sitokrom-c olmak üzere Smac/diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI), AIF (apoptozis indikleyici faktör), endonükleaz G ve Omi (HtrA bakteriyal homologu) gibi maddelerin salımına neden olur.

Sitokrom-c; Apaf- 1 (apoptotik proteaz aktifleştirici faktör - 1) ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom adı verilen oligomerik Apaf-1 kompleksi (7 Apaf-l + 7 sitokrom-c + 7ATP + 7 Prokaspaz 9)'nin oluşumunu sağlar. Aktifleşen kaspaz 9, prokaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirir. Böylece ICAD'ın bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir. CAD, apoptozisin karekteristik bulgularından olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olur. Ayrıca aktif kaspaz 3; ilgili proteinleri (hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A) ve DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimerazı (PARP) parçalayarak, apoptotik hücre morfolojisinin oluşmasını da sağlar.

Smac/diablo; kaspazlara bağlanarak kaspaz inhibisyonuna yol açan IAP'ın yerini değiştirerek, Omi ise IAP'ı geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek kaspaz aktivasyonunu sağlarlar. AIF; direkt olarak nükleusa giderek kromatin yoğunlaşmasını başlatır ve endonükleaz G; kaspaz aktivasyonundan bağımsız olarak nükleustaki parçalanmaya katılır.

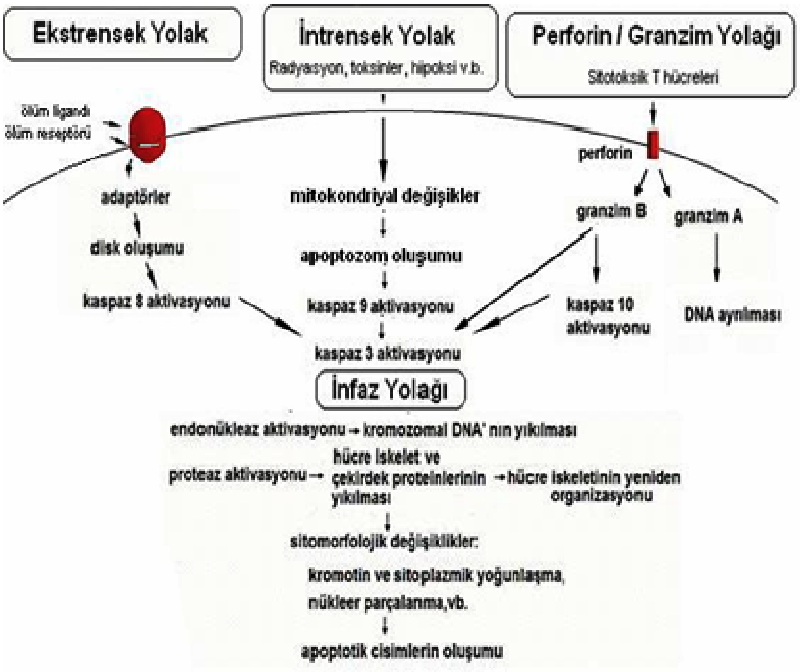
1.5.4.3. Diğer Yollar

Perforin/granzim yolu, granzim B ya da granzim A ile apoptozisi indükleyebilir. Ekstrensek, intrensek ve granzim B yolu aynı uçta ya da infaz yolunda odaklanabilir. Bu yol kaspaz 3'ün parçalanması ile başlatılabilir ve DNA'nın

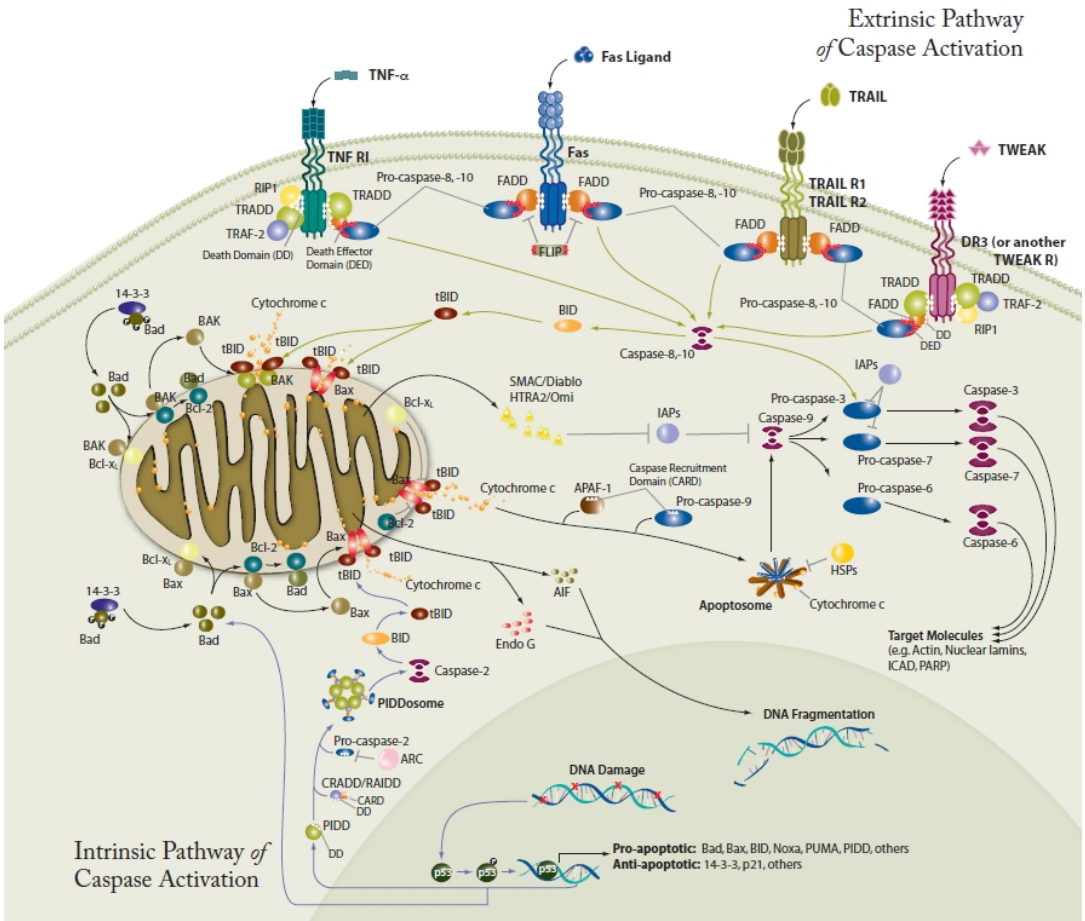
fragmantasyonunu, hücre iskeleti ve çekirdek proteinlerinin parçalanmasını, proteinlerin çapraz bağlanmasını, apoptotik yapıların oluşumunu, fagositik hücre reseptörleri için ligantların ekspresyonunu ve sonuç olarak fagositik hücreler tarafından yutulma basamaklarını içermektedir. Granzim A yolu tek iplikli DNA hasarı aracılığıyla paralel olan kaspaz bağımlı hücre ölüm yolunu aktive eder. Sitotoksik T lenfositler (CTLs) konakçı hücre yüzeyindeki antijenleri tanırlar ve bu sırada yüzeylerinde FasL oluşturarak hedef hücrenin Fas reseptörüne tutunurlar. CTL'ler sitoplazmalarında granzim B (serin proteaz) ve perforin adı verilen, apoptozisin oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler (Budd 2002). Bu CTL'ler, perforin ile porlar oluşturarak hedef hücrelerde kaspazları aktive edecek olan granzim B salgılarlar ve böylece perforinin salınımını içeren yeni bir yol aracılığı ile tümör hücresi ve virüs tarafından enfekte edilmiş hücre üzerinde sitotoksik etkilerini uygulayabilirler (Trapani ve Smyth 2002). Granzim A'da aynı zamanda apoptozisi uyaran ve kaspaz bağımsız yolu aktive eden sitotoksik T hücrelerinde de önemlidir. Hücrede bir kez granzim A, DNA'az NM23-H1 aracılığı ile DNA nicking'i aktive ettiğinde bir tümör süpressör gen üretilir (Fan ve ark 2003, Lieberman ve Fan 2003). Nükleozomda toplanan endoplazmik retikilum ilişkili (SET) proteinler, normal olarak NM23-H1 (metastaz-ilişkili gen) genini inhibe eder. Granzim A proteaz SET kompleksini parçalar böylece NM23-H1'in inhibisyonunu serbest bırakır bu da apoptotik DNA parçalanmasına yol açar (Eröz ve ark 2012). Apoptozis oluşumundaki yollar Şekil 1.4 ve Şekil 1.5 de verilmiştir.

1.6. Apoptozis ve Hastalıklar

Apoptozis hayatın ayrılmaz bir parçasıdır ve birçok hastalığın patojenezisinde rol alabilmektedir. Normal olarak apoptozis, istenmeyen, yaralanmış ve virüs tarafından enfekte edilmiş mutasyonlu genoma sahip hücreleri uzaklaştırmayı sağlar. Bu süreç bozulduğunda çeşitli hastalıklar oluşur. Kanser, aterosklerozis ve otoimmün hastalıklar apoptozisin baskılanması ile ilgilidir. Artmış apoptozis ile bağlantılı olan diğer hastalıklar; viral infeksiyonlar (AIDS), bakteriyel infeksiyonlar (Neisseria meningitidis), nörodejeneratif rahatsızlıklar (Alzheimer hastalığı), otoimmun rahatsızlıklar (multiple sklerosiz), hematolojik rahatsızlıklar (myelodisplastik sendromlar), iskemik yaralanmalar (myokard infarktüsü) ve toxinle indüklemiş hastalıklardır (alkolik hepatitler) (Fadeel ve ark 1999).



Şekil 1.4. Apoptozis oluşumundaki yollar (Elmore 2007)



Şekil 1.5. Apoptozisin intrensenk ve ekstrensenk yolları (http://www.rndsystems.com/)

Yaşlanma sürecinin de apoptozisin düzeninin bozulması ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bazı çalışmalar apoptozis düzenleyici proteinlerde yaşa bağımlı değişiklikleri göstermiştir ve bu durum yaşlı insanlardaki nörodejeneratif rahatsızlıklarla uyumludur (Joaquin ve Gollapudi 2001, Eröz ve ark 2012).

1.7. Apoptozis Kanser İlişkisi

Apoptozis özellikle kanser ile bağlantılıdır. Normal hücreler eğer anti kanser ilaçlar ve radyasyon gibi fizyolojik olmayan stress tipleri ile karşılaşırsa ölüm için programlanır (Fanidi ve ark 1992). Kanserdeki birçok hücrenin birikimi yaygın hücre proliferasyonu ve/veya yetersiz apoptoza neden olur. Antiapoptotik proteinlerin aktivitesi ya da artmış ekspresyonu, pro-apoptotik genlerdeki inaktive edici mutasyon, yetersiz apoptozis ve malign hücrelerin büyümesine neden olur (Evan ve Vousden 2001). Bu nedenle proapoptotik p53 tümör süpresör genindeki mutasyonlar ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin ekspresyonundaki değişiklikler dikkate alınmaktadır.

Bcl-2 geni; B-hücreli lenfomalarda, akut lösemilerde ve birçok solid tümörde aşırı bir şekilde ekspre edilir ve kötü prognoz ile uyumluluk göstermektedir (Reed ve ark 1996). Diğer Bcl-2 ailesine ait proteinlerin aşırı ekspresyonu da tanımlanmıştır; akut lösemilerde artmış Mcl-1 ekspresyonu kemoterapiden sonra nüks ile açıklanmıştır ve Bcl-xI düzeyindeki yükselme kronik myeloid lösemilerde (KML) ve multipl myelomlarda bulunmuştur (Michels ve ark 2005). Proapoptotik üyeler olan Bax ve Bak'ın ekspresyonundaki yetersizlikler kolon kanseri ve hematolojik maligniteler gibi çeşitli kanserlerde tanımlanmıştır (Brimmell ve ark 1998). Epstein–Barr virüsü (EBV) gibi çeşitli patojenik virüslerin genomu Bcl-2 homologlarını kodladığı belirtilmiştir (Zamzami ve ark 1998).

Tümör süpresör gen p53; DNA hasarı, hipoksi ve sıcaklık şoku gibi çeşitli koşullar tarafından aktive edilebilir. p53, hücre siklusunun durmasında (p21, Gadd45) ya da apoptozisin indüksiyonunda rol alan çeşitli genlerin (Bax, Apaf-1, caspase-9, Fas, p53-indükleyici gen (PIG) ve NOXA gibi) transkripsiyonunu düzenler (Soengas ve ark 1999). p53'ün mutasyona uğraması ya da delesyonu kanserde en sık görünen genetik anomalidir. p53 fonksiyonunu inaktive eden ve p53'deki mutasyonlar sonucu oluşan insan tümörlerinin %50'sinden daha fazlası bu nedenle oluşur (Schwartz ve Rotter 1998). p53'teki değişiklikler tümör supressör

aktivitesini kaldırır ve tümör oluşumuna eşlik eder. Mutant p53'leri eksprese eden hücreler de ilaç bağımlı apoptozise duyarlıdır (Oren 1999). Mutasyonlar ya da upstream p53 düzenleyicilerinin (ATM, Chk2, Mdm2 ve p19 (ARF)) değişmiş ekspresyonu ve p53 proteolizisini tetikleyen human papillomavirus (HPV)-E6 onkoproteini, insan tümörlerinde tanımlanmıştır (Oren 1999).

Diğer apoptotik düzenleyicilerindeki değişiklikler de aynı zamanda çeşitli malignitelerin patojenezisinde de yer almaktadır. İnsan Fas genindeki germline mutasyonları, otoimmün lenfoproliferatif sendromlar (ALAPS) ile ilişkilidir (Teitz ve ark 2000). Pro-kaspaz-8 ya da kaspaz-9 kodlayan genlerdeki mutasyonlar nöroblastoma ve gastrik karsinomalarda kaspaz-8 mutantlarını inaktive eden hücre ölümünde tanımlanmıştır (Soung ve ark 2005).

IAPs normal olarak hücreleri apoptozise karşı korur, fakat aynı zamanda malignite ile de uyumluluk gösterir. IAP survivin genel olarak kanserlerde aşırı ekspre edilir ve G2/M kontrol noktasında apoptozisi önleyerek birçok kanserde anormal mitoza eşlik eder (Li 2005). Tümör oluşumuna ilaveten, apoptozisdeki defektler ilaca karşı bozuklukların da temelini teşkil etmektedir. Bcl-2 ve Bcl-xI'in aşırı ekspresyonu kemoterapiye karşı hücrelerin dirençli olmasını sağlar; artmış Bcl-2 düzeylerinin etoposide, kamptothesin, doxorubisin, vinkristin ve aktinomisin D gibi kemoterapotik ajanlara ve dexamethasone'a karşı cevapta apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir (Eröz ve ark 2012).

1.7.1. Akciğer Kanserin ve Apoptozis

Apoptozisi uyaran bir gen olan p53'te mutasyon veya kayıp, akciğer karsinomunda %80 oranında görülmektedir (Kern ve McLennan 1998). Bunun yanında heterozigot kaybı (LOH) ve daha sonra belirlenen MTS 1/CDK41 (Multipl tümör supresör geni 1/siklin bağımlı kinaz 4 inhibitörü), PCNA (proliferasyon hücre çekirdek antijeni), proto-onkogeni ile kodlanan ve normal hücre çoğalması sinyal iletiminde görev alan protein (KRAS) de mutasyon saptanmıştır. İlk kez B hücreli lenfomada t (14;18) translokasyonunda kırık bölgesinde belirlenen bcl-2 geni, küçük hücreli dışı akciğer karsinomunda (KHDAK) olguların sadece % 8-30'unda görülür. Buna karşılık, küçük hücreli akciğer karsinomunda (KHAK) %90 oranında görülmektedir (Soini ve ark 1998, Harris 1994).

