

**T.C. ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT
SENTAZ (eNOS) GEN POLİMORFİZMİ VE PLAZMA ASİMETRİK
DİMETİL ARJİNİN (ADMA) KONSANTRASYONUNUN
BELİRLENMESİ**

Dr. Zafer BAYRAKTUTAN

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ

Uzmanlık Tezi

ERZURUM-2011

İÇİNDEKİLER

ONAY	IV
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
KISALTMALAR	VIII
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser.....	4
2.1.1. Kanser Nedir.....	4
2.1.2. Benign ve Malign Tümörlerin Özellikleri.....	5
2.1.3. Kanser Nedenleri.....	7
2.1.4. Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	8
2.1.5. Kanserin Yayılma Yolları.....	10
2.1.5.1. Vücut Boşlukları ve Yüzeyleri Yoluyla Yayılma.....	10
2.1.5.2. Lenf Damarları Yoluyla Yayılma.....	10
2.1.5.3. Kan Damarları Yoluyla Yayılma.....	12
2.1.6. Kanser ve Genetik.....	13
2.1.6.1. Onkogenler.....	13
2.1.6.2. Tümör Baskılayıcı Genler.....	16
2.1.6.3. DNA Tamir Genleri.....	21
2.1.7. Polimorfizm ve Kanser.....	21
2.2. Akciğer Kanseri.....	22
2.2.1. Epidemiyoloji.....	22
2.2.2. Etyoloji.....	26
2.2.2.1. Sigara.....	26
2.2.2.2. Radon.....	27
2.2.2.3. Asbest.....	27
2.2.2.4. Geçirilmiş Akciğer Hastalıkları.....	28
2.2.2.5. Aile Öyküsü.....	28

2.2.2.6. Hava Kirliliği	28
2.2.3. Histopatolojik Sınıflandırma.....	29
2.2.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	31
2.2.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri.....	32
2.2.4. Akciğer Kanserinde Evreleme	33
2.2.5. Akciğer Kanseri Oluşumunda Gen Amplifikasyonunun Rolü ve Sitokrom P-450 Enzim Genleri	35
2.3. Nitrik oksit (NO) ve Fizyolojik Etkileri	36
2.3.1. Nitrik Oksit, Hücre Proliferasyonu ve Kanser.....	39
2.4. Nitrik Oksit Sentaz ve Görevleri	40
2.5. eNOS Geni	41
2.6. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA).....	45
2.6.1. ADMA, Endotel ve Nitrik Oksit.....	47
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	50
3.1. Gereçler.....	50
3.1.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Seçilmesi	50
3.1.2. Numunelerin Toplanması	50
3.1.3. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	51
3.2. Yöntemler	52
3.2.1. Polimorfizm Analizi	53
3.2.1.1. DNA İzolasyonu	53
3.2.1.1.1. DNA Saflık Tayini ve Konsantrasyonunun Hesaplanması	53
3.2.1.2. İn Vitro Amplifikasyon (PCR)	54
3.2.1.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Analizi	55
3.2.1.4. Hibridizasyon.....	55
3.2.1.5. Yıkama İşlemi.....	56
3.2.1.6. Renklendirme İşlemi.....	56
3.2.1.7. Striplerin Değerlendirilmesi	57
3.2.2. NO Ölçümü.....	59
3.2.2.1. NO Ölçümü İçin Gerekli Çözeltiler.....	59
3.2.2.2. Çalışmanın Yapılışı.....	60
3.2.3. ADMA Analizi	61

3.2.4. İstatistiksel Analiz.....	61
4. BULGULAR.....	63
5.TARTIŞMA.....	74
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	82
7. KAYNAKLAR	84

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Kurulu'nun 20.05.2009/- tarih ve bila sayılı toplantısında; "Akciğer Kanserli Hastalarda Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) Gen Polimorfizmi ve Plazma Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA) Konsantrasyonunun Belirlenmesi" başlıklı konunun Dr.Zafer BAYRAKTUTAN'a uzmanlık tezi olarak verilmesine ve tez yönetiminin Prof.Dr. Ahmet KIZILTUNÇ tarafından yürütülmesine karar verildi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 22.05.2009/164 tarih ve sayılı kararı ile ilgili tezin etik kurul onayı alındı ve Temel Tıp Bilimleri Bölümünün 21.05.2009/4 tarih ve sayılı kararı ile tez konusu olarak kabul edilmesine karar verildi.

TEŞEKKÜR

İhtisas tezi olarak sunduğum bu çalışmada ve ihtisas hayatım süresince değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, benden her türlü desteğini, hoşgörüsünü ve karşılaştığım her türlü zorluklarda yardımını esirgemeyen tez hocam Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a, ihtisas eğitimim boyunca her zaman yakın ilgi ve bilimsel desteklerini gördüğüm Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ebubekir BAKAN'a, Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN'e, Prof. Dr. Nuri BAKAN'a, Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a, Prof. Dr. Hülya AKSOY'a, Prof. Dr. Zuhâl UMUDUM'a, Prof. Dr. M. Sait KELEŞ ve Doç. Dr. Abdulkadir YILDIRIM'a,

Tez çalışmamın deney aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Hasan KAYNAR'a ve Ayşe Hemşire'ye

Bölüm teknisyenimiz Ercan DEMİR ile tüm Aziziye ve Yakutiye Biyokimya laboratuvarı çalışanlarına,

İhtisas eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen ve arkadaşlıkları için Arş. Gör. H. Hamit ALP'e, Arş. Gör. Nezahat KURT'a, Arş. Gör. Betül KOÇAK'a, Arş. Gör. Elif POLAT'a, Arş. Gör. Akar KARAKOÇ'a, Arş. Gör. Dr. H. İbrahim YILMAZ'a, Arş. Gör. Dr. Esra LALOĞLU'na, Arş. Gör. Dr. Musa DÜDÜKÇÜ'ye, Arş. Gör. Dr. Alev LAZOĞLU'na, Arş. Gör. M. Ali GÜL'e, Arş. Gör. Elvin ALİYEV'e, Ecz. Nurcan BAYGUTALP'a, Uzm. Dr. Fatih KARA'ya, Uzm. Dr. Muhammet ÇELİK'e ve diğer asistan, doktora ve yüksek lisans arkadaşlarıma,

Bölümümüz sekreteri Keriman ERDEN'e ve tüm Anabilim Dalı çalışanlarımıza,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve bugünlere gelmemde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem ve ablalarım, İhtisas eğitimi sürecinde her türlü anlayışı ve desteği gösteren sevgili eşim Ümmügülsüm BAYRAKTUTAN'a,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

Bir tanem kızım Gökçe Naz'a...

ÖZET

Akciğer kanseri ülkemizde olduğu gibi dünyada da en yaygın ve en yüksek ölüm oranına sahip kanser tipidir. Akciğer kanserine neden olarak en başta sigara içimi gelmektedir. Bunun yanı sıra genetik nedenlerinde akciğer kanseri oluşması ve ilerlemesi üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir.

Nitrik oksit (NO) karsinogeneze birçok açıdan rolü olan bir moleküldür. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA) NOS'un endojen inhibitörüdür. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) NO sentezinde görevli üç izoenzimden endotelyal kökenli olanıdır. Bu gen ile ilgili birçok tek nükleotid polimorfizminden ikisi genin promoter bölgesindeki T-786C ile ekson 7'deki G894T polimorfizmleridir. Bu polimorfizmler ile kanser arasındaki ilişki son zamanlarda bilim adamlarının araştırmalarına kaynak olmuş ve bazı kanserlerle ilişkili olduğu yönünde rapor edilmiştir.

Biz bu çalışmada eNOS gen T-786C ve G894T polimorfizmleri ve plazma ADMA düzeyleri ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi araştırdık. Bu amaçla 100 hasta ile 100 kontrol grubundan alınan kan örneklerinden ters hibridizasyon tekniğine dayalı Polimerize zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile polimorfizm analizi yapıldı. HPLC yöntemiyle plazma ADMA seviyelerine bakıldı. Hasta ve kontrol grubu arasında polimorfizmler açısından önemli bir fark yoktu ($p>0.05$). Plazma ADMA ve NO seviyeleri ise hasta grubunda kontrol grubuna oranla belirgin olarak yüksekti ($p<0.05$). Hasta ve kontrol grubunda polimorfizmler ile plazma ADMA seviyeleri karşılaştırıldığı zaman eNOS T-786C ve G894T polimorfizmleri açısından sırasıyla CC ve TT genotipinde olanlarda plazma ADMA seviyeleri belirgin olarak yüksekti. Ayrıca hasta grubu kendi arasında küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak sınıflandırıldığında KHAK olanlarda CC polimorfizmi daha fazla görüldü. KHAK olanlarda ADMA seviyeleride yüksek olarak bulundu.

Bizim sonuçlarımız akciğer kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında polimorfizmler açısından önemli bir fark olmadığını gösterdi. Bununla birlikte plazma ADMA seviyeleri hasta grubunda kontrol grubuna oranla belirgin yüksekti. Ayrıca bu bulgular yüksek plazma ADMA seviyelerinin ve CC genotipinin küçük hücreli akciğer kanseri ile ilişkisini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Nitrik Oksit, Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz, Polimorfizm

ABSTRACT

Lung cancer is the most common and the highest mortal rate cancer type in our country as well as worldwide. Smoking is the first and most important risk factor for lung cancer. Also, it is known that genetic factors take part in occurring and developing lung cancer.