1.8. Tedavide Apoptozis

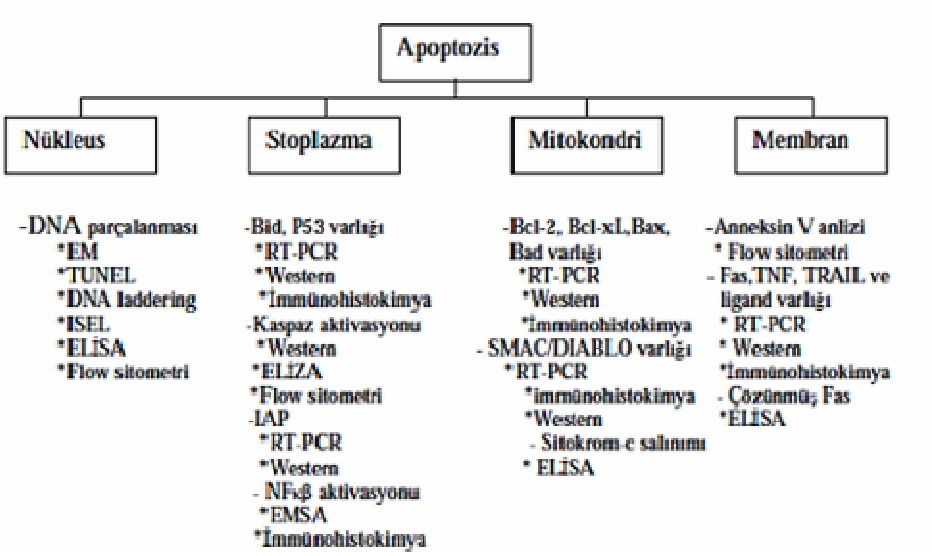
Bugün birçok hastalığın hücre ölümü ya da yaşamı ile ilgili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle apoptotik sürece müdahale edilmesiyle yeniden düzenlenmesi önemli tedavi yöntemlerini gündeme getirmektedir. Potansiyel tedavi yöntemleri üç kategoride toplanmaktadır. Bunlar; gen tedavisi (p53'un yedeklenmesi vb.), apoptoz moleküllerinin düzenleyicilerini hedefleyen moleküllerin enjeksiyonu (Growth faktörler ve çözülebilir FasL vb.) ve apoptozla ilişkin genlerin ifadesini (ekspresyonunu) düzenleyen farmakolojik küçük moleküller (Bcl–2 vb.). Bugüne kadar non-steroidal antiinflamatuvarlar gibi apoptoz düzeyini değiştirdiği bilinen birçok ilaç vardır. Aslında bütün sitotoksik ilaçlar ve radyoterapi programları tümör hücrelerinde apoptozu başlatır ve apoptoza olan direnç tedavideki başarısızlığı getirir. Üstelik bu tedaviler, normal hücrelerde de apoptozu başlatır ve kemik iliği üzerinde olumsuz yan etkileri vardır. Ayrıca apoptoz inhibisyonu yapan başka proteinler ve sentetik özgül kaspaz inhibitorleri de üretilmektedir. Tedavide kaspaz ailesi üyeleri ve bcl–2/bax ailesindeki genlerin ekspresyonları da önemli yer tutmaktadır (Aksit ve Bildik 2008).

1.9. Apoptozis Belirleme Yöntemleri

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler; morfolojik görüntüleme yöntemleri, immünohistokimyasal yöntemler, biyokimyasal yöntemler, immünolojik yöntemler ve moleküler biyoloji yöntemleridir (Ulukaya 2003). Her bir yöntemin, apoptozis sürecinde görev alan organellere göre dağılımı Şekil 1.6'da gösterilmiştir (Huerta ve ark 2007).

1.9. 1. Hematoksilen-eozin Boyama

Hematoksilen-eozin'le boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi (Güles ve Eren 2008).



Şekil 1.6. Apoptozisin organellerde gerçekleşen süreçlere göre belirlenme yöntemleri (Ulukaya 2003)

1.9.2. Giemsa Boyama

Giemsa ile boyamada, hematoksilen-eozin ile boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır (Güles ve Eren 2008).

1.9.3. Floresan Mikroskopi

Floresan mikroskopi, floresan maddelerin kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Canlı ve ölü hücre ayrımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (Propidium iyodur) beraber kullanılır.

Membranı sağlam olan (canlı) hücreler, propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir madde ile boyanmazlarken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen Hoechst boyası ile boyanırlar. Bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozla veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayrımı, hematoksilen boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisine bakılarak yapılır (Güles ve Eren 2008).

1.9.4. Elektron Mikroskopi

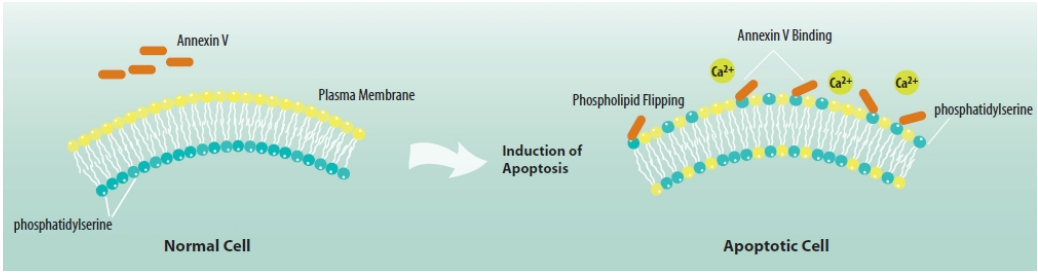
Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlendiği bir yöntemdir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da incelenebilir (Güles ve Eren 2008).

1.9.5. Faz Kontrast Mikroskopu

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücrelerin yapıştıkları alt tabakadan ayrılarak besi yerinde yüzmeleri, apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepçiklerle, hücreler henüz alt tabakaya yayılmış halde iseler stoplazmalarındaki vaküoller izlenebilirler (Güles ve Eren 2008).

1.9.6. Anneksin-V Yöntemi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipitlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin- V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (Şekil 1.7). FITC-Anneksin-V komplesinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir (Güles ve Eren 2008).



Şekil 1.7. Apoptosis-indüklenmiş memran değişimlerinin Annexin V ile tanımlanma şeması (http://www.rndsystems.com/)

1.9.7. TUNEL Yöntemi

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Konvansiyonel parafin kesitleri, terminal deoksinukleotidil transferaz (TdT) ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan in situ işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak "TdT-dUTP nick-endlabelling" sözcüklerinin kısaltılması olan "TUNEL" yöntemi adıyla anılmaktadır (Güles ve Eren 2008).

1.9.8. M30 Yöntemi

M30 yönteminde apoptotik hücreler, sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenirler (Güles ve Eren 2008).

Sitokeratin 18 (CK 18), tek katlı ve glandüler epiteliyal hücrelerin major komponenti olan bir tip-1 intermediate filament proteinidir. Apoptozis esnasında epiteliyal efektör kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktivasyonu sonucunda CK-18 açığa çıkmaktadır. Monoklonal antikor olan M-30, bir neoepitop olup, kaspaz aktivasyonu sonucu açığa çıkan CK-18'i spesifik olarak saptamaktadır. M-30, sadece kaspaz aktivasyonu sonucu açığa çıkan CK-18'i saptamaktadır. M-30 antikorlarının sadece apoptotik hücreleri saptadığını, ancak nekrotik hücreleri saptamadığı immünohistokimyasal olarak gösterilmiş ve M-30 antikoru reaktivitesinin, apoptozisde bir indeks olarak kullanılacağı belirtilmiştir (Leers ve ark 1999).

1.9.9. Kaspaz-3 Yöntemi

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir (Güles ve Eren 2008).

1.9.10. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz, orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için en yaygın destek ortamıdır. Agaroz jeller genellikle floresan bir boya olan ethidium bromide ile boyanır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir. Apoptotik hücrelerdeki endonükleaz aktivasyonu, kromatinin oligonukleozomal

parçacıklara ayrılmasına neden olur. Bu enzim kalsiyum ve magnezyum bağımlı olup, DNA'da tipik olarak 180-200 baz çifti ve katları biçiminde bir parçalanmaya yol açar. Bu parçalanma paterni, agoroz jel elektroforezinde merdiven biçiminde "ladder pattern" izlenir ve apopotoz için tipiktir. Agaroz jel elektroforez güvenilir sonuçlar veren kalitatif bir analiz yöntemidir (Güles ve Eren 2008).

1.9.11. Western Blotting

Western blotlama ya da immünoblotlama denilen yöntem, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metot istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlıdır. Bu antikor prob olarak kullanılarak ilgili protein bir karışımın içinden saptanabilir. Western blot hücrede ne kadar protein biriktiğini gösterir. Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriden çıkıp çıkmadığı da bu metotla belirlenebilir (Güles ve Eren 2008).

1.9.12. Flow Sitometri

Flow sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun belirlenmesi açısından kullanışlıdır.

Apoptoz flow sitometri uygulamasında iki şekilde belirlenir.

a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,

b. Anneksin V kullanılarak (Güles ve Eren 2008).

1.9.13. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

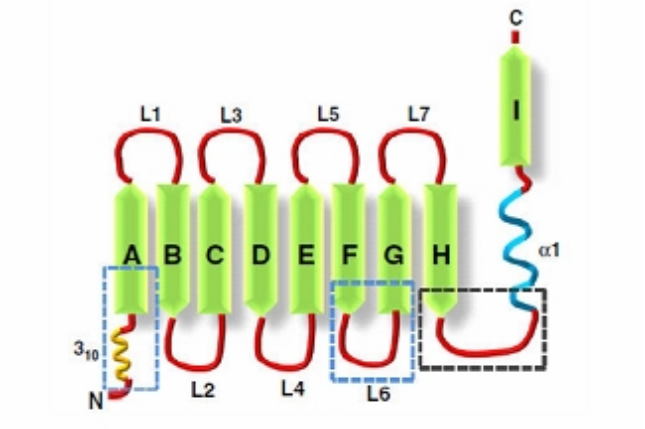
ELISA yönteminde, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir. Apoptozda görülen ilk olay, sitoplazma içine nükleozomların salınmasını takip eden DNA fragmentasyonudur. ELISA ile gerek

kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında, gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür. ELISA analizinde, ELISA pleytlerindeki sitoplazmik nükleozomları belirlemek ve yakalamak için iki nüklozomal epitopa spesifik bir çift monoklonal antikor kullanılır. Bu analiz yöntemi agaroz jel elektroforez ile apoptotik DNA merdiveninin belirlenmesinden yaklaşık 500 kat daha fazla duyarlı ve çok sayıda örneğin test edilmesi açısından daha uygundur (Güles ve Eren 2008).

1.10. NGAL (nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin)

NGAL, koku almadan, prostaglandin sentezine kadar uzanan büyük bir fonksiyonel çeşitlilik gösterdiği netleşmiş olan lipokalin (lipocalin 2 - lcn2) süper ailesinin bir üyesidir (Ueno ve ark 2005). Lipokalin 2, siderokalin, onkogenprotein 24p33, uterokalin ve alfa-2 mikroglobulin ilişkili protein, NGAL'ın sinonim isimleridir (Süleymanlar 2007, Lim ve ark 1995, Vanholder ve De Smet 1999).

Lipokalin grubunun üyeleri, küçük ve hidrofobik molekülleri bağlama özelliği olan ve hücre homeostazında rol oynayan ekstraselüler proteinlerdir (Vanholder ve De Smet 1999). Bu proteinler ayrıca; hücrelerin bazı molekülleri bağlayıp tekrar getirmesi için gönderdiği aracı proteinler olarak tanımlanmıştır (Goetz ve ark 2000). Lipokalin ailesinin başlıca üyeleri arasında; NGAL, RBP (Retinol-taşıyıcı protein), RABP (Retinoik asid taşıyıcı protein), A2U (alfa 2 globulin), BLG (beta-laktoglobulin), Apo-D (Apolipoprotein D), PGDS (Prostoglandin D synthase) yer almaktadır (Bolignano ve ark 2008).



Şekil 1.8. "Lipokalin fold"şematik gösterimi

Lipokalin ailesinin karekteristiği olan Lipokalin fold'u antiparalel dizilimli 8 beta sarmalını izleyen N-terminal 3-10 heliks oluşturmaktadır (Şekil 1.8). Bir C terminal beta tabakasının bağlı bulunduğu α-1 sarmalı 8. beta tabakasına bağlanır. Beta tabakaları döngüler (L1-L7) ile birbirine bağlanır. L1, L3, L5 ve L7 döngüleri molekülün açık olan ucunu oluşturur (Chakraborty ve ark 2012). Küçük hidrofobik moleküllere ve özel hücre yüzey reseptörlerine bağlanabilme, çözünebilir makromoleküller ile kompleksler oluşturabilme lipokalinlerin ortak moleküler özellikleridir.

Son zamanlarda yapılan bir çok çalışmada, özellikle akut böbrek hasarında, erken tanısal bir biyobelirteç olma özelliği ile önemini kanıtlamış monomerik yapıda bir protein olan NGAL, ilk olarak nötrofillerin jelatinazına bağlı bir protein olarak belirlenmiştir (Kültürsay ve Kayıkçıoğlu 2002).

NGAL, başlangıçta nötrofil lizozomlarında bulunması ile karakterizeyken, daha sonra renal tübüler epitelyum, kolon, prostat, meme gibi çeşitli dokularda da eksprese edildiği görülmüştür (Cohen ve ark 2001). NGAL stres altındaki hücreden sentezlenir. İnfeksiyon, inflamasyon (aktive nötrofillerin sekonder granüllerinden sentezlenir), iskemi, neoplastik transformasyon NGAL ekpresyonunun arttığı durumlardır (Di Marco ve ark 2008). Plazmada serbest veya tip IV kollagenaz (Jelatinaz B, MMP-9) ile kompleks halinde bulunabilmektedir (Yenicesu 2001).

NGAL'in hücresel aktiviteleri, spesifik hücre reseptörleri ile sağlanmaktadır. İki tip hücresel reseptör tanımlanmış olup; birisi 24p3R (beyin–tip organik katyon taşıyıcı), diğeri ise esas olarak renal tübüler hücrelerin yüzeyinde bulunan megalin reseptörü olup, NGAL'in endositozunda ve hücresel trafiğinde esas role sahiptirler (Hvidberg ve ark 2005). Bunlara ilave olarak, NGAL'in, hepatosit büyüme faktör, jelatinase B ve ekstraselüler protein kinazlar gibi diğer bazı reseptörler ve ligandlarla da etkileşimi ortaya konulmuştur (Singan 2012).

NGAL, proteazlara karşı dirençli olmakla birlikte, parçalandığında N-asetil-glukozaminidaz ve beta 2-mikroglobuline metabolize olur. Fizyolojik şartlarda, diğer küçük moleküller gibi lipokalinlerde glomerüllerden filtre olmakta, proksimal tübüldeki fırçamsı kenarda eksprese olan megalin reseptörleri aracılığıyla absorbe edilmekte ve endositoz ile hücre içine alınmaktadır. Sağlıklı bireylerde idrarda düşük

miktarda (~5ng/ml) bulunmaktadır (Hvidberg ve ark 2005). Küçük moleküler ağırlığı nedeniyle, kolaylıkla idrara ekskrete edilmekte ve artışın nedeni ne olursa olsun korele olarak plazma ve serumda tayin edilebilmektedir (Bolignano ve ark 2010).

1.10.1. Böbrek ve NGAL

Böbrek hasarının erken saptanması sendromun tanımlamasından daha önemlidir. Bu amaçla birçok araştırmacı iskemik hayvan modellerinde ve insanlarda, genomik yaklaşımlar ve biyoinformatik tekniklerin kombinasyonuyla birçok genin ekspresyon profillerini incelemiştir. Bu konuda akut böbrek hasarı için yeni biyobelirteçlerden beklentiler, hasarın lokalizasyonu (proksimal tübül, distal tübül, interstisyum, vasküler yapılar gibi), süresi (akut, kronik), prerenal, renal veya postrenal ayrımı, etyoloji ayrımı (iskemi, toksin, sepsis) akut böbrek hasarını diğer böbrek hastalıklarından ayırma (üriner trakt enfeksivonu, glomerulonefrit, interstisiyel nefrit), risk ve prognoz belirleme ve hasara yönelik girişimlerin monitörizasyonudur (Parikh ve Devaraja 2008). Bu beklentilerin çoğunu karşılayan NGAL geni, akut iskemik ve nefrotoksik hasar sonrası kreatininden önce kısa sürede böbrekte en fazla eksprese olan gen olarak gösterilmiştir (Altekin ve Kenesan, 2013).

NGAL üretimi renal epitelyum hasarı veya inflamasyonuna cevap olarak hızla artmaktadır. Akut böbrek hasarı sonrasında kanda ve idrarda NGAL proteini kolaylıkla tespit edilmiştir. Eksperimental olarak akut tübüler hasar sonrası böbrekte NGAL mRNA'sının 1000 kat arttığı; Western blotting teknikle akut böbrek hasarında plazmada 10, idrarda 100 kattan fazla artış gösterilmiştir (Yuen ve ark 2006).

Hasar sonrası NGAL düzeylerindeki bu erken yükselişin özellikle kardiyolojik cerrahi girişimler sonrası gelişen, akut böbrek hasarının erken tanımlanmasına olanak sağladığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Kardiyak cerrahi sonrası gelişen böbrek hasarında kreatinin ve NGAL düzeylerindeki yükselmelerin kıyaslandığı bir çalışmada operasyon sonrası NGAL düzeyleri altıncı saatte pik yaparken, kreatinindeki yükselmenin ikinci günde başladığı gözlenmiştir (Altekin ve Kenesan 2013).

1.10.2. İmmünite ve NGAL

Lipokalinlerin en önemli ligandları sideroforlarlardır. Sideroforlar, mikroorganizmalar tarafından salgılanan ve demire bağlanarak hücre içine taşıyan çoğu non-ribozomal peptidlerdir. Sidereforların NGAL için endojen ligand olarak görev yaptıkları, ona karakteristik parlak kırmızı rengini verdikleri ve biyolojik etkilerinin çoğunu modüle ettikleri bilinmektedir (Goetz ve ark 2002, Noris ve ark 1993).

NGAL'in hücre içi aktivitesi, hücre içine yalnız protein yapısında (Apo-NGAL) ya da demir bağlayıcı sideroforlar ile kompleks halinde (Holo-NGAL) alınıp alınmadığına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Holo-NGAL, endosomal veziküllerin içine alındıktan sonra sitoplazmik alana göç etmekte, siderofor-demir kompleksi açığa çıkmakta ve demir bağımlı spesifik yolaklar aktive olmaktadır. Protein yapı ise, ya degrade olmakta ya da tekrar hücre dışına atılmaktadır. Tersine, Apo-NGAL ise hücre içine alındıktan sonra hücresel demiri bir mıknatıs gibi çekmekte ve ekstraselüler aralığa yönlendirmektedir. Sonuçta hücresel demir havuzunun tüketimine yol açmakta ve muhtemelen apopitozise aracılık ettiği düşünülmektedir (Yang ve ark 2002).

NGAL'ın bakterilerden üretilen formilpeptidlere, lipopolisakkaritlere ve katekolat tip ferrik (Fe^{3+}) sideroforlar içeren küçük lipofilik gruplara bağlanabildiği belirtilmiştir. Bakterilerin büyümeleri için demir gereklidir, bakteriler demire (özellikle ferrik demir $Fe^{3+)}$ endojen demir şelatlarına oranla birkaç kat daha yüksek afinitesi olan sideroforları geliştirerek, sadece mevcut serbest demiri bağlamak için değil, aynı zamanda ana demir bağlama proteinlerinden demir elde edilmesini sağlarlar. Dolayısıyla NGAL, demir depolarını tüketerek bakterilerin büyümesini engeller. NGAL'ın siderefor şelatlayıcı bu etkisi, bakteriostatik özellik taşımasına da neden olmaktadır (Aksit ve Bildik 2008). Bundan dolayı doğal immun sistemin efektör molekülleri gibi fonksiyon üstlenmektedir (Fjaertoft ve ark 2005, Gültekin ve ark 2008). NGAL üretimi bakteriyel enfeksiyon varlığında artığından, dokulardaki NGAL düzeylerinden bakteriyel-viral enfeksiyon ayrımının tanımlanmasında da yaralanılmaktadır (Öktem ve ark 2001).

1.10.3. Neoplazi ve NGAL

NGAL ekspresyonu meme, kolon, prostat, akciğer gibi çeşitli kanserlerde uyarılmakta ve MMP-9 (Matriks metallo proteinaz) ile yaptığı kompleksin taranması kanserde hastalık düzeyi ile ilişkilendirilmektedir. 5v40, hepatosit büyüme faktörü, retinoik asit ve NF-kB gibi tümör gelişimini provoke eden moleküller tarafından NGAL gen indüksiyonun arttırıldığı tespit edilmiştir (Burz ve ark 2009, Baykal ve ark 1998). Ayrıca NGAL, ekstrasellüler matriks ve membranlarda yıkım görevi olan MMP-9 aktivitesini arttırmaktadır. MMP-9'a bağlı NGAL, invazyon ve metastazı kolaylaştırdığından, kanserde düzeyinin artması kötü prognoza işaret eder (Silva ve Nizet 2009).

Palpe edilemeyen meme lezyonları nedeniyle histolojik tanı için meme biyopsisi yapılmış 113 hasta ve 30 sağlıklı kadının kontrol olduğu bir çalışmada, MMP-9, NGAL ve MMP- 9/NGAL kompleksinin düzeyleri, periferik kanda enzim immün ölçüm ile belirlenmiştir. İnvaziv duktal karsinomu olan kadınlarda kontrol ile karşılaştırıldığında belirgin MMP-9, NGAL ve MMP-9/NGAL düzeyi artışı izlenmiştir. MMP-9 ve NGAL serum düzeyleri ile meme hastalığı ciddiyet skoru arasında belirgin korelasyon izlenirken, kompleksleriyle anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır (Barak ve ark 2004). Bu bulgular serum MMP-9 ve NGAL ölçümlerinin meme hastalığı durumunda potansiyel belirteç rolü oynamaları yanında meme kanseri progresyonunun non invaziv takibinde de kullanışlı olabileceğini göstermektedir.

İnflamatuar kolon hastalıklarında, kolonun premalign ve malign lezyonlarında, gastrik kanserlerde NGAL ekspresyonunun indüklendiği, ayrıca prognoz belirleme ve tedavi izleminde NGAL düzeylerinin değerlendirmede kullanılabileceğine dair çalışmalar da bulunmaktadır (Linder 2007, Milli 2000).

NGAL ekspresyonu ovaryan kanser hücrelerinde de araştırılmıştır. İmmünohistokimya kullanılarak, normal, benign, sınır malign ve grade 1, 2 ve 3 malign doku içeren 59 over dokusu analiz edilmiştir. En yüksek NGAL ekspresyonu sınır ve grade 1 tümörlerinde belirlenmiştir. Normal ve farklı derecedeki kanser hastalarından alınan 62 serum örneğinde, ELISA ile NGAL analiz edilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, benign tümorlü ve grade 1 tümörlü kanser hastalarında serum NGAL konsantrasyonunda 2 ve 2,6 kat artış belirlenmiştir. NGAL

ekspresyonu epidermal büyüme faktörü tarafından tetiklenen over tümörü hücre hatlarında mezenkimal epitelyal transizyon geçişini aşağı yönlü düzenlemiştir. NGAL ekspresyonunun down regülasyonu; vimentin ekpresyonu, kuvvetlendirilmiş hücre dispersiyonu ve E-cadherin ekspresyonun downregülasyonu ile korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir. Bu bilgiler NGAL'in benign, premalign ve malign over tümorlerinin ayrımında belirteç olabileceğini göstermektedir (Lim ve ark 2007).

NGAL ekspresyonunun kolorektal karsinomada da arttığı rapor edilmiştir. NGAL, meme kanseri hastalarında zayıf prognostik faktöre sahipken, over kanserlerinde %72 duyarlılığa ve %50 spesifikliğe sahiptir. İnflamatuar kolon hastalıklarında, kolonun premalign ve malign lezyonlarında, gastrik kanserlerde NGAL ekspresyonunun indüklendiği, ayrıca prognoz belirleme ve tedavi izleminde NGAL düzeylerinin değerlendirmede kullanılabileceğine dair çalışmalar da bulunmaktadır. Tiroid kanserli hücrelerde apoptozisin inhibisyonunda, pankreas kanserlerinde invazyon ve anjiogenez inhibisyonunda, meme ve kolon kanserinde proliferasyon ve metestazın artmasında NGAL'ın çeşitli fonksiyonlarının olduğu literatürde rapor edilmiştir (Chakraborty ve ark 2012).

1.10.4. Kalp Yetmezliği ve NGAL

Fonksiyon kaybı olan myokard zemininde, kardiyomiyosit, fibroblast ve özellikle nötrofili içeren bağışıklık sistemin aktivasyonu, artmış miyokardiyal NGAL mRNA ve protein konsantrasyonlarıyla ilişkilidir. Serum NGAL düzeyi, çeşitli çalışmalarda kronik kalp yetersizliği hastalarında artmış mortalite ve yüksek NGAL sınıfları ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Kardiyomiyosit hasarı ile indüklenen NGAL salınımı, aynı zamanda önceden değeri anlaşılmış daha dinamik bir kardiyorenal sinyalleme etkileşimi anlamına gelebilmektedir. Kronik kalp yetmezliği hastalarında yaş uyumlu olarak serum NGAL seviyelerinde artışlar belirlenerek NGAL>783 ng/ml olması ile iki yıllık mortalite artışı arasında ilişki saptanmıştır (Bolignano ve ark 2009).

Nükleer perfüzyon stres testi kullanılarak oluşturulan miyokard perfüzyon defektlerinde, özellikle hastalardan bazal sol ventrikül disfonksiyonu kanıtı olanlarda NGAL salınımı ile kardiyak stres belirteçleri düzeyleri (NT-proBNP, BNP) ve kardiyomiyosit troponin salınım arasında ilişki belirlenmiştir (Haapio ve ark 2011).

Üriner NGAL ile eGFR (glomeruların filtre hızı) ve NT-proBNP düzeyleri arasında anlamlı ilişki ile birlikte üriner NGAL düzeylerinin kontrollere kıyasla kalp yetmezliği hastalarında yükseldiğini gösterilmiştir. Ayrıca, farklı kalp yetmezlik etiyolojileri (iskemik, kardiyomiyopatik) olan hastalarda serum NGAL seviyeleri yüksekliği arasında anlamlı farklılık görülmemiştir (Damman ve ark 2008).

Miyokardit ve iskemiye bağlı kalp yetmezliğinin inflamatuar modellerinin incelenmesinde, hem sıçanlarda hemde insanlarda, kardiyomiyosit ve hepatositlerde lipocalin2/NGAL'in güçlü bir şekilde eksprese edildiği ve bunun interlökin-1 (IL-1) ile indüklendiği gösterilmiştir (Yndestad ve ark 2009).

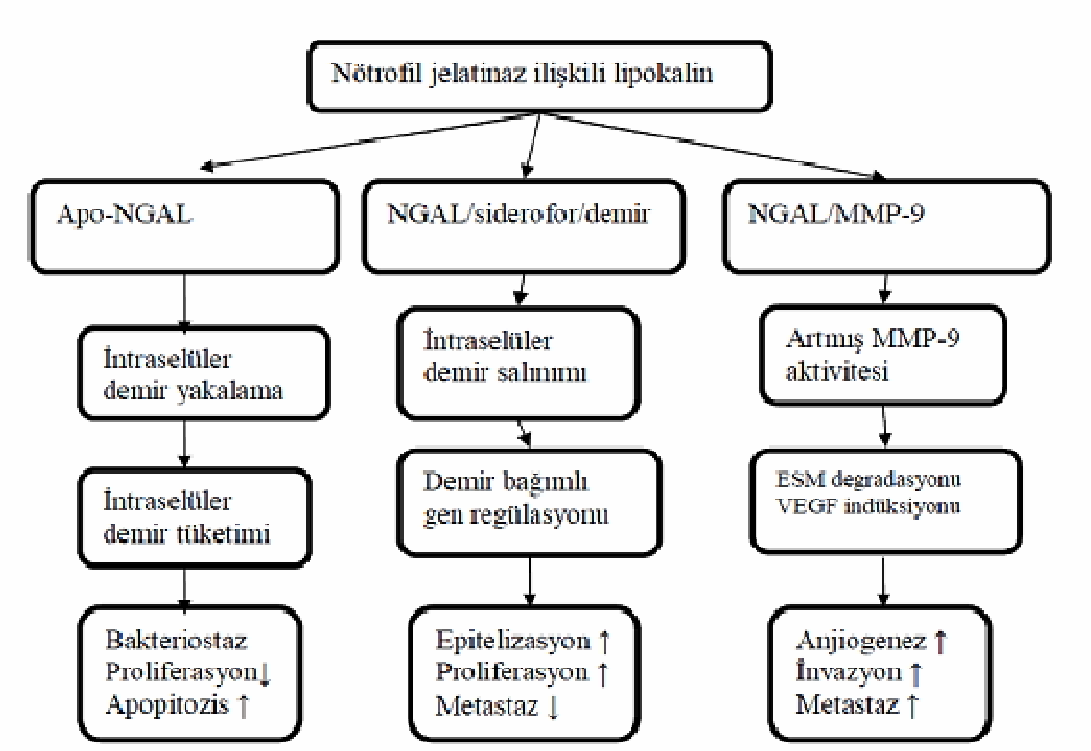
1.10.5. Aterosklerotik Hastalıklar ve NGAL

İnflamasyon, aterosklerozun başlangıcından ilerleme ve kararsız hale gelme evresine kadar tüm aşamalarda rol oynayan önemli ve esas faktördür. Mevcut kanıtlar miyokard infarktüsüne sebep olan trombüs formasyonu başlangıcının aterosklerotik plağın fiziksel bozulması nedeniyle olduğunu göstermektedir. Trombüs formasyonunu presipite eden 2 majör neden, plak kapsülünün ve endotelin erezyonudur. İnflamasyon aterosklerotik plakta plak kararsızlığına yol açarak plağın fiziksel bozulmasına ve progresyonuna katkıda bulunur. İnflamatuar mediatörlerin ateromda bulunan düz kas hücre büyümesi ve kollajen üretimini inhibe ettiği ve matriks metalloproteinaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu azalan kollajen içeriği ve plak yapısının zayıflaması rüptüre eğilimli fibröz kapsül ile sonuçlanmaktadır (Singan 2012).

MMP'ler aterosklerotik hastalığın anahtarlarıdır. Ekstraselüler matriks elemanlarını degrade edebilme yeteneğine sahiptirler ve vasküler remodelingden sorumludurlar. Aterosklerotik lezyonların fibröz kapsülünün bozulmasına katkıda bulunurlar MMP-9 hassas aterosklerotik plaktan eksprese edilen MMP'lerin bir üyesidir. Özellikle MMP-9, hem insan çalışmaları ve hemde deneysel modellemelerde aterosklerotik plak destabilizasyonunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Galis ve Khatri 2002).