Nitric oxide (NO) is a signal molecule, which have many roles in carcinogenesis, and ADMA is endogenous inhibitory of NOS. Endothelial NO synthase (eNOS) is the endothelial based and is one of three isoenzymes responsible for the synthesis of NO. Many single nucleotide polymorphisms are defined for eNOS gene. Two of them are T-786C on the promoter region of gene and G894T polymorphism on exon 7 of gene. Recently, the association between these polymorphisms and cancer have been attracting the interest of researcher, and the relationship between them was reported on some cancer types.

In this study, we aimed to investigate plasma ADMA levels and eNOS T-786C and G894T polymorphisms on lung cancer patients. For this aim, blood samples of 100 patients and 100 controls were taken for polymorphism analyses with PCR method based on reversed hybridization technique. Plasma ADMA levels were measured by HPLC technique. There was no significant difference between the polymorphisms of patients and control groups ($p>0.05$). Plasma ADMA levels of patients were significantly higher than those of controls ($p<0.05$). When plasma ADMA levels of the patients and control groups were compared with polymorphisms, plasma ADMA levels were significantly higher in the patients and control groups whit CC polymorphisms and TT polymorphisms on eNOS T-786C and G894T gene regions, respectively. Additionally, when the patients are classified as small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, CC polymorphisms were found higher on small cell lung cancer patients compared with non-small cell lung cancer patients. In small cell lung cancer patients, ADMA levels were found high.

In conclusion, our findings show that there was no significant difference in terms of the polymorphisms between lung cancer patients and control groups. However plasma ADMA levels were significantly higher in patient group than controls. All these findings suggest that high plasma ADMA levels and CC genotypes are associated with small cell lung cancer.

Key Words: Nitric Oxide, Endothelial Nitric Oxide synthase, polymorphism

KISALTMALAR

NO: Nitrik Oksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

GTP: Guanozin trifosfat

GDP: Guanozin difosfat

MAP: Mitojen Aktive edici protein

TGF: Transforme edici büyüme faktörü

CDK: Cyclin dependent kinaz:siklin bağımlı kinaz

FMN: Flavin mononükleotid

FAD: Flavin Adenin dinükleotid

BH₄: Tetrahidrobiyopterin

E2F: Elongasyon faktör 2

Rb: Retinoblastom

KHAK: Küçük hücreli Akciğer kanseri

KHDAK: Küçük hücreli dışı Akciğer kanseri

eNOS: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz

ADMA: Asimetrik Dimetil Arjinin

RNOS: Reaktif Nitrojen Oksit Ürünleri

SNP: Single nucleotide polymorphism:tek nükleotid polimorfizmi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser günümüz dünyasında halen daha hem temel tedavi prensiplerinin yetersiz olması hem de tedavi maliyetleri açısından önemli bir problemdir. Dünya Sağlık Örgütü 2008 yılı verilerine göre 12.7 milyon insan kanser tanısı almış ve bunlarında 7.4 milyonu kanser nedeniyle ölmüştür ki bu dünyada tüm ölümlerin %13'ünü oluşturmaktadır. Türkiye'de ise kanserin neden olduğu ölüm oranı kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırayı almaktadır (1, 2).

Akciğer kanseri ülkemizde olduğu gibi dünyada da en yaygın ve en yüksek ölüm oranına sahip kanser tipidir. Akciğer kanserine neden olarak en başta sigara içimi gelmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde akciğer kanserinden ölen kadınların %75-80'ninin erkeklerin ise %90'nının sigara içtiği tespit edilmiştir. Fakat sigara içenlerin %20'den azında akciğer kanseri olduğu görülmüştür. Bu nedenle sigara içimi her ne kadar akciğer kanseri oluşumuna neden olan en önemli sebep olsa da başka bilinen ve de bilinmeyen birçok nedeninde akciğer kanseri oluşumuna yol açtığı bilinen bir gerçektir. Karsinogen ajanlara maruziyet, asbest, geçirilmiş akciğer hastalıkları ve aile hikayesi bunlardan bazılarıdır (3, 4).

Nitrik oksit (NO); iki atomdan oluşan, ortaklanmamış elektron içeren ve bu yönüyle birçok reaksiyona katılan, serbest bir radikaldir. Nitrojen oksit türevlerinden biri olan NO radikali endojen olarak da sentezlenmektedir (5). NO sentezi bazı hücrelerde bir reseptöre bir stimülatörün bağlanması sonucunda veya nöronlarda sinir uyarısına cevap aşamasında oluşur. NO çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu L-arjinin ve oksijenden, nitrik oksit sentaz enzimi aracılığı ile sentezlenir (6). NO, tümör hücre büyümesine, genotoksik lezyonların indüksiyonuna, anjiogeneze yol

açabilmektedir (7). NO ve NO kaynaklı reaktif nitrojen oksit ürünleri (RNOS), DNA (Deoksiribonükleik asit) hasarında (nükleik asitlerin nitrosatif deaminasyonu, alkilleme ve DNA zincir kırılımı gibi) ve DNA onarım enzimlerinin (DNA ligaz gibi) inhibisyonunda doğrudan veya dolaylı mekanizmalarla sonuçlanan oksidatif ve nitrosatif stresi indüklerler. Nitrasyon, nitrozasyon, fosforilasyon, asetilasyon veya poliADP ribozilasyonu ile kanserle alakalı genlerdeki ya da proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonlarındaki mutasyonların indüklenmesi, kanser riskini arttıran anahtar olaylardan bazılarıdır. Özellikle yüksek düzeydeki NO; DNA'nın doğrudan modifiye edilmesiyle veya karsinojenik nitrosaminlerin oluşumuyla genotoksiktir. NO, NO₂, N₂O₃'ün aerobik solüsyonlarının nükleik asitlerin deaminasyonlarına sebep olduğu bulunmuştur. NO ayrıca hücre döngüsünün kontrol noktalarını, apoptosisi, ve DNA onarımını bozarak karsinojenik sürece etki etmektedir (8-11).

1992 yılında Vallance ve arkadaşları ADMA'yı (Asimetrik Dimetil Arjinin) ilk olarak insan plazma ve idrarında nitrik oksit sentazın endojen inhibitörü olarak tanımlamışlardır (12). ADMA, plazmada doğal olarak bulunan bir aminoasittir. ADMA, arjininin translasyon sonrası modifikasyona uğramış halidir (13).

eNOS genindeki SNP'den (single nükleotid polimorfizmi) ikisi genin promoter bölgesindeki T-786C polimorfizmi ile ekson 7 bölgesindeki G894T polimorfizmidir. Biz bu çalışmamızda yukarıda genişçe açıklanan NO'nun kanser ile olan ilişkisinden yola çıkarak akciğer kanserli hastalarda yukarıda bahsedilen iki SNP'nin etkili olup olmadığını araştırdık. Ayrıca yine akciğer kanserli hastalarda plazma ADMA seviyelerini ölçerek bunun NO ve polimorfizmlerle olan ilişkilerini araştırdık ve tüm bu

bulgulardan yola çıkarak akciğer kanserinin oluşum ve gelişmesinde bunların etkili olup olmadığını inceledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

2.1.1. Kanser Nedir

Tümör; bölünme yeteneği olan bir hücrenin herhangi bir nedenden dolayı normal ve kontrollü bölünme yeteneğini kaybedip anormal ve kontrolsüz çoğalması ile karakterize tablonun genel adıdır. Benign tümör tanımlaması metastaz yapmayan, lokal eksize edilebilen, surveyi etkilemeyen tümördür. Malign tümör tanımlaması ise komşu organlara veya uzak bölgelere yayılarak (metastaz), onları harap eden, hayatta kalma süresini azaltıp, ölüme neden olabilen tümördür (14).

Tümörlerin tümünde tümör parankimi ve tümörün stromal dokusu olmak üzere iki doku komponenti bulunur. Tümör parankimi çoğalan (neoplastik olan) hücrelerden oluşur. Tümör stromal dokusu ise bağ dokusu ve kan damarlarından oluşan (nonneoplastik reaktif) destek dokusudur. Tümörlerin isimlendirilmesinde parankim temel alınır. Kanser kelimesi her ne kadar tüm malign tümörlerin ortak ismi olarak kullanılsada; kanser epitel hücrelerinden gelişen tümörlere, sarkom ise mezenkimal orijinli hücrelerden gelişen tümörlere denir. Epitel hücreleri her üç germ yaprağından köken alabilir; renal tubulus epiteli mezodermden, deri epiteli ektodermden, gastrointestinal sistem epiteli endodermden gelişir. Tüm bu germ yapraklarından gelişen epitel hücre orijinli malign tümörler kanser olarak adlandırılırlar. Kanserler köken aldıkları epitele göre (squamöz hücreli karsinom, glandüler yapı oluşturursa; adenokarsinom) veya organın adına göre (renal hücreli kanser, hepatosellüler kanser gibi) adlandırılabilir. Bazen tümör hücreleri herhangi bir organın hücrelerine benzemez. Bunlara undiferansiye veya az diferansiye karsinom denir.

Sonuç olarak kanser; hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu hücrelerin kontrolsüz bir biçimde sürekli bölünerek çoğalması, normal doku ve organları istila etmesi ve tüm vücuda yayılması ile karakterize malign tablonun genel adıdır (14, 15).