Hemdhal ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışma sonuçlarında AMI (akut miyokard infark) gelişen aterosklerotik fare modellerinde, proteolitik aktivitenin arttığı alanlarda MMP-9 ekspresyonun arttığı gösterilmiştir. MMP-9'un plazma

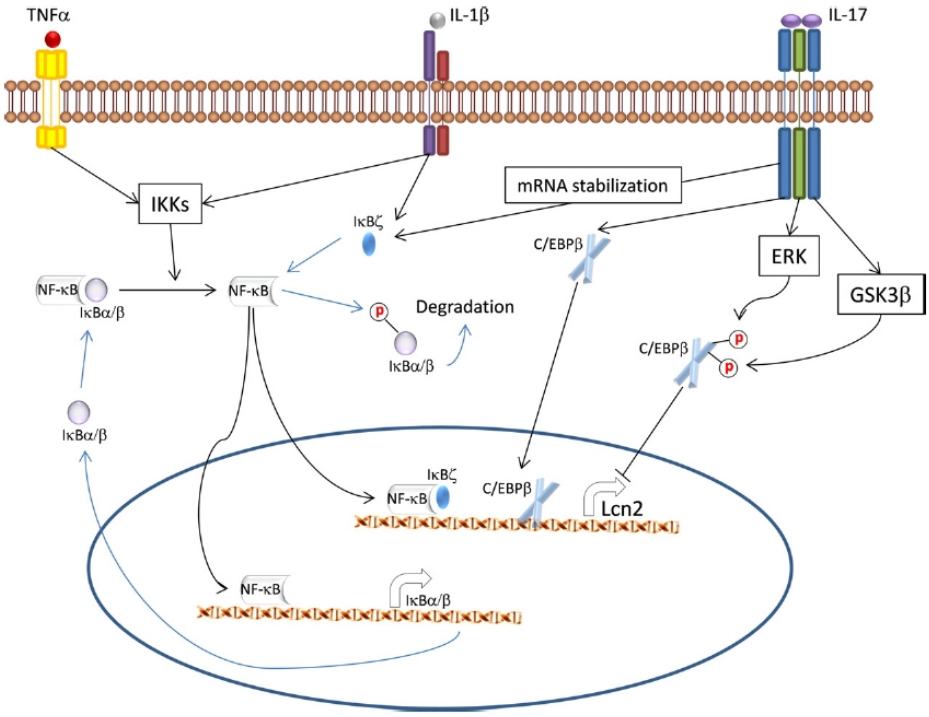
düzeyleri, koroner arter hastalığı olan hastalardan oluşan büyük bir kohort çalışmasında kardiyovasküler mortalite göstergesi olduğu gözlenmiştir. MMP-9'un inaktivasyonu için sorumlu ana mekanizma (TIMP-1) tarafından yapılan inhibisyondur. Bu inhibisyondaki azalma plak rüptürüne neden olduğu tartışılmıştır. Karotis plakları içeren bir çalışmada spontan embolizasyon ve unstabil plaklı hastalarda artmış MMP-9 ile birlikte önemli derecede artan MMP-9/TIMP-1 oranı gösterilmiştir. NGAL, MMP-9'u TIMP-1 tarafından inhibisyondan koruyarak MMP-9/TIMP-1 oranını arttırır. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminde NGAL fonksiyonu ve MMP-9 aktivitesi üzerindeki etkisi göz önüne alındığında, NGAL aterosklerotik plak destabilizasyonunda önemli bir rol oynadığından bahsedilebilir. NGAL'ın ekspresyonu aterogenez esnasında vasküler hücreler tarafından indüklenmektedir. NF-kB vasküler inflamatuar cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynar. Makrofaj ve epitelyal hücrelerden NGAL ekspresyonunun regülasyonuna son zamanlarda NF-kB aktivasyonu da dahil edilmiştir (Hemdahl ve ark 2006, Paragas ve ark 2011). NGAL'ın biyolojik rolü Şekil 1.9'de özetlenmiştir.



Şekil 1.9. NGAL'ın biyolojik rolü (İpek 2012)

1.11. NGAL Ekspresyonu

NGAL sentezi sağlıklı insanlarda çok düşük miktarda meydana gelmektedir. Dolaşımdaki ana kaynağını nötrofiller oluşturmaktadır. Aynı zamanda düşük miktarlarda böbrek, prostat, akciğer, timus, karaciğer, solunum ve sindirim yolu epitelinde, ayrıca postpartum uterus dokusu ve ek gıdaya geçiş döneminde meme dokusunda olduğu gibi involüsyona uğrayan dokularda da eksprese edildiği gösterilmiştir. NGAL ekspresyonunu düzenleyen faktörler interlökin, tümör nekroz faktörü (Şekil 1.10) ve interferon gibi pro-inflamatuvar sitokinleri ve retinoik asit gibi vitaminleri içerek şekilde çok sayıda ve çeşitlidir (Singan 2012) .



Şekil 1.10. Reseptör aktivasyonu ile NGAL regülasyonu

Yapılan çalışmalarda deri, tiroid, meme, over, endometrium, kolon, akciğer, karaciğer, safra yolları, özofagus, mide ve pankreas dahil olmak üzere çeşitli organlardan kaynaklanan malign tümörlerde ve aynı zamanda inflamatuar, iskemik ve metabolik bozukluklar da dahil olmak üzere pek çok hastalıkta dokularda ve vücut sıvılarında NGAL ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Chakraborty ve ark 2012).

Hem akut hem kronik böbrek hasarına yanıt olarak NGAL ekspresyonunun artması son yıllarda önemli ölçüde önem kazanmıştır. Kontrast maddeden

postoperatif stres'e kadar uzanan çeşitli nedenlere bağlı gelişen akut böbrek hasarında, böbreklerde NGAL ekspresyonunda önemli bir artış olur. Bu konuda yapılan çoğu çalışma göstermiştir ki; böbrek hasarı olan hastaların hem erken tanısında hemde prognozu öngörmede idrar ve serum NGAL ölçümü önemli bir biyomarker haline gelmiştir (Schmidt-Ott ve ark 2006).

Çizelge 1.3 de bazı hastalıklarda NGAL ile yapılan çalışmalar ve sonuçları verilmiştir.

Çizelge 1.3. Bazı hastalıklarda NGAL ile yapılan çalışmalar ve sonuçları (Singan 2012)

İnflamatuar hastalıklar	**Psöriasis:** Atopik dermatitliolgularla karşılaştırıldığında sedef hastalarında ciltte 10 kat fazla upregülasyonu gösterildi (Nomura ve ark 2003). **Parakeratoz:** Parakeratoz alanları altındaki etkilenen deri dokusunun epidermisinde NGAL ekspresyonu gösterildi (Mallbris ve ark 2002). **Miyokardit:** Kontrol dokularına kıyasla hayvan ve insan miyokarditlerinde endotel hücreleri, perisitler, düz kas hücreleri, fibroblastlar, lökositler ve kardiyomiyositlerde NGAL'in önemli upregülasyonu ve NGAL reseptör ve IL-2 (NGAL düzenleyicisi) ekspresyonu gözlenmiştir (Ding ve ark 2010, Yndestad ve ark 2009). **HIV:** HIV-pozitif hastalar ile karşılaştırıldığında HIV negatif sağlıklı bireylerde NGAL seviyesi yüksek bulunmuştur. Sonderece aktif antriretroviral tedavi (HAART) ile 12 ay tedavi sonrası HIV hastalarının NGAL düzeyleri progresif bir şekilde artarak normal değerlere yakın bir değere ulaşmıştır (Landro ve ark 2008). **Ülseratif kolit:** (i) Mikrosatellit negatif kolorektal karsinom (CRC, n=15), aktif ülseratif kolit (UC, n=9), aktif Crohn hastalığı (n=5) ve villöz/tubulovillöz adenomu (n=15) olan hastalardan, endoskopik olarak biyopsi materyalinin microarray analiz ile adenom, UC, inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) (ülseratif kolit ve Crohn hastalığı, 11 kat) ve CRC (8 kat) normale göre NGAL önemli upregülasyonu ortaya çıkmıştır. (İİ) Ülseratif kolit ve Chron hastalığı vakalarının arasında bir karşılaştırmada NGAL ekspresyonu UC olgularında anlamalı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür.
İskemik hastalıklar	**SVO, İnme**: Plazma NGAL seviyesi kontrol grubuna göre inme grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Anwaar ve ark 1998). **Miyokard İnfarktüsü:** Stabil KAH olanlar ile karşılaştırıldığında akut miyokard infarktüsü geçiren hastalarda NGAL ekspresyonunda anlamlı yükselme gösterilmiştir (Sahinarslan ve ark 2011). **Kronik venöz yaralar (CVW):** NGAL düzeyleri iyileşmemiş CVW hastalarına kıyasla iyileşmiş CVW hastalarının yara eksudalarında anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlenmiş.
Metabolik hastalıklar	(i) Obez insanı taklit eden bir fare modelinde adipoz dokuda LCN2 düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir. (ii) Serum NGAL seviyeleri gestasyonel diyabet gelişen gebelerde gelişmeyenlere göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca, insülin direnci ve beta hücre fonksiyonunun tanınmış göstergesi olan homeostatik model asseessment (HOMA) skoruyla NGAL düzeyleri pozitif korele bulunmuştur. (iii) Serum NGAL normotansif kontroller ile karşılaştırıldığında preeklamptik kadınlarda daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. NGAL düzeyleri ile sistolik, diyastolik kan basıncı ve proteinüri arasında anlamlı pozitif korelasyon gözlenmiştir. Anne yaşı gebelik öncesi VKİ ve doğum ağırlığı ile negatif korelasyon gözlenmiştir (D'Anna ve ark 2009).
Renal hastalıklar	(i) **İskemik böbrek yaralanması:** NGAL Henle kulpunun kalın çıkan kolu ve toplayıcı kanalı döşeyen hücrelerden salınır (Hvidberg ve ark 2005). (ii) Kronik böbrek hastalığı (Viau ve ark 2010). a) NGAL ekspresyonu nefron küçültme ameliyatından 8 hafta sonra farelerin böbreklerinde yaklaşık 10 kat upregüle edilmiştir. b)NGAL ekspresyonu böbrek hasarının derecesi ile ilişkilidir ve doku NGAL ekspresyonu, idrar NGAL ekspresyonu ile ilişkilidir. c)NGAL ekspresyonu otozomal dominant polikistik böbrek hastalarının kistlerinde ve idrarda anlamlı artmış ve hastalığın ilerlemesi ile pozitif korelasyon göstermiştir. d) NGAL ekspresyonu IgA nefropatisi ve konjenital nefron eksikliği gibi fonksiyonel nefron kaybı ile karakterize hastalıkların böbrek tübüllerinde anlamlı dercede yüksek bulunmuştur.
Transplantasyon	(i) **Kalp**: Uzamış (10 saat) soğuk iskemi sonrasında donör kalpte reperfüzyon üzerine LCN2 mRNA yaklaşık 15 kat upregüle edildi (Amberger ve ark 2002). (ii) **Böbrek**: Beyin ölümü gerçekleşmiş donörlerden elde edilen böbreklerde transplantasyondan önce ya da hemen sonra mikroarray analiz ile NGAL'ide içeren pro-inflamatuar genlerin önemli upregülasyonu saptandı. Pathway analizinde p53 ve NF-kB sinyal yolağında en belirgin değişiklik olduğunu ortaya çıkmıştır (Kusaka ve ark 2007).

2. GEREÇLER ve YÖNTEM

2.1. Hastaların Seçimi

Çalışmaya Selçuk Üniversitesi, Selçuk Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Kliniği'ne akciğer kanseri tanısı ile kabul edilen ve cerrahi operasyon geçiren 40-70 yaşları arasındaki 40 hasta dahil edilmiştir.

Akut inme, romatolojik hastalıklar, kronik böbrek hastalığı, konjestif kalp yetmezliği, kronik enfeksiyon ve akciğer kanseri dışında diğer organ ve sistem kanserlerine sahip hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

Bu çalışma için Selçuk Üniversitesi Selçuk Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 29.5.2012 tarih ve 2012/108 karar sayılı onayı alınmıştır.

2.2. Serum Örnekleri Çalışma Protokolü

Serum NGAL ve M30 analizleri için 2 grup oluşturulmuştur.

1. Grup 1 (n=40): (Normal grup) : Akut inme, romatolojik hastalıklar, kronik böbrek hastalığı, konjestif kalp yetmezliği, kronik enfeksiyon ve herhangi bir bilinen kanser rahatsızlıklarına sahip olmayanlardan oluşturulmuştur.

2. Grup 2 (n=40): Akciğer kanseri tanısı koyulmuş ve cerrahi operasyondan önce kan örneklerinin alındığı hasta grubu.

Normal grubun (grup 1) yaş ortalaması; 51 ± 10 olup 28 erkek ve 12 kadından oluşturuldu. Grup 2'de hastaların yaş ortalaması 55 ± 9 olup 26 erkek, 14 kadın hastadan oluşturuldu.

Hastalardan rutin tetkikleri sırasında alınan ve biyokimya laboratuarına gönderilen venöz kan örnekleri antikoagülansız kuru tüplere alınarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Serumlar ayrıldıktan sonra analiz edilinceye kadar -80 derecede saklandı.

2.3. NGAL Tayini

NGAL, BioVendor marka kit ile (BioVendor GmbH, D-69120 Heidelberg, Germany), Rayto-2100C Microplate Reader model cihazda (India) ELISA yöntemi ile tayin edildi.

Önce kit içinde bulunan liyofilize 10 ng/ml konsantrasyonundaki stok standart, dilüsyon tamponuyla çözüldü. Seri dilüsyon yapılarak 50 ng/L ve 500 ng/L konsantrasyonları arasında standartlar hazırlandı. -80 ˚C'de muhafaza edilen serum örnekleri oda sıcaklığında çözülüp dilusyon tamponuyla 30 kat seyreltildi.

Dilue standart ve dilue örneklerden 100 µl alınıp, 96 kuyucuklu Lipocalin-2/NGAL antikoruyla kaplı plaktaki kuyucuklara pipetlendi. Plak oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. İnkubasyondan sonra her bir kuyucuk 3 kez 350 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra tüm kuyucuklara 100 µl biyotinlenmiş Lipocalin-2/NGAL solüsyonu pipetlendi ve plağın yüzeyi kapatıldı. Plak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkubasyonun sonunda her bir kuyucuk 3 kez 350 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP solüsyonu pipetlenip, plağın yüzeyi kapatıldı ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Her bir kuyucuk 3 kez 350 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama aşamasını takiben plağa 100 µl stabilize edilmiş kromojen ilave edildi. 10 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta plağın inkübasyonu yapıldı. Plaklara 100 µl H_2SO_4 içeren stop solüsyonu ilave edilip reaksiyon durduruldu. Çalışma sonunda plaklardaki optik yoğunluk 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda değerlendirildi. Sonuçlar ng/L olarak verildi.

2.4. M30 tayini

M30, Peviva (Lausen,Switzerland) firmasına ait M30-Apoptosense ELISA kiti (a solid phase, two-site immunosorbent) ile çalışıldı. Ölçümler Rayto-2100C Microplate Reader model cihazda (India) ELISA yöntemi ile gerçekleştirildi.

Ölçümden önce tüm reaktiflerin ve serumların oda sıcaklığına ulaşması beklendi. Reaktifler ve serumlar vortekslendi. 25 µl standard, kontrol veya örnekler, mouse monoklonal antikoru ile yüklenmiş kuyucuklara pipetlendi. Ara vermeden her kuyucuğa 75 µl dilüe HRP (Horseradish Peroxidase Conjugated Monoclonal)

konjugat solüsyonu eklendi. Bu adım toplam 15 dakika içinde bitirildi. Her kuyucuğa 75 µL M30 HRP konjugat solüsyonu eklendi. Plaklar yaklasık 600 rpm'de dört saat boyunca çalkalanarak oda sıcaklıgında inkübe edildi. Kuyucuklardaki sıvı tamamen aspire edilerek her kuyucuk 250 µL yıkama solüsyonu ile yıkandı. Bu işlem toplam beş defa tekrar edildi.

HRP'nin yıkama ile tamamen uzaklaştırılmasından sonra her kuyucuğa 200 µL TMB çözeltisi eklendi ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, her kuyucuğa 50 µl ''Stop'' solüsyonu (H_2SO_4) eklenerek durduruldu. TMB (3,3',5,5'-Tetrametil-benzidin) çözeltisi ile ''Stop'' solüsyonunun tamamen karıştığından emin olmak için plak, 5-10 saniye çalkalandı.