2.1.2. Benign ve Malign Tümörlerin Özellikleri

Tümör gelişimi çok aşamalı bir süreçtir. Hakikaten çoğu tümör vakasının ileri yaşlarda görülmesi tümörün çok aşamalı bir süreç sonunda oluştuğunun kanıtıdır. Tek bir hücrenin anormal proliferasyonuna neden olan genetik düzeydeki patoloji bu çok aşamalı sürecin başlangıcını oluşturur. Bu patolojiyi mutasyonlar, kimyasallar, radyasyon veya virüsler gibi çevresel ajanlar ya da kalıtsal olarak kişideki genetik yatkınlık oluşturabilir. Bu kontrolsüz çoğalmanın yanı sıra tümöral hücreler normal fonksiyonlarını da kaybederek hem yapmaları gereken işlevleri yapamaz hale gelirler hem de normal fizyolojiyi bozacak organizmaya zarar verici görevler üstlenebilirler (15).

Tümörler benign yada malign olabilirler. Benign ve malign tümörler arasındaki ayırım dört faktör temel alınarak yapılır. Bunlar; diferansiasyon ve anaplazi, büyüme hızı, lokal invazyon ve metastazdır.

Diferansiasyon ve anaplazi; Tümörün parankimal hücrelerinin köken aldıkları hücreye morfolojik ve fonksiyonel olarak benzemesine diferansiasyon denir. Anaplazi ise diferansiasyon olmamasıdır. Malign tümör hücrelerinin köken aldıkları ana doku hücrelerine morfolojik ve fonksiyonel açıdan benzememesine (undiferansiye olmalarına) anaplazi denir. Anaplazinin kelime anlamı geriye dönüştür. Az diferansiye

veya undiferansiye tümörlerde primitif özellikte spesifik olmamış (embrioner görünümlü) hücreler olmasıdır (14).

Büyüme hızı; Benign tümörler yavaş büyürken malign tümörler çok daha hızlı büyürler.

Lokal invazyon; Çoğu benign tümör yavaş büyür ve çevrelerinde fibröz bağ dokusundan oluşan kapsülleri vardır. Kapsül tümörü konağın tümöral olmayan dokularından ayırır. Kanserler komşu dokulara infiltrasyon, invazyon, ve destrüksiyon yaparak yayılım gösterirler (14).

Metastaz; Malign tümör hücrelerinin buldukları yerden lenfatik veya hematojen yol ile ayrılıp uzaklara taşınması ve primer tümör kitlesi ile bağlantısı olmayan yeni kitleler oluşturmalarıdır. Metastaz hasta surveyini azaltan en önemli prognostik parametredir. Metastaz maligniteyi gösteren en önemli kriterdir. Metastaz ve lokal invazyon malign tümörleri benign tümörlerden ayıran en önemli özelliklerdir. Kanserler tespit edildiklerinde ortalama %30'u metastaz yapmıştır. %20 okkült metastaz vardır. Genellikle büyük boyutlu tümörler daha sık metastaz yaparlar. Metastaz genellikle çok odaklı olur. En sık metastaza uğrayan organlar akciğerler ve karaciğerdir. İskelet kası ve dalakta son derece nadir metastaz görülür. Kıkırdakta metastaz olmaz. Arter duvarları da metastaza dirençlidir. Bu nedenle hematojen yayılım daha çok venöz yolla oluşur (14).

2.1.3. Kanser Nedenleri

Kanserin etiolojisinde tek bir etkenden bahsetmek mümkün değildir. Kanser aslında birçok etkenin birarada olmasıyla oluşan bir hastalıktır. Kansere sebep olan maddelere genel olarak karsinojen adı verilmektedir. Karsinojenik maddeleri kimyasal, fiziksel, biyolojik ve genetik olarak 4 sınıfta inceleyebiliriz (15, 16).

a. Kimyasal karsinojenler: Bu sınıftaki karsinojen maddeler 3 ana sınıfa ayrılır:

Organik Kimyasallar

- . Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH)
- . Dialkilnitrozaminler vb.

İnorganik Kimyasallar

- . Arsenik
- . Kadmiyum
- . Asbest
- . Kurşun
- . Berilyum

Diğer

- . Alkol
- . Sigara
- . Eksoz
- . Diyet
- . Hormonlar

b. Fiziksel Karsinojenler: Güneş ışınları, Ultraviyole ışınlar

c. Biyolojik Karsinojenler: Virüsler (Retrovirüsler, Hepadna virüs, Papilloma virüs, Herpes virüs)

d. Genetik Karsinojenler: DNA dizi polimorfizmi, onkogenler

Bilim adamları insan kanserlerinin %70-80'ninin muhtemelen çevresel faktörlerden kaynaklandığına inanmaktadırlar. Kimyasal karsinojenlerin birçoğu ve radyasyon etkilerini DNA üzerinde hasar yaparak göstermektedirler. Bu kimyasal karsinojenlere örnek verecek olursak polisiklik aromatik hidrokarbonlar (benzopren),

aromatik aminler, nitrozaminler, muhtelif ilaçlar (alkilleyici kemoterapötik ajanlar), doğal olarak bulunan bileşikler (Aflatoksin B) ve çeşitli inorganik bileşikler (kurşun, kadmiyum, arsenik, asbest vb). Kişinin böyle bileşiklere maruz kalması; diyetinden (uygun koşullarda saklanmayan fıstık ve tahılları kontamine eden mantarların oluşturduğu etkin bir karaciğer karsinojeni olan aflatoksin B alımı), yaşam tarzından (sigara tiryakiliği), mesleğinden (asbest'e maruziyet) ve diğer nedenlerden (tedavi için kullanılan dietilstilbesterol gibi bazı ilaçlar) dolayı olabilir. Östrojen gibi hormonlar ve forbol esterleri gibi bazı karsinojenler mutasyon oluşturmak yerine hücre proliferasyonunu uyararak kanser gelişmesine zemin hazırlarlar. Bu tür karsinojenlere tümör kamçılayıcıları adı verilir. Örneğin östrojen uterus endometrium hücrelerinin proliferasyonunu uyarır. Bazı virüsler de insanda kansere neden olabilir. İnsan T-hücre lösemi virüsü izole edilen ilk onkogenik virüstdür. Virüslerin neden olduğu kanserlerin başında karaciğer ve serviks kanserleri yer alır. Hepatit B virüsü ile hepatosellüler karsinom, Epstein Barr virüsü ile Burkitt lenfoma ve nazofarenks kanseri, insan papilloma virüsü (HPV) ile serviks kanseri ve HIV ile Kaposi sarkomu arasında ilişki tespit edilmiştir (15, 16).

2.1.4. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser hücrelerinin özelliklerini sıralarsak; hücrenin büyüme sinyallerinde otonomi kazanması, büyüme engelleyen sinyallerde bozukluklar ortaya çıkması, apoptosis adı verilen programlı hücre ölümünde bozukluklar olması, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiogenez ve metastaz başlıcalarıdır (15).

Birçok tümör hücrelerinin büyüme faktörlerine gereksinimi normal eşdeğer hücrelere göre daha az olduğundan ve bazı durumlarda çoğalmak için gerekli olan

büyüme faktörlerini kendileride salgılayabildiğinden dolayı, kanser hücreleri çevresel faktörlerden bağımsız ve sürekli çoğalırlar (otonomi). Ayrıca kanser hücrelerinde hücre-hücre ve hücre-matrix etkileşimi de normal hücrelere göre daha düzensizdir. Bununla birlikte, yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalmadan dolayı kanser hücrelerinin çoğunun tutunma yeteneği normal hücrelere göre daha düşüktür. Örneğin epitel hücrelerindeki başlıca adezyon molekülü olan E-Kadherinin ortadan kalkması karsinomların gelişiminde önemli bir rol oynar. Sonuçta kanser hücreleri diğer hücre ve doku bileşenleri ile etkileşimine bağlı kısıtlamalardan kurtulur ve kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz yapma yeteneği artar (15, 17).

Kanser hücrelerinde hücre-hücre etkileşimleri açısından görülen diğer bir özellikte kanser hücreleri arasında kontakt inhibisyonun ortadan kalkmasıdır. Ayrıca kanser hücreleri normal farklılaşma programını takip etmezler ve sürekli çoğalmaları ile uyumlu bir şekilde farklılaşmanın erken aşamalarında kalırlar. Bu duruma en güzel örnek lösemilerdir. Genellikle normal hücreler DNA hasarına karşı apoptosis ile yok olurken, kanser hücreleri apoptotik sinyallerden kaçarlar. Bu yüzden kanser hücreleri normal hücrelerden çok daha uzun yaşarlar. Kanser hastalarında ölümün ve tedavinin yetersiz olmasının en büyük nedeni tümör invazyonu ve metastazdır. Normal hücreler vücuttaki yerlerini korurlar ve genellikle göç etmezler. Oysa kanser hücreleri kaynaklandığı yerden uzağa yayılması ile karakterize edilirler. İnvazyon, malign tümörlerin komşu dokuya yayılması olayıdır. Preinvaziv dönemde tespit edilen kanserlere karsinoma in situ denir. Kanser henüz örtü epiteli içerisinde olup bazal membranı geçmemiştir (15, 17, 18).

Metastaz ise, kanserin primer odakla aralarında bir devamlılık olmaksızın vücudun başka doku ve organlarına yayılması olayıdır. Metastaz primer tümörün en

erken oluşum evresinden itibaren başlar ve zaman içinde tümörün büyümesine paralel olarak büyür. Tümörler histolojik tiplerine göre farklı metastaz gücüne sahiptirler (16). Pek çok epitel kökenli tümörde tümör hücresinin yayılımı tümörün damarlanmasından kısa bir süre sonra meydana gelmektedir. Metastaz oluşumunda tümör hücreleri, önce primer tümör bölgesinde çoğalır, interstisyel stromaya girer, buradaki kan damarları yoluyla dolaşıma katılırlar. Dolaşıma katılan tümör hücreleri hedef organa ulaşarak, hedef organın prekapiller venüllerinde endotel bazal membranına penetre olarak metastatik kolonileri başlatırlar (19).

2.1.5. Kanserin Yayılma Yolları

Kanserler başlıca; vücut boşlukları ve yüzeyleri, lenf damarları ve kan damarları yoluyla yayılırlar.

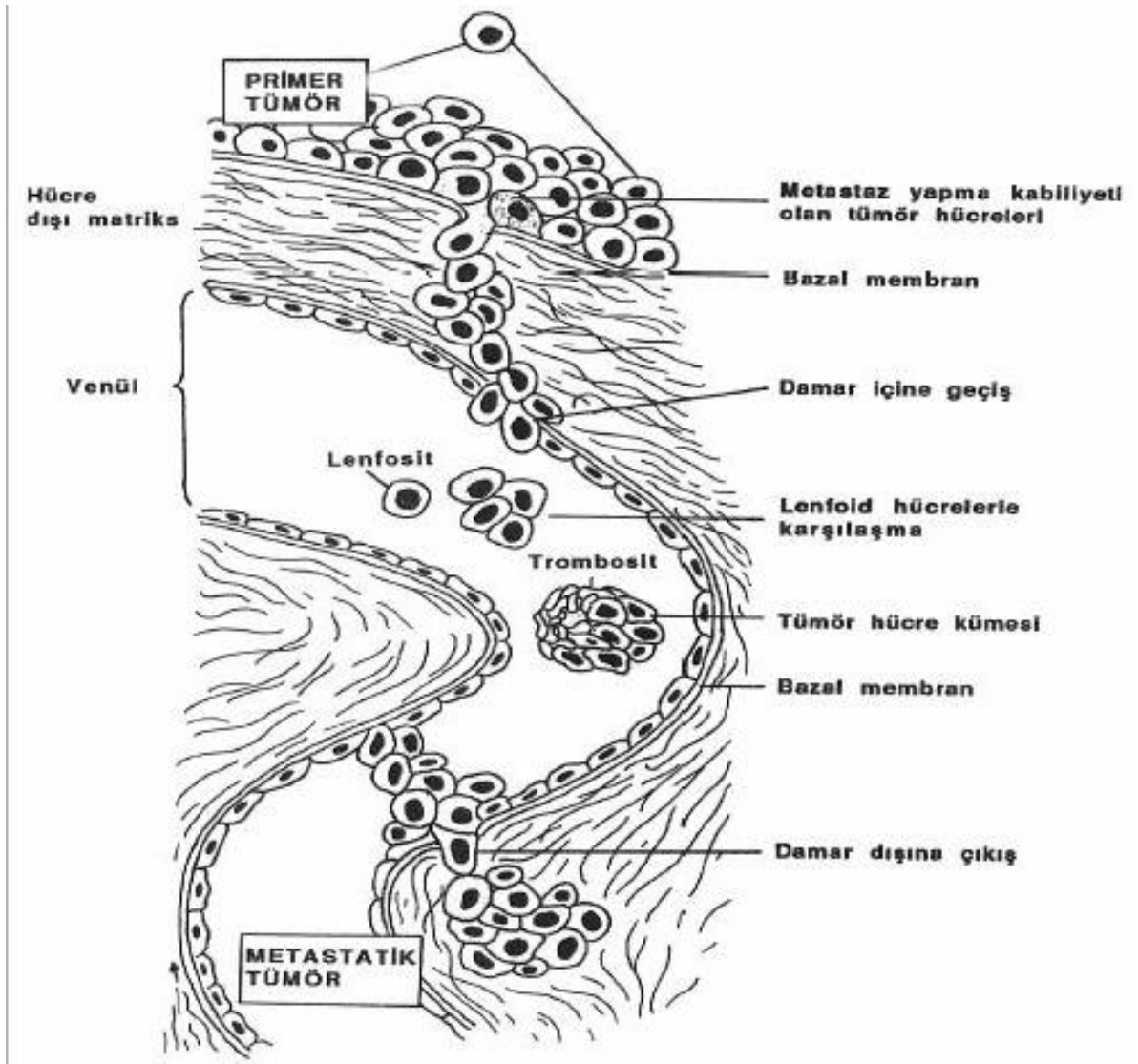
2.1.5.1. Vücut Boşlukları ve Yüzeyleri Yoluyla Yayılma

Malign tümörler vücut boşluklarını çevreleyen yüzeylere ulaştığında, tümörden kopan hücreler o vücut boşluğundaki komşu doku ve organlarda tohum rolü görecektir şekilde yayılabilir. Bu yolla yayılma en sık peritoneal boşlukta ve özellikle over kaynaklı kanserlerde görülmektedir (20).

2.1.5.2. Lenf Damarları Yoluyla Yayılma

Genellikle karsinomların yayılması bu yolla olmaktadır. Nadiren sarkomlarda lenfatiklerle yayılabilir. Lenf damarları yoluyla yayılma sırasında kan yoluyla yayılmada söz konusu olabilir. Çünkü lenf damarları ve kan damarları arasında pek çok bağlantılar vardır (20). Bölgesel lenf düğümlerine ulaşan kanser hücreleri burada tutulur ve kanserin yayılmasına bir süre engel oluşturulur. Ancak lenf düğümü kanser hücreleri

ile dolduğunda veya lenf dđđümüne ulaşan kanser hücrelerinin burada yerleşip büyümelerinden bir müddet sonra diğer lenf dđđümlerine yayılma olabilir. Bölgesel lenf dđđümlerinde büyüme saptanması, malign tümör varlığında bile her zaman metastaz varlığı anlamına gelmemelidir. Çünkü tümör hücre artıkları veya tümör antijenleride reaktif tabiatta bir büyümeye neden olabilir (17, 20).



Şekil 2.1: Tümör hücrelerinin dolaşıma katılması

2.1.5.3. Kan Damarları Yoluyla Yayılma

Daha çok sarkomlar bu yolla yayılırlar. Ancak karsinomlarda bu yolla yayılabilirler. Özellikle venöz damarların çeperi kanser hücreleri tarafından kolayca invaze edilebilir ve koparak kan akımına karışan kanser hücreleri başka organ ve dokulara yayılabilir. Kan dolaşımı yoluyla metastazlar en sık karaciğer ve akciğerde görülür. Tiroid folliküler karsinom, renal hücreli karsinom ve hepatosellüler karsinom

hematojen yolla yayılan kanserlerdir. Arter duvarları ise tümör invazyonuna oldukça dirençlidir (16, 17, 20) (Şekil2.1).

2.1.6. Kanser ve Genetik

Her hücre, proliferasyon, diferansiasyon, yaşlanma ve ölüm seçeneklerini belirleyen genetik programlama ile doğar ve gerektiğinde işleme koyar. Kanserde temel sorun hücre proliferasyonundaki kontrolün kaybıdır. Günümüzde tüm kanser türlerinin somatik hücrelerdeki mutasyon ya da mutasyonlar sonucu oluştuğu ve mutasyonlarında bir seri genin ekspresyonunu etkilediği artık bilinen bir gerçektir. Kanser oluşumunda etkili üç tip gen bulunmaktadır. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir.

2.1.6.1. Onkogenler

Hücre bölünmesi; büyüme faktörleri, büyüme faktörlerinin reseptörleri, zarada bulunan tirozin kinazlar, GTP (Guanozin trifosfat) bağlı sinyal ileticileri, sinyali çekirdekteki bir başka genin ifadelenmesine neden olacak şekilde alan transkripsiyon faktörleri ve büyümeyi baskılayan faktörlerle düzenlenir.

Protoonkogenler normal hücre büyümesi ve çoğalmasını kontrol eden proteinleri kodlayan genlerdir. Eğer bir protoonkogen kendiliğinden gen içindeki bir mutasyon ya da dış kontrolün değişmesi sonucu farklılaşır ve normalden daha fazla ifade edilmeye başlarsa bu değişiklikler hücrede kontrolsüz büyüme ve malignensiye neden olur (15, 17). İşte bu protoonkogenlerin mutant şekillerine onkogen adı verilir. Onkogenlerin büyük bir bölümü hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü ile ilişkili protoonkogen denen normal genlerin mutasyona uğramış formlarıdır. Onkogenler protoonkogenlerden çok daha fazla miktarda ve bazen de olmaması gereken hücrelerde eksprese olurlar.

Bazı durumlarda gen ekspresyonundaki bu anormallikler normal çalışan bir protoonkogeni hücreyi transformasyona götüren bir onkogen haline dönüştürmek için yeterlidir (21). Bu iki gen grubunun tanım farkı ürünlerinin aktivitesiyle bağlantılıdır. Bir protoonkogen, normal protein ürününün işlevi hücre çoğalmasını sağlamak olan, ancak hücrel transformasyonu indüklemeye kapasitesine ve potansiyeline de sahip olan gendir. Bir onkogen ise genetik hasar sonucu mutasyona uğradığı için, denetlenemeyen ve proteini hücrel transformasyon oluşturabilen gendir (22).