Gerekli protokol aşamalarıdan sonra absorbans ölçümleri 450 nm'de mikroplaka okuyucuları ile gerçekleştirildi. Standart M30 antikorların bilinen miktarına karşılık ölçülen absorbans değerlerinin grafiğe alındığı kalibrasyon grafiği kullanılarak örneklerdeki M30 düzeyleri U/L olarak belirlendi. Üretici firmanın kullanım kitapçığında belirtildiği şekliyle bir litredeki unite (U); sentezlenen M30 içerikli peptidin 1.24 pmol'u olarak tanımlandı.

2.5. İmmünohistokimya Analizleri

Akciğer doku örnekleri, cerrahi operasyon sırasında hastalardan patolojik inceleme için (tümörün histopatolojik türü, evresi, vb) rutin olarak alınan ve patoloji laboratuarına gönderilen örneklerden alındı. Doku örneklerine aşağıda belirtilen işlemler uygulandı.

1- Patolojik inceleme ile dokular özelliklerine göre ayrıldıktan sonra analiz anına kadar -80ºC' de saklandı.

2- Analiz aşamasında derin dondurucudan çıkarılan örneklerden 4-6 mikron kalınlığında özel polileyzinli lamlar üzerine frozen kesit alındı. Her bir örnekten kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 antijenleri için 3 ayrı lama kesitler alındı.

3- Kesitler üzerine dokuyu örtecek şekilde aseton eklendi ve -20 ºC'de 30 dk bekletildi.

4- Oda sıcaklığına alınan örneklere tekrar aseton ilave edilerek 10 dk bekletildi.

5- Beşer dakika arayla 3 kez PBS ile yıkandı.

6- Triton X eklenerek 5 dakika bekletildi.

7- Beşer dakika arayla 3 kez PBS ile yıkandı.

8- Lamlar üzerindeki fazla sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra kesitler üzerine blok çözeltisi eklenerek 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.

9- PBS ile yıkanan kesitler üzerine primer antikor olarak aktif kaspaz-3 [CPP32 (Cysteine protease protein-32), sulandırma oranı 1/25)], aktif kaspase-8 [FLICE (FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme), sulandırma oranı 1/25] ve aktif kaspaz-9 [LAP6 Ab-4 (Rabbit Polyclonal Antibody), sulandırma oranı 1/100] eklenerek 1 gece +4 ºC'de bekletildi.

10- Onar dakika arayla 3 kez Tween 20 ile yıkandı.

11- Lamlar üzerindeki fazla sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra, karanlıkta kesitler üzerine sekonder çözelti eklendi ve 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.

12- Beşer dakika arayla 3 kez Tween 20 ile yıkandı. Bu basamağa kadar lamlar nemli ortamda tutuldu.

13- Lamlar üzerindeki fazla sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra kesitler üzerine Mounting medium (DAPI, 4′,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) eklendi ve lamellerle kapatıldı. Lamel kenarları sızdırmaz şeffaf cilayla kapatıldıkdan sonra ışıktan korunacak şekilde floresans miroskobuyla incelenineye kadar +4 ºC'de tutuldu.

14- Histolojik olarak, apoptozun şiddeti ya da oranı apoptotik indeksle ifade edilmektedir. Bu indeks apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere yüzdesel oranı ile bulunmaktadır (Prieto ve ark, 2002). Floresans mikroskopla x40 büyütmede doku kesitlerinin rastgele farklı bölgelerinden apoptotik hücre morfolojisi dikkate alınarak Floresans mikroskobun kırmızı ışını altında apoptotik hücre sayımı yapıldı. Yaşayabilir hücreler, Floresans mikroskobun DAPI filtresi kullanılarak mavi ışık altında belirlendi ve sayımı yapıldı. Hücre sayımlarının ortalamaları dikkate alınarak apoptotik indeksler hesaplandı [Apoptotik İndeks=(apoptotik hücre sayısı/yaşayabilir hücre sayısı)x100].

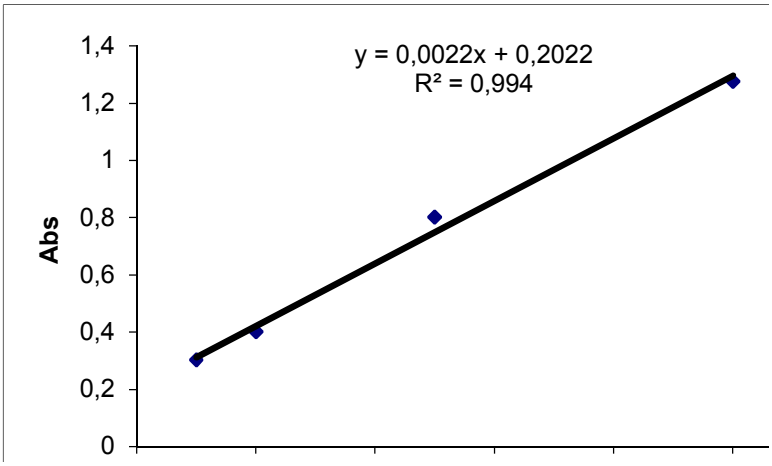
2.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler istatistik paket programı kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar ortalama ve ortanca ± standart sapma (SD) olarak verildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Tek Örneklem Kolmogorov Smirnov testi kullanarak belirlendi. Sayısal verilerin ortalama ya da ortancalarının karşılaştırılmasında, normal dağılım

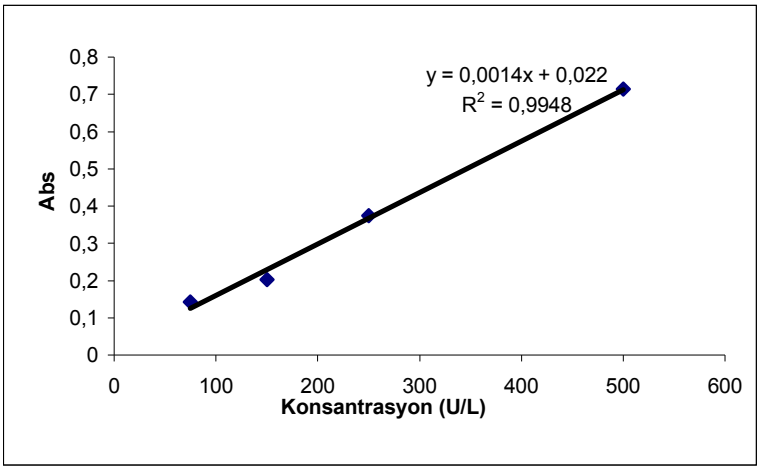
gösteren NGAL verileri için Bağımsız Örneklem T-testi, normal dağılmayan M30 verileri ve Apoptotik indekslerin değerlendirmesinde ise Mann-Whitney-U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak $p<0.05$ değeri kabul edildi.

3. BULGULAR

Bu çalışmada; Normal grupdan ve cerrahi operasyon öncesi akciğer tanısı koyulmuş hasta grubundan alınan serum örneklerinde, NGAL ve M30 düzeyleri ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Standart çözeltiler kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafikleri NGAL için Şekil 2.1'de ve M30 için Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.1. NGAL için kalibrasyon grafiği



Şekil 2.2. M30 için kalibrasyon grafiği

Gruplar için istatistiki veriler NGAL için Çizelge 2.1'de ve M30 için Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. NGAL için grup istatistiği

Grup	N	Ortalama (ng/L)	Std. Sapma	Minimum	Maximum
AK	40	424,03*	74,49	282,52	551,68
Normal	40	374,04	90,34	240,27	523,51

AK: Akciğer kanseri, * AK grubu ile normal grup arasındaki istatistiği fark anlamlıdır ($p<0.01$).

Çalışmamızda serum NGAL'ın ortalama düzeyleri; akciğer kanseri grubunda ve normal grupta sırasıyla 424,03±74,49 ve 374,04± 90,34 ng/L olarak bulunmuştur.

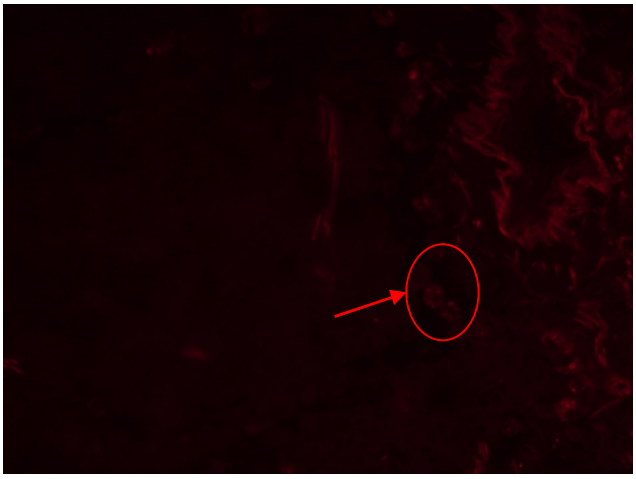
Çizelge 2.2. M30 için grup istatistiği

Grup	N	Ortanca (U/L)	Ortalama (U/L)	Std. Sapma	Minimum	Maximum
AK	40	136,74*	144,08	45,91	87,01	266,45
Normal	40	109,35	118,76	46,16	54,59	266,45

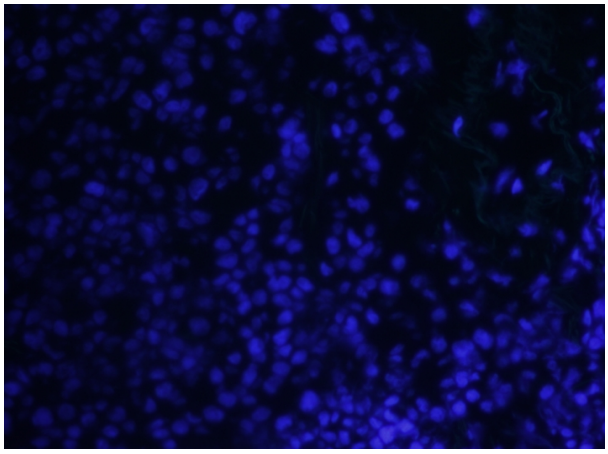
* AK grubu ile normal grup arasındaki istatistiği fark anlamlıdır ($p<0.01$).

Dolaşımda apoptozis belirteci olan serum M30'un ortalama düzeyleri; akciğer kanseri grubunda ve normal grupta sırasıyla 144,08±45,91 ve 118,76± 46,16 U/L olarak bulunmuştur.

Akciğer kanseri hastalarında cerrahi operasyondan sonra kanserli doku ve bu dokuya komşu sağlam dokulardan patolojik inceleme için alınan örneklerden kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 düzeyleri immünohistokimyasal boyama yöntemleriyle belirlendi. Kanserli doku kesitinde immünohistokimyasal boyama ile floresans mikroskopta görüntülenen apoptotik hücreler Şekil 2.3'de ve yaşayabilir hücreler Şekil 2.4'de gösterilmiştir.

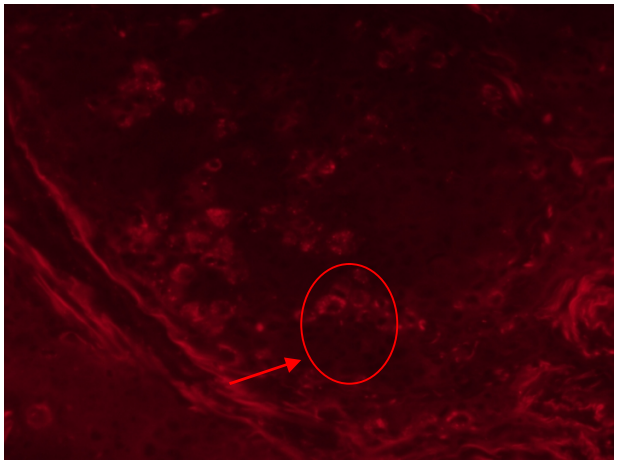


Şekil 2.3. Kanserli doku kesitinde immünohistokimyasal boyama yöntemiyle görüntülenen apoptotik hücreler

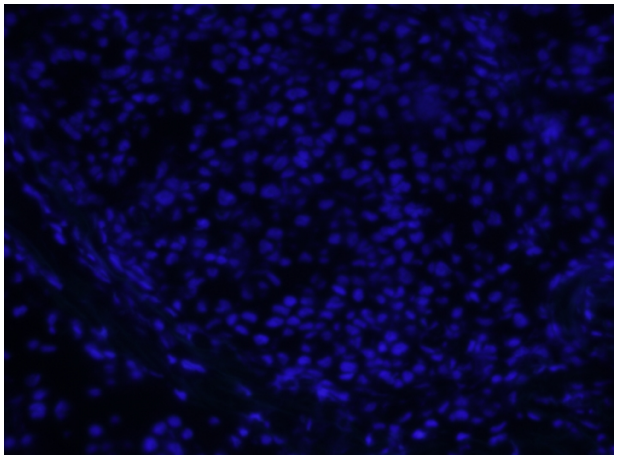


Şekil 2.4. Kanserli doku kesitinde immünohistokimyasal boyama yöntemiyle görüntülenen yaşayabilir hücreler

Aynı şekilde, kanserli dokuya komşu sağlam doku kesitinde floresans mikroskopta görüntülenen apoptotik hücreler Şekil 2.5'de ve yaşayabilir hücreler Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Kanserli dokuya komşu sağlam doku kesitinde immünohistokimyasal boyama yöntemiyle görüntülenen apoptotik hücreler



Şekil 2.6. Kanserli dokuya komşu sağlam doku kesitinde immünohistokimyasal boyama yöntemiyle görüntülenen yaşayabilir hücreler

Gruplardaki kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 için hesaplan apoptotik indeksler Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Doku örneklerindeki kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 için apoptotik indeksler

	Normal grup (N=14)			**Tümör grubu (N=14)**		
	Kaspaz 3	**Kaspaz 9**	**Kaspaz 9**	**Kaspaz 3**	**Caspaz 8**	**Kaspaz 9**
Apoptotik indeks*	1,05[a]	0,40[b]	0,45[c]	0,08[a]	0,02[b]	0,04[c]

[a,b,c] Aynı satırdaki aynı harfler akciğer kanseri tümör dokusu ile komşu sağlam doku arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p<0.01$).

Normal gruba ait kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 için apoptotik indeksler sırasıyla 1,05; 0,40 ve 0,45 olarak bulundu. Tümör grubuna ait kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 değerleri için apoptotik indeksler ise sırasıyla 0,08; 0,02 ve 0,04 olarak belirlendi.

Akciğer kanseri grubunda M30 ve NGAL verileri arasındaki korelasyon tablosu Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. M30 ve NGAL verileri için Spearman's korelasyon tablosu

M30	Correlation Coefficient	1,000	0,58
	Sig. (2-tailed)	.	0,00
	N	40	40
NGAL	Correlation Coefficient	0,58	1,000
	Sig. (2-tailed)	0,00	.
	N	40	40

NGAL ve M30 verileri arasında Spearman korelasyon testi değerlendirilmesinde orta düzeyde pozitif korelasyon belirlendi ($r(40)=0,58$, $p<0,01$).

4. TARTIŞMA

Kanser; DNA molekülünde oluşan bir seri somatik değişimler sonucunda meydana gelen düzensiz hücre proliferasyonu olarak tanımlanabilmektedir. Çoğunlukla kanser tek bir hücreden köken alır; fakat normal bir hücrenin malign fenotip özelliği kazanması, mutasyonların artışı ile olur. Kanser oluşumu temelde karsinojenlere maruz kalım veya DNA onarım mekanizmalarındaki hatalar sonucu oluşan rastgele replikasyon hatalarıyla meydana gelebilmektedir.

Karsinojen olarak; sanayileşmenin bir sonucu olarak meydana gelen çevre kirliliği, tarımda kullanılan çeşitli kimyasallar, gıdaların hazırlanmasında kullanılan katkı maddeleri, sigara ve alkol, tipik kromozom kırık ve translokasyonlarına neden olan iyonize radyasyon, bazı virüsler ve kötü beslenme alışkanlığı olarak belirtilmektedir.