Onkogenler, onkoprotein adı verilen proteinleri kodlar. Onkogen proteinlerin büyük çoğunluğu büyüme faktörlerinden gelen uyarılara bağlı olarak hücre çoğalmasını ve sağ kalımını düzenleyen sinyal ileti yollarının birer üyesi olarak görev yaparlar. Bu proteinler arasında polipeptid büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, hücre içi sinyal yollarının üyeleri ve transkripsiyon faktörleri yer alır. Viral ve hücrel onkogenlerin araştırılması sonucunda, malign hücrelerde anormal davranışlara neden olan yaklaşık 100 kadar gen tanımlanmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi, protoonkogenler tarafından kodlanan proteinlerin çoğu normal hücre çoğalmasını kontrol ederler. Bu yüzden bu proteinlerin aşırı ekspresyonu ya da aktivitelerinde artış kanser hücresinin kontrolsüz çoğalmasına neden olabilir (15).

Onkogenik potansiyel kazanan genler hücre yüzeyi, uyarı iletim yolu veya nükleusta görevli olanlardan herhangi birinde olabilir. Onkogenlerin büyük bir bölümü tirozin kinaz aktivitesi gösteren reseptörleri kodlar. Bu reseptörlerin hücre dışı büyüme faktörleri ile etkileşen amino uçlarında gerçekleşen değişiklikler bunların birer onkogen proteinine dönüşmesine neden olur. Büyüme faktörlerinin uyarılmasıyla aktive olan hücre içi sinyal iletim yolları, sonunda hücre döngüsü bileşenlerini düzenleyerek,

G1'deki kontrol noktasından geçişi sağlar. Büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak D-tipi siklinler uyarılır ve büyüme faktörü uyarımını hücre döngüsü ilerlemesi izler (15, 16).

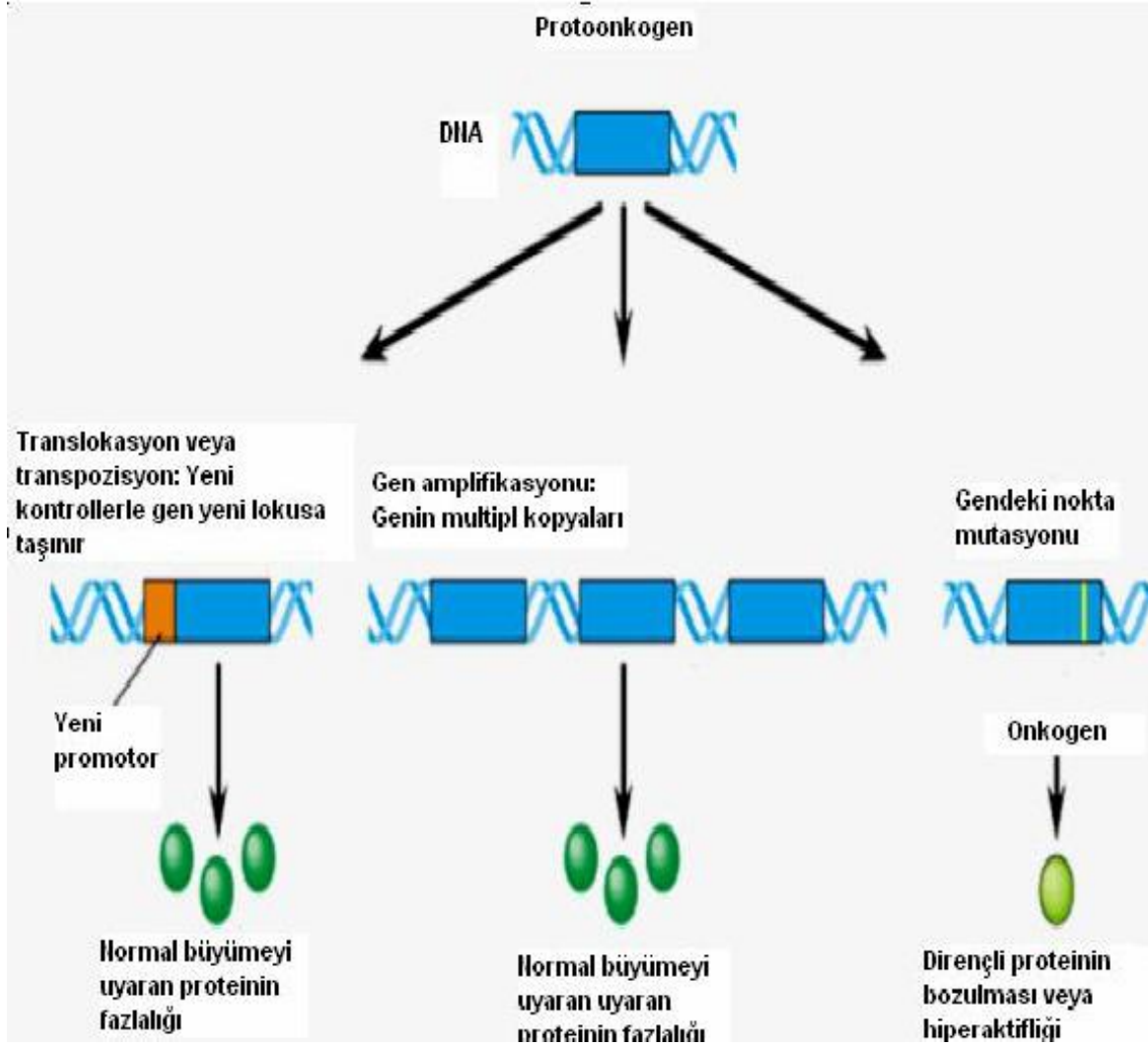
Büyüme faktörleri ile aktive olan hücre yüzey reseptörleri aktive olunca sinyaller membrandan alınıp hücre nükleusuna iletilir. Uyarı iletim sisteminde en iyi bilinen protoonkogen Ras'tır. Ras protein mutasyonu %10-20 oranında tümörlerde görülmektedir. İnsan tümörlerinde en sık dominant onkogen anormalliği Ras genindeki mutasyondur. Büyüme faktörü ile indüklenen mitogenez olayında Ras önemli rol oynar. Ras blokajı büyüme faktörlerinin proliferatif cevabını önler. GDP (Guanozin difosfat), GTP'ye dönerse Ras büyüme faktörü ile aktive olur ve Raf'ı hareketlendirir. Raf MAP (Mitojen aktive edici protein) kinaz yolunu uyararak mitogenez başlatılır. GTP'az aktivitesi ile GTP, GDP'ye döner ve Ras inaktif hale gelir. Ras'ın düzenli işlemesi GDP ile GTP arasındaki olaylara bağlıdır. Bu olaylar enzimatiktir. Daha önemli bir olay aktif Ras ile ilişkisi olduğu bilinen GTP'az aktive eden protein (GAP) varlığıdır ve GAP'ın fonksiyonu Ras aktivitesinin kontrol edilemeyen hareketini önlemektir. Eğer Ras mutasyonu olursa GAP'ın önleyici etkisi ortadan kalkar ve GTP aşırı olur ve mitojenik sinyaller artar (15, 16).

İnsan tümörlerinde onkogenlerin aktifleşme yollarından biri de, genlerin hızlı ve yüksek düzeyde ekspresyonuna neden olan gen amplifikasyonudur. Tümör hücrelerinde, normal hücrelere kıyasla bin kattan daha fazla görülen onkogen amplifikasyonu birçok tümörün giderek daha hızlı büyümesine ve daha malign nitelikler kazanmasına neden olur. Onkogen amplifikasyonunun en tipik örneklerinden biri, nöroblastomlarda (embriyonal sinir hücrelerinden gelişen bir çocukluk çağı tümörü) C-myc geninin benzeri olan N-myc genidir. Hızlı gelişen saldırgan tümörlerde, N-myc

geninin kopya sayısında sıklıkla artış gözlenmesi, myc amplifikasyonunun tümörün daha malign şekle dönüşmesine eşlik ettiğini gösterir (15) (Şekil 2.1.2).

2.1.6.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre bölünmesinin baskılanmasından sorumlu genlerdir. Bozuklukları halinde organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir. Tümör baskılayıcı genler çoğunlukla onkogenler tarafından uyarılan aynı sinyal yollarını baskılar (15). Hücre büyüme ve davranışını regüle eden hücre yüzeyinden salınan çeşitli tipte moleküller vardır. En önemlileri Transforme edici büyüme faktörü (TGF) beta, Kadherin ve Deleted kolon kanser geni (DCC) sayılabilir. TGF beta büyümeyi inhibe edici faktördür. Kadherin hücresel adezyonu sağlar. DCC geni ise hücre hücre ve hücre matriks ilişkisini sağlar ve çevreden aldığı uyarı ile hücre büyüme ve diferansiyasyonunu regüle eder. TGF beta büyüme inhibisyonu yapan genlerin transkripsiyonunu regüle eder. Bunu CDK inhibitörleriyle yapar ve hücre siklusu engellenir. Pek çok tümörde TGF beta'da mutasyon görülür (15, 17).