Akciğer kanseri, kanserli ölümlerde erkeklerde birinci kadınlarda ise ikinci sırada yer almaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, ölümlerin %18'inden akciğer kanserinin sorumlu olduğu belirtilmektedir. Her yıl tanımlanan kanser tanılarının %13'ünde yine akciğer kanseri söz konusudur (Jemal 2011).

Akciğer kanseri, doğal seyri nedeni ile ileri – metastatik halde yada lokal ileri evre –toraks içi yaygın vaziyette tanı almaktadır. Bu nedenle tanı sırasında hastaların %70'inde cerrahi yöntemlerle tedavi şansı bulunmamaktadır. Akciğer kanserinin tanıdan itibaren beş yıllık mortalitesi %85-90 arasındadır (Youlden ve ark 2008). Akciğer kanseri hastalarının yaklaşık 80%'i hastalığın tanısı sırasında çalışamaz duruma geldiği ifade edilmektedir. Ayrıca normal kemoterapinin tümörün ilerleyişini önleyemediği de belirtilmektedir (Herbst ve ark 2008).

Hastalığın tanısında önemli belirleyici olarak; onkofetal antijenler (CEA: karsino embriyonik antijen), büyüme hormonları (GH), enzimlerden alkalen fosfotaz, kreatin kinaz BB izoenzimi (CK-BB), nörofizin ve sitokeratin 19 fragmanı (CYFRA 21-1) kullanılmaktadır (Baysal ve Criss, 2004). Fakat bu belirteçlerin çoğu kanserin varlığını tespitte, düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduklarından hastalığın erken evrede tanınması veya hastalığın izlemi açısından yetersiz kalmaktadırlar (Sheng ve ark 2009).

Bu nedenle, akciğer kanserinin erken tanı ve tedavisini kolaylaştırmak için geliştirilmiş ve geliştirilecek moleküler tekniklere, prognoz değerlendirilmesine ve alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Hücre döngüsü olayları doğal bir denge halinde sürer gider. Doku homeostazı, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patojenezinde rol aldığı gösterilmiştir. Eksik veya aşırı apoptotik hücre ölümü; çeşitli karsinom, otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi hastalıkların patojenezinde rol almaktadır (Baykal ve ark 1998).

Çok sayıdaki araştırmada, karsinojenezde apoptotik yollardaki anomalilerin önemli rol üstlendiği belirtilmektedir. Bu nedenle apoptotik yollar, yeni tedaviler için öncelikli hedef haline gelmiştir (Du 2000).

Çalışmamızda, dolaşımda apoptozis belirteci olan serum M30 düzeyleri; Normal gruba göre akciğer kanseri grubunda daha fazla bulunmuştur. Bu artış istatistiki açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($p<0.01$).

Diğer organ ve doku kanserleriyle ilgili olarak literatürde yapılan çalışmalarda da, normal gruba göre kanser gruplarında serum M30 düzeylerinde anlamlı artışlar belirlenmiştir. Öztürk ve arkadaşları (2009), lokal baş-boyun kanserli hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada, kontrol grubuna kıyasla lokal baş-boyun kanserli hasta grubunda, serum M30 düzeylerinin yükseldiğini saptamışlar ve bunun sonucunda M30'un lokal baş-boyun kanseri için prognostik anlam taşıdığı sonucuna ulaşmışlardır (Özturk ve ark 2009).

Bir başka çalışmada, meme kanseri hastalarının serum M30 düzeylerinin sağlıklı bireylerden yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada, klinik olarak durumu daha ciddi olan hastaların M30 antijen düzeylerinin diğer hastalara kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Ueno ve ark 2003).

Kramer ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları çalışmalarda ise karaciğer ve akciğer kanser hastalarında serum M30 düzeylerinin sağlıklı bireylerden yüksek olduğu tespit edilmiştir (Kramer ve ark 2004).

Apoptozisi indükleyen birçok faktörün yanında kanser tedavisi sırasında verilen ilaçlarında önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücresel lezyonların ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücresel intihar programının apoptoza neden olduğu bilinmektedir (Kaufmann ve Vaux 2003).

Histolojik olarak, tümör dokusunda apoptotik indeks; apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere yüzdesel oran ile bulunmaktadır ve bu indeks, apoptozisin şiddetini ya da oranını belirtmektedir. Bu, tümörün tipini ve evresini belirlemede, tedaviye vereceği yanıtı önceden tahmin etmede ve prognozu saptamada yardımcı olabilmektedir.

Bu amaç için; akciğer kanseri hastalarında, kanserli doku ve bu dokuya komşu sağlam dokulardan alınan örneklerin kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 antijen düzeyleri immünohistokimyasal boyama yöntemle belirlenerek doku örneklerinin apoptotik indeksleri hesaplandı. Akciğer kanseri tümör dokusu apoptotik indekslerin, komşu sağlam dokulardakine göre istatistiksel fark oluşturacak şekilde daha düşük olduğu belirlendi ($p<0.01$).

Kanserli dokudaki apoptotik indeksin daha düşük olması, kanser hücrelerinin proliferasyonunda ki artışı ve apoptozdaki azalmayı ifade etmesi bakımından önemlidir. Kanserli dokuda, hücre ölümü inhibe olduğundan hasarlı hücreler birikmekte ve dokuda hasara neden olmaktadır. Kanserli dokularda apoptotik indeksin düşük olması, kanserli dokularda baskın hücre ölüm tipinin apoptozla sınırlı olmadığını da belirtmektedir. Bu yönüyle, bu çalışma, hastalara verilen kemoterapotik ajanların bir süre sonraki etkisinin hipoksi etkisi ile birleşerek apoptotik etkiyi nekroza dönüştürebileceğini öngören çalışmaları desteklemektedir.

Bir hücrenin nekrozis ya da apoptozis tarafından ölüp ölmemesi, hücre öldürücü sinyale, doku tipine, dokuların gelişim aşamasına ve fizyolojik çevreye de kısmen bağlıdır (Zeiss 2003). Karsinojenezis süresince apoptozisin baskılanması, bazı kanserlerin ilerlemesinde merkezi bir rol oynadığı literatürde de tartışılmıştır (Kerr ve ark 1994). Tümör hücrelerinin apoptozisi baskılamak için kullandıkları çeşitli moleküler mekanizmalar vardır. Tümör hücreleri, bcl-2 gibi antiapoptotik

proteinlerin ekspresyonu, Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin mutasyonu ya da down regülasyonu ile apoptozise karşı direnç kazanabilmektedir (Miyashita ve ark 1994).

Dokularda kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 antijenler için belirlenen apoptotik indekslerle, akciğer kanserinde apoptozisin hem reseptör aracılı (ekstrensenk) ve hem de mitokondri aracılı (intrensenk) olarak indüklendiği yorumlanabilir.

Seruma salınan sitokeratinler hücre ölümünün sonuçlanmasından sonraki evreyi yansıtmaktadır. Kanserli hastalarda M30 değerinin yüksek olması, kanserin diğer dokulara yayılmasının apoptozisle engellenme çabası olarak da değerlendirilebilir.

Biyokimyasal reaksiyonların aktivasyonu veya inhibisyonunu kapsayan biyolojik süreçlerde, NGAL gibi biyoorganik moleküllerin de rol oynadığı bilinmektedir. NGAL hücrelerin stres altında olduğu infeksiyon, inflamasyon, iskemi, böbrek hasarı, kardiyovasküler hastalıklar, yanık, zehirlenme, intoksikasyon ve neoplastik transformasyon gibi çeşitli patofizyolojik şartlarda indüklendiğinden önemli bir apoptotik ve anti-enflamatuar role sahiptir (Bolignano 2010). Bu yüzden literatürde kan, doku ve idrar örneklerinde NGAL düzeyinin belirlenip diğer türlerle ilişkilerini ortaya koymaya çalışan birçok çalışma yapılmıştır ve halen yeni çalışmalar yapılmaktadır.

NGAL sentezi neoplazi olaylarında da indüklendiğinden, bu proteinin düzeyinden; karsinojenez ve tümörlerin ilerleme safhalarını belirlemek amacıyla da faydalanılır. Bazı kanser tiplerinde NGAL düzeyinin artması, invazyon ve metastazı kolaylaştırmakta ve prognoz değerlendirmesi hakkında bilgi vermektedir (Silva ve Nizet 2009).

Çalışmamızda serum NGAL düzeyleri; akciğer kanseri grubunda, normal gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Normal gruba göre akciğer kanseri grubundaki bu artış istatistiki açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($p<0.01$).

Literatürde yapılan bazı çalışmalarda, normal gruba göre kanser gruplarında, serum NGAL düzeylerinde anlamlı artışlar belirlenmiştir. Ovarian kanser hücrelerinde yapılan araştırmada, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında benign tümorlü ve grade 1 tümörlü kanser hastalarında serum NGAL konsantrasyonunda 2

ve 2,6 kat artış belirlenmiştir. NGAL ekspresyonu epidermal büyüme faktörü tarafından tetiklenen over tümörü hücre hatlarında mezenkimal epitelyal transizyon geçişini aşağı yönlü düzenlemiştir. NGAL ekspresyonunun downregülasyonu; hücre içi organellerin stabilazyonu için gerekli esansiyel bir protein olan ve mezodermal sarkomlarda immünohistokimyasal tümör belirteci olarak da tanımlanan vimentin ekspresyonu ile korelasyon gösterdiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada, epitel dokuda hücreler arası bağlantıların kurulmasında önemli rol oynayan Ca bağımlı moleküllerden olan E-cadherin ekspresyonun downregülasyonu ile NGAL ekspresyonunun downregülasyonu arasında korelasyon olduğuda ayrıca belirtilmiştir. Bu bilgiler NGAL'in benign, premalign ve malign over tümorlerinin ayrımında önemli bir parametre olacağı göstermektedir (Lim ve ark 2007).

Pankreatik intraepitelial neoplazinin belirteçi olarak NGAL'in pankreatik kanserde erken teşhis için kullanılabilirliğini ortaya koymak için yapılan bir çalışmada, NGAL' in pankreatik kanser hücrelerinde normal duktal hücrelere göre 27 kat daha fazla upregüle olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca adenokarsinomada normal pankreas ya da pankreatitlere göre anlamlı olarak yükseldiği belirlenmiştir. NGAL ekspresyonu PanIN–1 aşamasına kadar erken tespit edildiğinde, pankreastaki en erken premalign değişimlerin belirteci olarak kullanılabileği önerilmiştir (Moniaux ve ark 2008).

İnsanlarda NGAL; PDK1 inhibitörleri tarafından indüklenmiş apoptozdan A459 ve MCF7 hücrelerini korur (Iannetti ve ark 2008). Aynı şekilde, NGAL, kemoterapik pemetrexed'in A549 hücrelerdine, hücre öldürücü etkisini azalttığı ortaya konulmuştur (Wu ve ark 2010). Ayrıca, NGAL; BCR-ABL onkojen hibrit geninin indüklediği tümörjenesiz ve meme kanseri ilerlemesi için gerekli olduğu, özellikle NGAL'in MMP-9 ile oluşturduğu kompleksin kanser hücrelerinin yayılmasını sağladığı belirtilmiştir (Leng ve ark 2009). Prostat kanserinde UPR/NF-kB yoluyla ER stres öncülleri NGAL'i upregüle ettiği tartışılmıştır (Mahadevan ve ark 2011).

Tong ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmada ise NGAL'in pankreas kanserindeki anjiyojenezi ve invazyonu baskılamadığı ifade edilmiştir (Tong ve ark 2008).

İnsan endometrial karsinoma hücrelerinde NGAL'ın biyolojik aktivitesini karekterize eden bir çalışmada NGAL ile indüklenmiş hücre apoptozisinde, endometrial kanser hücrelerinde azalma belirlenirken interleukin–8 (IL-8) mRNA ve protein düzeylerinde artma tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda, NGAL'in kadın üreme sistemi ya da endometrial kanser için önemli rol oynadığı önerilmiştir (Lin ve ark 2011). Aynı şekilde NGAL overekspresyonu servikal kanser invazyonunu inhibe ettiği ortaya konulmuştur (Wang ve ark 2011). İnsan tiroid karsinoma hücre hattında NGAL'in, anti-apoptotik rolü tespit edilmiştir (Iannetti 2008). Miyeloid hücrelerinde de NGAL'in apoptosisi indüklemediği belirtilmiştir (Klausen ve ark 2005).

Yapılan bu çalışmalarda, NGAL'in kanser invazyon açısından, apoptozda ve hücre sağ kalımında farklı roller oynadığı görülmektedir. Hatta, aynı hücre hatlarında da olsa NGAL'ın farklı fonksiyonları söz konusu olduğu tartışılmaktadır (Kehrer 2010). Kanser hücre hatları NGAL'la indüklenen yollara yanıt vermeyen mutasyonları da barındırabileceği öne sürülmüştür (Gupta ve ark 2003).

Böylece NGAL uygulanan tedavi yöntemlerinde, hücre dizilerinde çoğalma ve hayatta kalım tercihlerinde net bir sonucun alınamayacağı beklenmektedir (Kehrer 2010).

Hücreler hasar ve stresle karşılaştığında, hücre akibetinde çok sayıda faktör rol alır ve kompleks mekanizmalar tarafından apoptozis aktive edilir. NGAL aracılı hücre göçü ve invazyonun mekanizmasını araştırmak için, bazı tümör metastaz ilişkili proteinlerin ve sinyal yollarının ortaya koyulması önemli bir durum arz etmektedir (Chen ve ark 2011).

Akciğer kanseri grubu hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek çıkan NGAL ve M30 düzeyleri arasındaki orta düzeyde pozitif korelasyon belirlenmişti. Bu verilerle, NGAL'ın akciğer kanserinde apoptosisi indükleyebileceği sonucunu öngörmekteyiz.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Akciğer kanserinin erken tanı ve tedavisini kolaylaştırmak için geliştirilmiş ve geliştirilecek moleküler tekniklere, alternatif tedavi yöntemlerine ve prognoz değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Klinik kullanımda, erken tanı koyabilecek, komplikasyonları ve prognozu ön görebilecek ve tedaviyi yönlendirebilecek şekilde hastaları risk kategorilerine ayıran belirteçlere her zaman ihtiyaç vardır. Akciğer kanseri için organ-spesifik ya da ideal bir tümör belirteci yoktur. Tek bir ideal belirleyici bulunmaması nedeniyle mevcut belirleyicilerle birlikte, NGAL, M30 ve Kaspaz antijen düzeylerinin kombinasyonlarından da faydalanılabilir.

Dolaşımda apoptozis belirteci olan serum M30 düzeyleri; akciğer kanseri grubunda ve normal grupta sırasıyla 144,08±45,92 ve 118,76± 46,16 U/L olarak bulunmuştur. Normal gruba göre akciğer kanseri grubundaki bu artış istatistiki açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($p<0,01$).

Akciğer kanseri hastalarında, kanserli doku ve bu dokuya komşu normal dokulardan alınan örneklerin kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 antijen düzeyleri immünohistokimyasal boyama yöntemiyle belirlenerek apoptotik indeksler hesaplanmıştır. Normal gruba ait kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 için apoptotik indeksler sırasıyla 1,05; 0,40 ve 0,45 olarak bulundu. Tümör grubuna ait kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 değerleri için apoptotik indeksler ise sırasıyla 0,08; 0,02 ve 0,04 olarak belirlendi. Akciğer kanseri tümör dokusu apoptotik indekslerin, komşu sağlam dokulardakine göre istatistiksel fark oluşturacak şekilde daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$).

Çalışmamızda serum NGAL düzeyleri; akciğer kanseri grubunda ve normal grupta sırasıyla 424,03±74,49 ve 374,04± 90,334 ng/L olarak bulunmuştur. Normal gruba göre akciğer kanseri grubundaki bu artış istatistiki açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($p<0,01$).

NGAL ve M30 verileri arasında Spearman korelasyon testi değerlendirilmesinde orta düzeyde pozitif korelasyon belirlenmiştir ($r=0,58$, $p<0,01$).