Şekil 2.2: Aşırı hücre bölünmesine ve kansere yardımcı olan onkogenin protoonkogenden dönüşümü

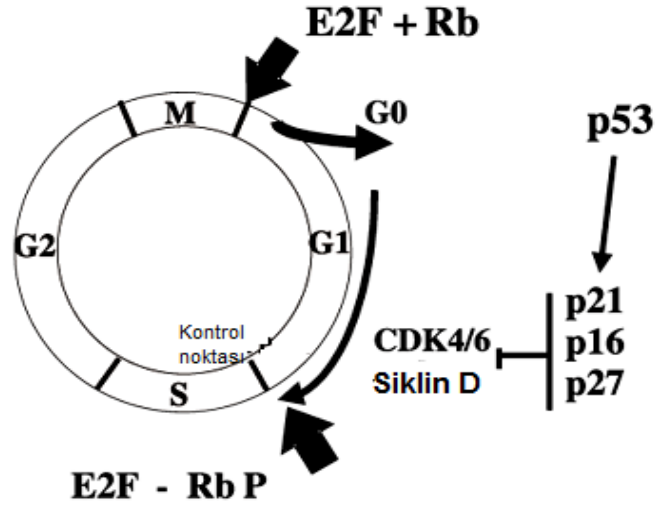
Tümör süpresör genlerin bir diğer etkili olduğu alan büyüme sinyalini azaltmaktır. Nörofibromin 1 (NF1) geni ile Adenomatöz polipozis geni bu kategoridedir (23). Mutant APC geni vakaları ile doğan bir kişide 1 mutant allel vardır. Yaşam sırasında yüzlerce polip gelişir. Malignite gelişmez, ancak tümör gelişimi için iki kopyanın da mutant olması gerekir. Adenomdan kanser gelişimi ek mutasyonlarla mümkündür. APC geninin kodladığı protein sitoplazmada lokalize olup beta katenin gibi diğer proteinlerle ilişkisi vardır. Beta katenin nükleusa girip transkripsiyon

faktörlerini etkileyebilmektedir. APC'nin görevi katenini yıkmak ve sitoplazmada az bulunmasını sağlamaktır. APC inaktivasyonu veya kaybı katenin seviyesini artırır ve hücrel proliferasyon olur. NF1 geni de APC gibi davranabilir. 1 mutant alleli olan kişide sayısız nörofibrom gelişebilir, iki kopyasında kayıp olunca veya ek mutasyonlarla malign tümör olabilir. NF1 geni uyarı iletimini protoonkogenlerden Ras ile yapar. NF, GTPaz aktive eden proteindir, aktif Ras'ı inaktif Ras'a çevirir. NF1 kaybı olunca Ras aktif kalır ve sürekli sinyal iletilir (15, 17).

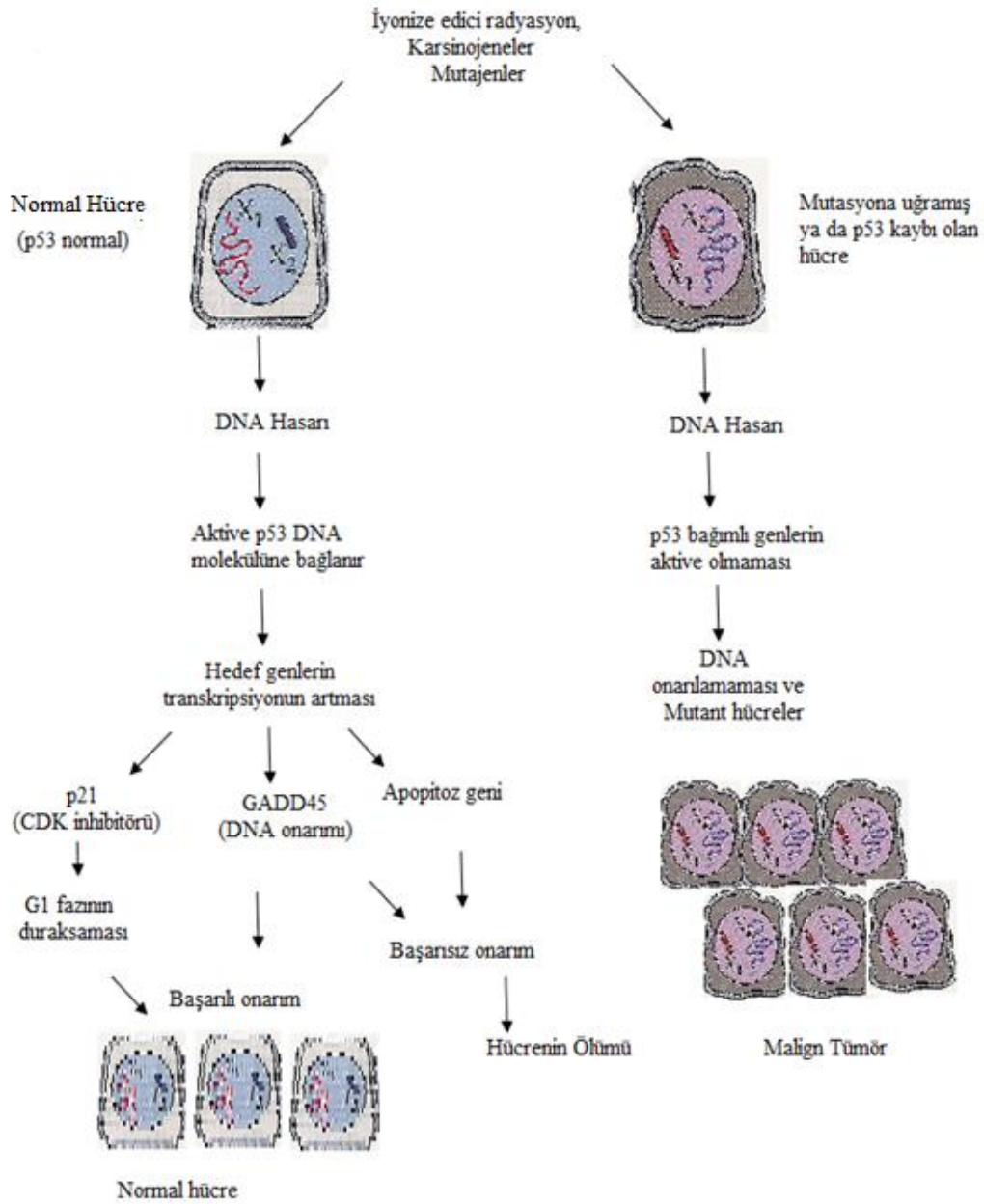
Retinoblastom, p53 ve Wilms tümör (WT1) geni diğer tümör baskılayıcı genlere örnektir. Rb ilk tanınan tümör baskılayıcı gendir. Hücre siklusunda anahtar rolü vardır. Her hücre tipinde eksprese edilir. Aktif, inaktif formu vardır. Aktif formunda hücre siklusunda G₁'den S'e geçerken fren görevi vardır. Fosforlanmamış Rb, E2F (Elongasyon faktör 2) tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyonunu baskılamak üzere, E2F'ye bağlanır. Rb'nin G₁'in sonunda CDK (cyclin dependent kinaz) 4, 6 ve siklin D kompleksleri tarafından fosforillenmesi E2F'den ayrılmasına neden olur. Hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli proteinleri kodlayan hedef genlerinde ekspresyonunu uyarır. Rb proteini olmazsa veya E2F'nin regülasyonu bozulursa hücre siklusunun moleküler freni bozulur ve hücreler sürekli S fazına girerler (15,24,25).

p53 geni, insan tümörlerinde en sık hasara uğrayan tümör baskılayıcı gendir. Tümörlerin %50'den fazlasında bu gende genetik mutasyon gösterilmiştir. p53 kritik kapı bekçisi gibidir. Moleküler polis de denir. Nükleusta lokalizedir ve diğer genlerin transkripsiyonunu kontrol etmek, primer görevidir. Rb'un aksine hücre siklusunun bekçiliğini yapmaz. p53'ün aktif hale gelmesi ancak DNA hasarı, radyasyon, mutajenik kimyasallarla temas olduğunda söz konusudur. Genetik materyal zedelenince inaktif p53 harekete geçer. İki ana hedefi vardır. Hücre siklusunu durdurmak ve apoptosisi

indüklemek. p53 ile indüklenen siklus durması G1 fazının geç döneminde ve p53 bağımlı CDK inhibitörleri aracılığı ile olur (Şekil 2.3). CDK inhibitörlerinden bu işte görevli olanı p21 dir. p21 geni siklin/CDK kompleksini inhibe ederek S fazına girme için gerekli Rb (Retinoblastom) fosforilasyonunu engeller. Hücre siklusunda durma hoş karşılanır ve DNA hasarı tamiri için zaman tanınır. p53 aynı zamanda DNA onarımı yapan genleri (GADD-4) aktive eder (Şekil 2.4). DNA hasarı başarı ile tamir edilirse p53 mdm2'ye bağlanıp etkisi sona erer. Eğer DNA hasarı tamir edilemezse son bir umutla apoptosisi indükleyen Bax genini aktive eder. Bax hasarlı hücreyi apoptosisle öldürür. p53 ayrıca tümör anjiogenez inhibitörlerinden birisi olan Trombospondin-1'i aktive eder. p53 bu özellikleri ile genomun gardiyanı olarak da tanımlanır. p53 homozigot kaybı DNA'nın tamir edilememesine neden olur ve mutasyon hücrelerde birikir ve malign transformasyon oluşur (15, 16).



Şekil 2.3: p53 proteininin p21 üzerinden G₁ fazını baskılaması



Şekil 2.4: p53 ve karsinogenez ilişkisi

BRCA1 ve BRCA2 genleride tümör süpresör gen ailesindedir. BRCA1 ve BRCA2 genlerini kalıtsal olarak mutant biçimde taşıyan kişilerde meme kanseri gelişme riski yüksektir. Protein ürünleri nükleusta lokalizedir ve transkripsiyon faktörleri ile ilgilidir. Bazı veriler bu genlerin DNA tamiri ile ilişkili olduğunu belirtmektedir. BRCA

geninde mutasyon hücre büyümesini direkt etkilemez, DNA replikasyonunda hatalara neden olur ve hücre siklusunu etkileyen genlerin mutasyonuna yol açar (15).

2.1.6.3. DNA Tamir Genleri

Hücre bölünmesi öncesi DNA sentezi gereklidir. DNA onarım gen ürünlerinin normal işlevleri, DNA sentezi öncesi DNA'da oluşan hasarların giderilmesini sağlamaktır. Bu nedenle DNA onarım genlerindeki mutasyonlar diğer genlerin mutasyon hızlarını arttırmırlar. (Kanserde mutator hipotezi kısacası mutasyon yapan mutasyonlardır. En önemli hedef genlerden birisi p53'tür). Onarım ile ilgili genler, hasarın doğrudan giderilmesi, yanlış-eş onarımı, nükleotit-kesme çıkarma onarımı ve baz kesme çıkarma gibi onarım metabolik yollarının genlerini kapsar. OGG1, ERCC1, XRCC1, BRCA2, NBS1 DNA tamir genlerinden sadece birkaç tanesidir (22).

2.1.7. Polimorfizm ve Kanser

DNA'daki dizi farklılıklarının olduğu bulunduktan sonra tıbbi genetik alanında birçok aşama kaydedilmiştir. Bir toplumu oluşturan bireylerin kendi aralarında çiftleştiği bir popülasyonda, DNA dizilerinde görülen iki veya daha fazla farklı genetik sınıfların bulunması polimorfizm olarak adlandırılmaktadır (24).

Genetik polimorfizm, bir popülasyonda, farklı allellere bağlı olarak genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Eğer bir lokustaki allel frekansı en az 0.01 ise ve bu alleli taşıyan heterozigotların frekansı %2'den büyükse bu gen lokusuna polimorfik denebilir. Proteinleri kodlayan insan gen lokuslarının en az 1/3'ünün polimorfik olduğu saptanmıştır. Polimorfizm, gen lokusunda iki veya daha fazla allel yer alabilmesinde (genetik polimorfizm), tüm birey düzeyinde (fenotipik polimorfizm), proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin varyant

formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomal polimorfizm) veya DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde görülebilir. Genellikle polimorfizm fenotipten anlaşılmaz. Daha çok laboratuvar yöntemleri ile saptanır. DNA'nın nükleotid baz dizilerindeki bireysel farklılık belirlenebilir. Eğer dizideki bir değişiklik kodonda da bir değişikliğe neden oluyorsa, ilgili bölgeye farklı bir amino asit katılacaktır. Bu, gen ürünü incelenmesi ile gösterilebilir (25).

Bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin kanserle ilişkili olduğu bilinmektedir. Kanserojen metabolize edici enzimlerin ekspresyon değişiklikleri (Örneğin Faz I ve Faz II metabolik polimorfizmleri), hücre çoğalmasını ve apoptosisi etkilediği bilinen bazı tek nükleotid polimorfizmleri (en iyi örnek CD1 hücre döngü molekülü) kanserle ilişkili polimorfizmlere örnektirler (22).

2.2. Akciğer Kanseri

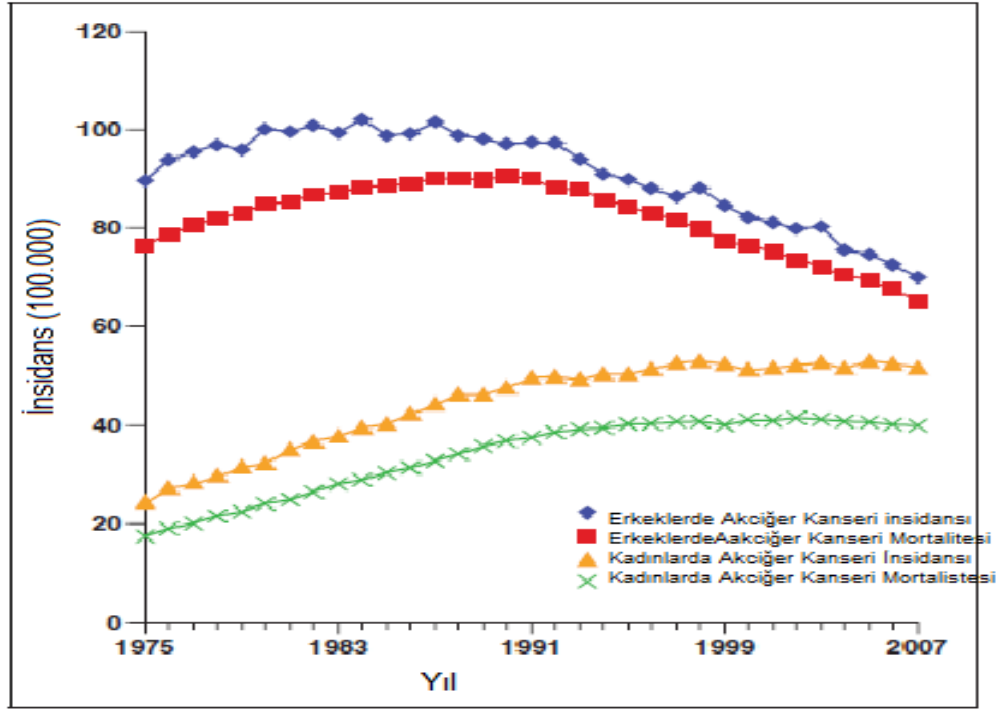
2.2.1. Epidemiyoloji

Akciğer kanseri günümüzde en çok görülen kanser türüdür ve hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde kanserden ölümlerin başında gelmektedir (27). Tüm dünyada yeni kanser olgularının %12.4'ünden ve kanser ölümlerinin %17.6'sından akciğer kanseri sorumludur ve her yıl yaklaşık bir milyon insan bu hastalık nedeniyle ölmektedir (4).

Akciğer kanseri dünyada erkekler arasında kadınlara göre daha yaygındır fakat son verilere göre erkeklerde %0.2 oranında azalma gözlenirken kadınlarda %4.1 oranında artış gözlenmiştir (Şekil 2.5). Kadınlar arasındaki bu artışın nedeni olarak sigara içiminde artış başlıca neden olarak gösterilmektedir. Gelişmiş ülkelerde sigaraya

karşı önlemler arttıkça akciğer kanseri insidansı düşme eğilimi gösterirken gelişmekte olan ülkelerde artış gözlenmiştir (28-32) (Şekil 2.5) (Tablo 2.1).

Amerikan Kanser Derneği tarafından hazırlanan raporda 2009 yılında beklenen yeni akciğer kanseri vaka sayısı erkeklerde 116.090 (%15), kadınlarda 103.350 (%14) ve beklenen ölüm oranları erkeklerde 88.900 (%30), kadınlarda 70.490 (%26) olarak tahmin edilmektedir (2).