NGAL düzeyinin çeşitli faktörlere bağlı olarak oluşan akciğer kanserlerinde, farklı mekanizmalarla devre dışı kalan apoptozis nedeniyle kanser hücrelerinin daha uzun süre yaşamasına yol açan süreçle ilişkili olabileceği öngörülmektedir.

Çalışmamızda elde ettigimiz sonuçlar, akciğer kanser dokusundaki apoptozun hücre ölüm tipini göstermesine rağmen, baskın hücre ölüm tipinin gösterilmesi açısından total hücre ölümünün de izlenmesi gerekmektedir. Hücresel ATP üretiminin yetersiz olduğu durumlarda hücrelerin apoptoz yerine nekroza gittigi kanıtlanmıştır (Eguchi ve ark 1997).

Apoptozise direnç ve apoptozis mekanizmasının anlaşılmasındaki gelişmeler yeni antikanser ajanların geliştirilmesine katkılar sağlayacaktır. Apoptozis, spesifik morfolojik ve biyokimyasal özellikler ile karakterize edilen, birçok moleküllerin rol aldığı enerji bağımlı bir süreçtir. Apoptozis mekanizmasında rol alan ve şu ana kadar tanımlanan biyomoleküllerin yanında bu süreçte önemli fonksiyonları olabilecek ilave moleküllerinde tanımlaması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Mitokondriler apoptotik mekanizmada önemli yer tutmaktadır ve regülatuar moleküllerin araya girmesi için etkin bir pozisyon teşkil etmektedir. Bcl-2 ailesi apoptotik süreci hem arttırıp, hem de engellemek açısından önemlidir. İlerleyen çalışmalarda akciğer kanserinde; bcl–2 ve bax protein ekspresyonunun saptanması ve Fas ligandlarının aktivitelerinin de değelendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca MMP-9, NGAL, ve MMP- 9/NGAL kompleksinin düzeylerininde bakılması önerilmektedir.

6. ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Akciğer Kanserlerinde NGAL Ekspresyonu ve Apoptozisle İlişkisi

"Harun Çiftçi"

Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2014

Bu çalışmada, akciğer kanserlerinde NGAL (nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin= onkojen 24p3 = uterokalin = lipokalin2) expresyonu ve apoptozis ilşkisinin araştırılması amaçlanmıştır. NGAL sentezi neoplazilerde indüklendiğinden, bu proteinin düzeyinden; kanserojenez ve insan tümorlerinin ilerleme safhalarını belirlemek amacıyla faydalanılır.

Çalışmaya Selçuk Üniversitesi, Selçuk Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Kliniği'ne akciğer kanseri tanısı ile kabul edilen ve cerrahi operasyon geçiren 40-70 yaşları arasındaki hastalar dahil edilmiştir. Akut inme, romatolojik hastalıklar, kronik böbrek hastalığı, konjestif kalp yetmezliği, kronik enfeksiyon ve akciğer kanseri dışında diğer organ ve sistem kanserlerine sahip hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

ELISA yöntemiyle hastaların serum NGAL ve serum M30 düzeylerinin değerlendirildiği aşamada, Akciğer kanseri (N=40) ve Normal grup (N=40) olmak üzere 2 grup oluşturulmuştur. Yapılan analizlerde, serum NGAL düzeyleri; akciğer kanseri grubunda ve normal grupta sırasıyla 424,03±74,49 ve 374,04± 90,34 ng/L olarak bulunmuştur. Normal gruba göre akciğer kanseri grubundaki bu artış istatistiki açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($p<0.01$). Dolaşımdaki apoptozis belirteci olan M30 düzeyleri ise; akciğer kanseri grubunda ve normal grupta sırasıyla 144,08±45,92 ve 118,76± 46,16 U/L olarak bulunmuştur. Normal gruba göre akciğer kanseri grubundaki bu artış istatistiki açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($p<0.01$).

Kanserli ve kanserli dokuya komşu normal doku örneklerindeki kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 antijen düzeyleri de immünohistokimyasal boyama yöntemleriyle belirlenerek apoptotik indeksler hesaplanmıştır. Kanserli dokularda apoptotik indeks,normal dokulardakine göre istatistiksel fark oluşacak şekilde ($p<0,01$) daha az belirlenmiştir. Bu durum, akciğer kanserinde baskın hücre ölüm tipinin apoptoz dışındaki diğer hücre ölüm yollarıyla olduğunu göstermektedir. Ayrıca kanserli dokularda kanser hücrelerinin apoptozisi engellediği görüşü bu sonuçlarla desteklenmektedir.

Sonuç olarak, çeşitli faktörlere bağlı olarak oluşan akciğer kanserlerinde NGAL düzeylerinin, kanser hücrelerinde farklı mekanizmalarla devre dışı kalan ve kanser hücrelerinin daha uzun süre yaşamasına yol açan apoptotik süreçle ilişkili olduğu öngörülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Akciğer kanseri, NGAL, Apoptozis, M30, Kaspaz

7. SUMMARY

The Expression of NGAL in Lung Cancers and Its Relation with Apoptosis

In this study, it was aimed that to investigate expression of NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin = oncogenic 24p3 =uterokal = lipokalin2) in lung cancers and its relation with apoptosis. The NGAL synthesis induce in neoplasms, therefore, it is benefited from the level of this protein for determination of carcinogenesis and the progress stages of human tumors.

For this study, patients between the ages of 40-70 accepted by thoracic Surgery Clinic (Selçuk University, Faculty of Medicine) with the diagnosis of lung cancer and they would be surgery operation were involved. Patients having acute stroke, rheumatic diseases, chronic kidney disease, congestive heart failure, chronic infection, other organ and system cancer (except lung cancer) were excluded from the study.

Two group including lung cancer (N = 40) and normal group (N = 40) were formed to determine levels of NGAL and M30 in patient serums by using ELISA method. According to the analysis results, serum NGAL levels for the lung cancer group and the normal group were found as 424,03±74,49 and 374,04± 90,34 ng/L, respectively. This increase in lung cancer group was found statistically significant according to normal group ($p<0,01$). M30 levels which is apoptosis marker in curcilation for the lung cancer group and the normal group were obtained as 144,08±45,92 and 118,76± 46,16 U/L, respectively. This increase in lung cancer group was found statistically significant according to normal group ($p<0,01$).

In samples of cancerous tissues and normal tissues adjacent to the cancerous tissue, caspase 3, caspase 8 and caspase 9 antigen levels were determined by immunohistochemical staining methods, and apoptotic indexes were calculated. It was obtained that apoptotic indexes in cancerous tissues were lower than normal tissues. This decrease was found significantly ($p<0,01$). This result show that the predominant type of cell death in lung cancer was other cell death pathways except apoptosis pathway. In adition, these results support to the opinion which is apoptosis in cancerous tissues may be inhibited by cancer cells.

Consequently, we are expected that NGAL levels in lung cancers which has depend on various factors are associate for apoptosis which is called programmed cell death, remaining disabled through different mechanisms in cancer cells and leading to longer life of cancer cells.

Keywords: Lung cancer, NGAL, Apoptosis, M30, Caspase

8. KAYNAKLAR

1. Aggarwal BB. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB.Ann Rheum Dis. 2000 ;59:6-16.
2. Akgül C, Manipulation of the Bcl-2 Family Proteins As Potential Therapeutic Targets in Multiple Types of Cancer. Turk J Bioch. 2009;34(11): 41-42.
3. Aksit H, Bildik A. Apoptozis. Y.Y.Ü Vet Fak Derg. 2008; 19:55-63
4. Alberts B, Bray D, Lewıs J, Raff M, Roberts K, and Watson J. Molecular biology of the cell, Garland Science. 2002;81(53)-3218-3221.
5. Altekin E, Kenesan Y. Potansiyel Tanısal Bir Biyobelirteç Olarak Nötrofil Jelatinaz Ülişkili Lipokalin, Türk Klinik Biyokimya Derg. 2013; 11(1): 37-41.
6. AltunkaynakB.Z., Özbek E., Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?, Tıp Araştırmaları Dergisi: 2008;6 (2):93 -104.
7. Amberger A, Schneeberger S, Hernegger G, Brandacher G, Obrist P, Lackner P, Margreiter R, Mark W. Gene expression profiling of prolonged cold ischemia and reperfusion in murine heart transplants. Transplantation. 2002;74 :1441–1449.
8. Andre E, Stoeger T, Takenaka S, Bahnweg M, Ritter B, Karg E, Lentner B, Reinhard C, Schulz H, Wjst M. Inhalation of ultrafine carbon particles triggers biphasic proinflammatoryAnton RC, Brown RW, Younes M, et.al. Absence of prognostic significance of bcl-2 immunopositivity in non-small cell lung cancer: analysis of 427 cases. Human Pathol. 1997;28:1079-82.
9. Anwaar I, Gottsater A, Hedblad B, Palmqvist B, Mattiasson I, Lindgarde F. Endothelial derived vasoactive factors and leukocyte derived inflammatory mediators in subjects with asymptomatic atherosclerosis. Angiology. 1998;49;957–966.
10. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *What Is Asbestos?* Retrieved April 10, 2009,
11. Ballian N. Hu M, Liu S.H, Brunicardi F.C. Proliferation, hyperplasia, neogenesis, and neoplasia in the islets of Langerhans. Pancreas. 2007;35(3): 199-206.
12. Bao G, Clifton M, Hoette T.M, Mori K, Deng S.X, Qiu A, Viltard M, Williams D, Paragas N, Leete T, Kulkarni R, Li X, Lee B, Kalandadze A, Ratner A.J, Pizarro J.C, Schmidt-Ott K.M, Landry D.W, Raymond K.N, Strong R.K, Barasch J. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. Nat. Chem. Biol. 2010;6 :602–609.
13. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. Clin Biochem. 2004; 37:529-540.
14. Batu J. Kolorektal Kanser Hastalarının Kemoterapiye Yanıtının İzleminde Serum Sitokeratin 18'in Öneminin Araştırılması, Dokuz Eylül Üniversitesi. Uzmanlık Tezi. İzmir. 2008.
15. Baykal Y, Özet G, Kocabalkan F. Apoptozis ve immün Sistem. T Klin J Med Sci. 1998;18:11-14.
16. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. Chest. 2003;123:97-104.
17. Briasoulis E, Pavlidis N, Cancer of Unknown Primary Origin. Oncologist 1997; 2 (3): 142–152.
18. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, et al. Neutrophilgelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage (review). Am J.Kidney Dis. 2008;52(3): 595-605.
19. Brimmell M, Mendiola R, Mangion J, Packham G. BAX frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability. Oncogene. 1998;16:1803–1812.
20. Budd RC. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. J Clin Invest. 2002;109:437-42.
21. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins, Journal of Cellular and Molecular Medicine 2003;7:249-257.
22. Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, Irimie A. Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. Acta Oncologica 2009;48:811-821.
23. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra S.K. The multifaceted roles of neutrophil gelatinaseassociated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer Biochimica et Biophysica Acta.2012 ;1826 :129–169.
24. Chen Li, Yvonne R. Chan, Lipocalin 2 regulation and its complex role in inflammation and cancer, Cytokine 2011;56:435–441.

25. Cohen G, Rudnicki M, Walter F, Niwa T, Hörl WH. Glucose-modified proteins modulate essential functions and apoptosis of polymorphonuclear leukocytes. J. Am. Soc. Nephrol. 2001; 12:1264-1271.
26. Chow, J.P.H. and Poon, R.Y.C. Mitotic catastrophe. *Cell Cycle Deregulation in Cancer* p.79-96. Ed. Greg Enders. Springer, New York, 2010.
27. Cowland J.B, Sorensen O.E, Sehested M, Borregaard N. Neutrophil gelatinaseassociatedlipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. J.Immunol. 2003;171 :6630–6639.
28. Cunzhi H, Jiexian J, Xianwen Z, Jingang G, Shumin Z, Du L. Serum and tissue levels of six trace elements and copper/zinc ratio in patients with cervical cancer and uterine myoma. Biol. Trace Elem. Res.2003;94:113-122.
29. D'Anna R, Baviera G, Corrado F, Giordano D, Recupero S, Di B.A. First trimester serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin in gestational diabetes. Diabet. Med. 2009;26:1293–1295.
30. Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, Rustemeyer P, Wittkowski W, Lang D, Pavenstädt H. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. Am J Physiol Renal Physiol. 2008; 294:1381-1387.
31. Du C.Y, Fang M, Li Y.C, Li L, Wang X.D. Smac, A mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell. 2000;102:33–42.
32. Ece T. Akciğer kanserine genel bakış. İç:Aydıner A, Can G editörler,Akciğer Kanserinde Tedavi ve Bakım. İstanbul,İpomet Matbaacılık; 2010. s.1-6.
33. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP Levels Determine Cell Death Fate By Apoptosis Or Necrosis. Cancer Res. 1997;57:1835-40.
34. Elmore S., Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol. Pathol. 2007;35:495-516 .
35. Erbil, M.K. Turk J Bioch. 2009; 34 (11): 34-35.
36. Eröz R, Karataş A, Alkoç A. O, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S, Apoptozis Hakkında Bilinenler, Duzce Medıcal Journal, 2012; 14(2): 87-101.
37. Evan G, Littlewood T.A. Matter of life and cell death. Science. 1998;281: 1317-1321.
38. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature. 2001;411:342–348.
39. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? Biochem Biophys Res Commun. 1999;266:699–717.
40. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzim Aactivated DNase during CTL- mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. Cell. 2003;112:659–72.
41. Fanidi A, Harrington EA, Evan GI. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogene. Nature. 1992;359:554-556.
42. Fjaertoft G, Foucard T, Xu S, Venge P. Human neutrophil lipocalin (HNL) as a diagnostictool in children with acute infections. A study of the kinetics. Acta Paediatr. 2005; 94: 661-666.
43. Franks L.M, Teıch N.M.Introduction to cellular and molecula biology of cancer 1. baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 1986.
44. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. Theneutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophoremediatediron acquisition. Mol Cell. 2002 Nov;10(5): 1033-43.
45. Goetz DH, Willie ST, Armen RS, Bratt T, Borregaard N, Strong RK: Ligand preferenceinferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. 2000 Feb 29; 39(8):1935-41.
46. Goksel T, Akkoclu A. Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung cancer in Turkey1994-1998. Respiration. 2002; 69:207-10.
47. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis.J Cell Biol. 1999 ;144:903-914.
48. Gupta R.A, Sarraf P, Mueller E, Brockman J.A, Prusakiewicz J.J, Eng C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated differentiation: a mutation in colon cancer cells reveals divergent and cell type-specific mechanisms. J Biol Chem 2003; 278:22669–22677.
49. Güles Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Y.Y.Ü. Vet Fak Derg. 2008; 2:73-78.
50. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükates E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının kesfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. Türk Kardiyol Dern-Arch Turk Soc Cardiol. 2008; 36:120-130.

51. Hanai J, Mammoto T, Seth P, et al. Lipocalin 2 diminishes invasiveness and metastasis of Ras-transformed cells. J. Biol. Chem. 2005;280:3641-3647.
52. Hanahan D, Weinberg R.A, The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57-70.
53. Harris AL. What does bcl-2 mean in solid tumours-friend or foe? Annals of Oncology. 1994;5:388-90.
54. Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J, et al. Expression of neutrophil gelatinase–associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26:136–142.
55. Herbst R.S, Heymach J.V, Lippman S.M. Molecular origins of cancer: lung cancer. New England Journal of Medicine. 2008;359:1367–1380.
56. Hiçyılmaz Z. Malign tümörlerin yayılması, tümörlerin klinik ve patolojik etkileri.(online),google,(tagem)www.tarim.gov.tr/sanal_kutuphane3/tagem_sa msun_250108/tumor2.doc.(12.05.2007) 2007.
57. Hirayama T. Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. BMJ (Clin Res Ed).1981;282:183-5.
58. Huerta S, Goulet EJ, Yepez S, livingston EH. Screening and detection of apoptosis. journal of surgical research 2007; 139:143-156.
59. Hung Rwy, Chow Aw. Dissecting The 'End Game': Clinical Relevance, Molecular Mechanismm and Laboratory Assesment of Apoptosis. Clin İnvest Med. 2004;27:324-44.
60. http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/cancer-advances-in-focus/cancer
61. Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. Theendocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associatedlipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. FEBS Lett. 2005 Jan 31; 579(3):773-7.
62. Iannetti, A.; Pacifico, F.; Acquaviva, R.; The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF-κB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells, 2008;105(37): 14058–14063.
63. İpek S. respiratuar distres sendromlu prematür bebeklerde akut böbrek hasarının idrar nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin ile değerlendirilmesi, İnönü Üniversitesi, Uzmanlık Tezi, Malatya 2012.
64. İtil O. Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etyolojisi. İç: Haydaroğlu A editör, Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi. İzmir,Ege Universitesi Basımevi, 2000;15-34.
65. Jemal A, Siegel R, Xu J.Q, Ward E. Cancer statistics. CA – A Cancer Journal for Clinicians. 2010;60:277–300.
66. Janssen-Heijnen M.L, Coeberg J.W. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. Lung Cancer 2003; 41: 245-258.
67. Jemal A. Global cancer statistics CA – A Cancer Journal for Clinicians. 2011;61:134.
68. Joaquin AM, Gollapudi S. Functional decline in aging and disease: a role for apoptosis. J Am Geriatr Soc. 2001;49:1234–1240.
69. Kaufmann Sh, Vaux Dl. Alterations In The Apoptotic Machinery And Their Potential Role In Anticancer Drug Resistance. Oncogene. 2003;22:7414-30.
70. Kehrer, J.P., Lipocalin-2: pro- or anti-apoptotic? Cell Biol. Toxicol. 2010;26:83–89.
71. Kern JA, McLennan G. Genetic and molecular changes of human lung cancer. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders. Mc Graw-Hill Companies: New York. 1998;2:1695-9.
72. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994;73:2013– 26.
73. Klausen P, Niemann CU, Cowland JB, Krabbe K, Borregaard N. On mouse and man: neutrophil gelatinase associated lipocalin is not involved in apoptosis or acute response. Eur J Haematol 2005:332–340.
74. Knudson A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinablastoma. Proc Natl Acad Sci. USA.1971;68:820- 3.
75. Kramer G, Erdal H, Mertens Hj, Nap M ve ark. Differentiation Between Cell Death Modes Using Measurements Of Different Soluble Forms Of Extracellular Cytokeratin 18. Cancer Res. 2004;64:1751-6.
76. Kreuzer M, Kreienbrock L, Gerken M, Heinrich J, Bruske-Hohlfield I, Muller KM, Wichmann HE. Risk factors for lung cancer in young adults. Am J Epidemiol. 1998;147:1028-37.
77. Kusaka M, Kuroyanagi Y, Kowa H, Nagaoka K, Mori T, Yamada K, Shiroki R, Kurahashi H, Hoshinaga K. Genomewide expression profiles of rat model renal isografts from brain dead donors. Transplantation. 2007; 83:62–70.
78. Küçükaltun Sabancı S. Kronk Obstrüktf Akcer Hastalıı'nda Hava Yolu Eptel Hücreler, Lenfost, Nötrofl Ve Makrofaj Apoptozis, Çukurova Ünverstesi, Uzmanlık Tezi, Adana-2007.

79. Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar. Anadolu Kardiyol Derg. 2002; 4:323-329.
80. Lamy L , Ticchioni M, et al.T-cell apoptosis CD47 and the BH3-only protein BNIP3 in J. Biol. Chem.2003 ;278:3915-3921.
81. Leng, X., Ding, T., Lin, H., Wang, Y., Hu, L., Hu, J., Feig, B., Zhang, W., Pusztai, L., Symmans, W.F., Wu, Y., Arlinghaus, R.B., Inhibition of lipocalin 2 impairs breast tumorigenesis and metastasis. Cancer Res. 2009;69: 8579–8584.
82. Leers M, Kölgen W, Björklund V et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytoceratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. J. Pathol. 1999;187: 567-72.
83. Lengauer C, Kınzler W.K, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers, nature, 1998;396:643-649.
84. Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. Br J Cancer. 2005;92:212–216.
85. Lieberman J, Fan Z. Nuclear war: the granzim A-bomb. Curr Opin Immunol. 2003;15:553–9.
86. Lim J, Gasson C, Kaji DM. Urea inhibits NaK2Cl cotransport in humanerythrocytes. J Clin Invest. 1995; 96:2126–2132.
87. Lim R, Ahmed N, Borregaard N, Riley C, Wafai R, Thompson EW, Quinn MA, Rice GE. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) an early screening biomarker for ovarian cancer: NGAL is associated with epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition. Int. J. Cancer. 2007; 120(11): 2426-2434.
88. Lin H.H, Liao C.J, Lee Y.C, Hu K.H, Meng H.W, Chu S.T. Lipocalin-2-induced cytokine production enhances endometrial carcinoma cell survival and migration. Int J Biol Sci. 2011;18:74-86.
89. Linder S. Cytokeratin markers come of age. Tumor Biol. 2007; 28:189-195.
90. Lorin S, Codogno P, Djavaheri-Mergny M. [Autophagy: A New Concept In Cancer Research].
91. Ludwig J.A, Weinstein J.N, Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. Nature Reviews Cancer 2005; 5 (11): 845–856.
92. Bull Cancer 2008;95:43-50.
93. Lossi L, Merighi A. In Vivo Cellular And Molecular Mechanisms Of Neuronal Apoptosis In The Mammalian Cns. Prog Neurobiol 2003;69:287-312.
94. Lowe S.W, Lin A.W. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis. 2000;21(3):485-495.
95. Maggino T, Gadducci A. Serum markers as prognostic factors in epithelial ovarian cancer: an overview. Eur. J. Gynaecol Oncol. 2000;21:64-9.
96. Mahadevan, N.R., Rodvold, J., Almanza, G., Perez, A.F., Wheeler, M.C., Zanetti, M., ER stress drives lipocalin 2 upregulation in prostate cancer cells in an NF-kappaBdependent manner. BMC Cancer 2011;11:229-236.
97. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network:report of an initiative to improve outcomes in acutekidney injury. Crit Care. 2007; 11(2): R31-6.
98. Michels J, Johnson PW, Packham G. Mcl-1. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37:267–271.
99. Milli ÜH, Hazıroğlu R, Aydın Y, Gülbahar MY. Köpek meme tümörlerinde sitokeratin, vimentin ve alfa-düz kas aktin intermedier ve mikro filamentlerin immunohistokimyasal lokalizasyonu. Turk J Vet Anim Sci. 2000; 24:81–92.
100. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. Oncogene. 1994;9:1799–805.
101. Moniaux N, Chakraborty S,Yalniz M, Gonzalez J, Shostrom V.K, Standop J, Lele S.M, Ouellette M, Pour P.M, Sasson, A.R, Brand R.E, Hollingsworth M.A, Jain M, Batra S.K. Early diagnosis of pancreatic cancer: neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of pancreatic intraepithelial neoplasia. Br. J. Cancer. 2008;98 (9):1540-1547.
102. Moore VDG Brown, JR Certo M, . Love TM, . Novina CD,and Letai A Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737 J. Clin Invest.2007 117: 112–121.
103. Nomura I, Gao B, Boguniewicz M, Darst M.A, Travers J.B, Leung D.Y. Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. J. Allergy Clin. Immunol. 2003;112:1195–1202.
104. Noris M, Benigni A, Boccardo P, Aiello Q, Gaspari F, Todeschini M, Figliuzzi M, Remuzzi G. Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: Implications for platelet dysfunction and dialysis hypotension. Kidney Int. 1993; 44:445–450.

105. Omenn GS, Merchant J, Boatman E, Dement JM, Kuschner M, Nicholson W, Peto J, Rosenstock L. Contribution of environmental fibers to respiratory cancer. Environ Health Perspect.1986;70:51-56.
106. Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. J Biol Chem. 1999;274:36031–36034.
107. Ozar Kolusayın M. Ö. Kromozom radyo duyarlılığının kanser riskinin belirlenmesinde kullanılabilirliği, İstanbul üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. İstanbul. 2009.
108. Ozturk B, Coskun U, Sancak B, Yaman E, Buyukberber S, Benekli M. Elevated serum levels of M30 and M65 in patients with locally advanced head and neck tumors. Int Immunopharmacol. 2009; 9:645–648.
109. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin Önemi Toraks Dergisi.2001;2:91-95.
110. Paragas N, Qiu A, Zhang Q, et al., The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time, Nat Med, 2011;17(2):216–22.
111. Parikh CR, Devarajan P. New biomarkers of acute kidney injury. Crit Care Med. 2008; 36(4 Suppl): 159-65.
112. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. CA Cancer J Clin. 2005; 55:74-108.
113. Pienta K.J, Partin A.W, Coffey D.S. Cancer as a disease of dna organization and dynamic cell structure. Cancer Research. 1989;49:2525-2532.
114. Prieto A, Díaz D, Barcenilla H, García Suárez J, Reyes E, Monserrat J, San Antonio E, Melero D, Hera A, Orfao A, Álvarez Mon-Soto M, Apoptotic rate: a new indicator for the quantification of the occurrence of apoptosis in cell culture. Cytometry 2002; 48: 185–193.
115. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S, Aime SC, Bodrug S, Kitada S, Hanada M. BCL- 2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. J Cell Biochem. 1996;60:23–32.
116. Sahinarslan A, Kocaman S.A, Bas D, Akyel A, Ercin U, Zengin O, Timurkaynak T. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in acute myocardial infarction and stable coronary artery disease. Coron. Artery Dis. 2011;22: 333–338.
117. Sato T, Irie S, Krajewski S, Reed JC. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl2 protein. Gene 1994;140:291-292.
118. Schmidt-Ott K.M, Mori K, Kalandadze A, Li J.Y, Paragas N, Nicholas T, Devarajan P, Barasch J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 2006;15 :442–449.
119. Schwartz D, Rotter V. p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. Semin Cancer Biol. 1998;8:325–336.
120. Schwartzman RA, Cidlowski J.A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Review. 1993;14:133-150.
121. Sheng S. L., Huang G, Yu B. and Xin Qin W. Clinical Significance and Prognostic Value of Serum Dickkopf-1 Concentrations in Patients with Lung Cancer. Clinical Chemistry. 2009;55(9):1656–1664.
122. Silva Da F, Nizet V. Cell death during sepsis: Ðntegration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. Apoptosis. 2009; 14:509-521.
123. Singan S, Lipocalin-2 (Neutrophil Geletinase-Associated Lipocalin (NGAL)) Düzeyinin Akut Koroner Sendromlu Hastalarda Prognostik Önemi, İstanbul Üniversitesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2012, 45-52.
124. Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, Lowe SW. Apaf-1 and caspase-9 in p53- dependent apoptosis and tumor inhibition. Science. 1999;284:156–159.
125. Soini Y, Paakkö P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. Am J of Pathology 1998; 153: 1043-9.
126. Soung YH, Lee JW, Kim SY, Jang J, Park YG, Park WS, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. Cancer Res. 2005;65:815–821.
127. Spiro SG, Porter JC. Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. Am J Respir Crit Care Med. 2002;166:1166-96.
128. Sporn, M.B. The war on cancer. Lancet. 1996;347:1377-1381.
129. Stepien A, Izdebska M, Grzanka A. [The Types Of Cell Death]. Postepy Hig Med Dosw (Online) 2007;61:420-8.
130. Sutton VR., Davis JE., Cancilla, M, Johnstone RW. Ruefli, AA. Sedelies, K. Initiation of Apoptosis by Granzyme B Requires Direct Cleavage of Bid, but Not Direct Granzyme B–Mediated Caspase Activation J Exp Med. 2000 192:1403–1414.

131. Süleymanlar G. Kronik böbrek hastalığı ve yetmezliği: tanımı, evreleri ve epidemiyolojisi. J Int Med Sci. 2007;338:1-7.
132. Takayama K, Ogata K, Nakanishi Y, et al. Bcl-2 expression as a predictor of chemosensitivities and survival in small cell lung cancer. Cancer J Sci Am. 1996;2:212s.
133. Tanaka F, Kawano Y, Li M, el al. Prognostic significance of apoptotic index in completely resected non-small-cell lung cancer. J. Clin Oncol. 1999;17:2728-36.
134. Tatar D, Kılınc O, Yorgancıoğlu A. Akciğer tümörü ve akciğer tüberkulozu birlikteliği. Solunum. 2000; 2: 56-60.
135. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. Nat Med. 2000;6:529–535.
136. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. Mol Endocrinol. 1994;8:665-673.
137. Tong, Z., Kunnumakkara, A.B., Wang, H., Matsuo, Y., Diagaradjane, P., Harikumar, K.B., Ramachandran, V., Sung, B., Chakraborty, A., Bresalier, R.S., Logsdon, C., Aggarwal, B.B., Krishnan, S., Guha, S., Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel suppressor of invasion and angiogenesis in pancreatic cancer. Cancer Res. 2008;68:6100–6108.
138. Tormanen U, Eerola AK, Rainio P, et al. Enhanced apoptosis predicts shortened survival in non-small cell lung carcinoma. Cancer Res. 1995; 55:595-602.
139. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzim cell death pathway. Nat Rev Immunol. 2002;2:735–47.
140. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Kanser İstatistikleri, ocak 2014, Ankara.
141. Ueno T, Toi M, Biven K, Bando H ve ark. Measurement Of An Apoptotic Product In The Sera Of Breast Cancer Patients. Eur J Cancer 2003;39:769-74.
142. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları . (www20.uludag.edu.tr/-eulukaya) 2003.
143. Vanholder R, De Smet R. Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. J Am Soc Nephrol. 1999; 10:1815–1823.
144. Viau A, El K.K, Laouari D, Burtin M, Nguyen C, Mori K, Pillebout E, Berger T, Mak T.W, Knebelmann B, Friedlander G, Barasch J, Terzi F. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. J. Clin. Invest. 2010;120:4065–4076.
145. Wang, P.H., Ko, J.L., Yang, S.F., Lin, L.Y., Implication of human nonmetastatic clone 23 type 1 and its downstream gene lipocalin 2 in metastasis and patient's survival of cancer of uterine cervix. Int. J. Cancer 2011;129: 2380–2389.
146. WHO (World Health Organization), Cancer control guide– knowledge into action.Geneva: WHO, 2006.
147. Wu, M.F., Hsiao, Y.M., Huang, C.F., Huang, Y.H., Yang,W.J., Chan, H.W., Chang, J.T., Ko, J.L., Genetic determinants of pemetrexed responsiveness and nonresponsiveness in non-small cell lung cancer cells. J. Thorac. Oncol. 2010;5:1143–1151.
148. Yang J, Goetz D, Li JY, et al. An iron delivery pathwaymediated by a lipocalin. Mol Cell.2002; 10: 1045-1056.
149. Yenicesu M. Kronik böbrek yetmezliği. In Arık N, Nefroloji. istanbul: Deniz Matbacılık. 2001:212-224.
150. Youlden D.R, Cramb S.M, Baade P.D. The international epidemiology of lung cancer – geographical distribution and secular trends. Journal of Thoracic Oncology. 2008 ;3:819–831.
151. Yuen PS, Jo SK, Holly MK, Hu X, Star RA. Ischemic and nephrotoxic acute renal failure are distinguished by their broad transcriptomic responses. Physiol Genomics. 2006; 25(3): 375-86.
152. Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2- like oncoproteins. Oncogene. 1998;16:2265–2282.
153. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. Vet Pathol. 2003;40:481–95.

10. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Elazığ'da doğdu. 1996 yılında Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Organik Kimya Anabilim Dalı'nda "HPLC ile Folik asit tayini" konulu Yüksek Lisans tezini 2000 yılında tamamladı. Çevresel, Biyolojik ve Gıda örneklerinin analizi ile ilgili yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesini amaçlayan bir çok çalışma gerçekleştirdi. Biri TÜBİTAK olmak üzere 11 tane projede görev aldı. Evli ve iki çocuk babasıdır. Halen, Ahi Evran Üniversitesinde akademik personel olarak görev yapmaktadır.