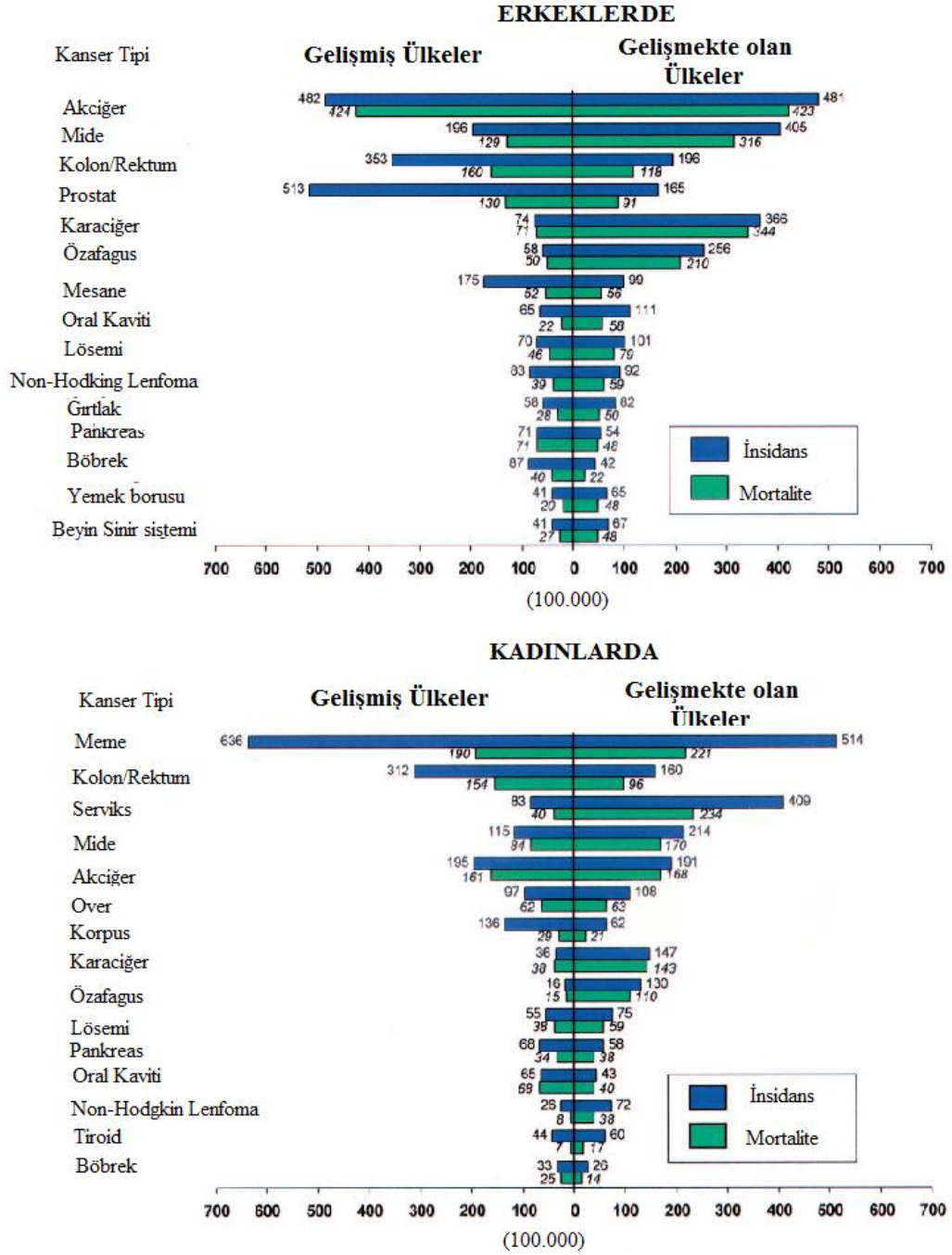


Şekil 2.5: Akciğer kanserinin kadın ve erkeklerde yıllara göre değişimi

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'nın 2005 yılı verilerine göre; ülkemizde akciğer kanseri insidansı 30.13/100.000 ile tüm kanser türleri arasında birinci sırada yer almaktadır. 2002 yılında bu oran 23.89/100.000, 2003 yılında ise 24.35/100.000 olarak bildirilmiştir (33). 2005 yılında erkeklerde 52.73/100.000 ile birinci sıradayken, kadınlarda 7.20/100.000 ile dördüncü sırada yer almaktadır. 2002 yılında erkeklerde

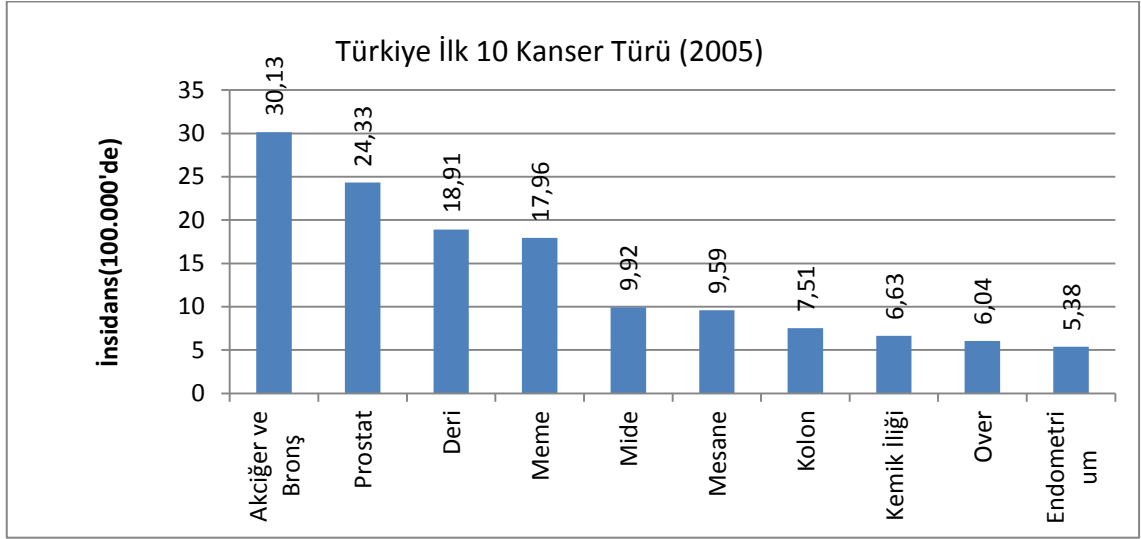
42.20/100.000 ve 2003 yılında 43.50/100.0000 ile birinci sırada yer alırken; kadınlarda 2002 yılında 5.23/100.000 ve 2003 yılında 5.89/100.000 ile altıncı sırada yer almıştır (Tablo 2.2, 2.3, 2.4) (34).

Tablo 2.1: Gelişmiş ve Gelişmekte olan Ülkelerde kanser türlerinin dağılımı

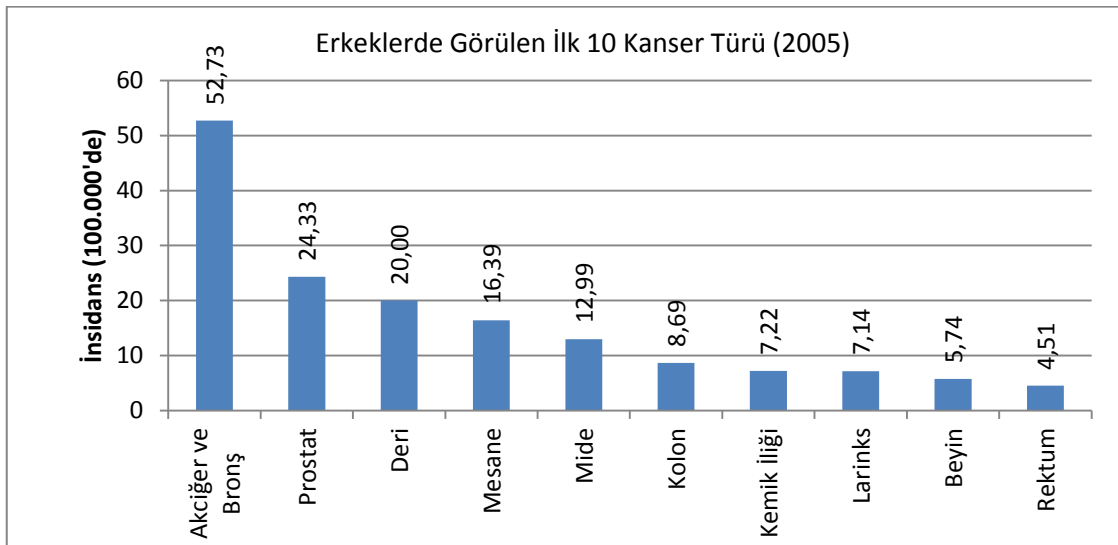


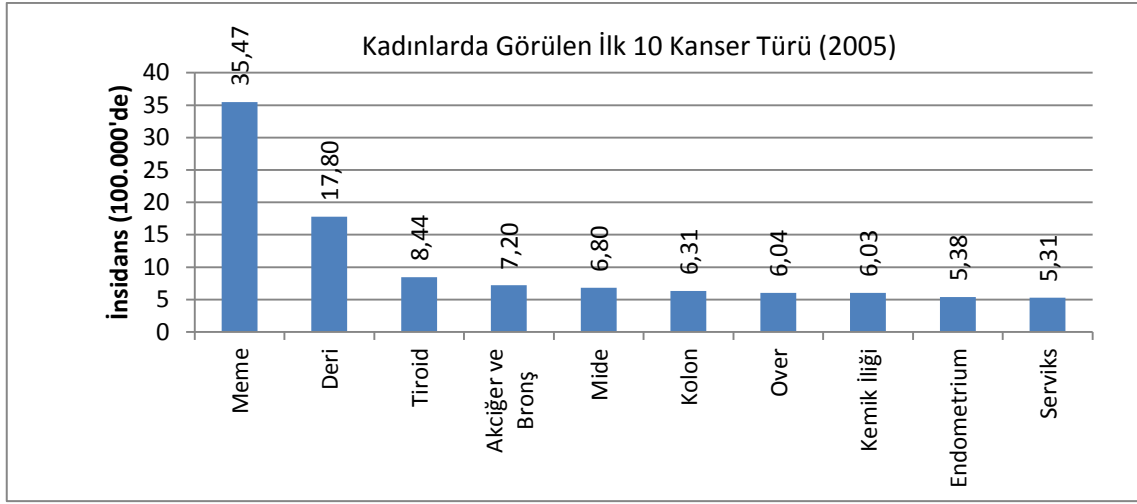
Akciğer kanseri insidansı yaşla birlikte artmakta, 6-7. dekatta pik yapmaktadır. Genç erişkinlerde (50 yaş altında hastaların %5-10 'u) sıklığı daha azdır, genellikle aile öyküsü vardır (27,35).

Tablo 2.2: 2005 yılı kanser istatistiği



Tablo 2.3: 2005 yılında kanser tiplerinin erkekler arasındaki insidansı



Tablo 2.4:2005 yılında kanser tiplerinin kadınlar arasındaki dağılımı

2.2.2. Etiyoloji

2.2.2.1. Sigara

Yapılan çalışmaların çoğu primer akciğer kanseri nedeni olarak sigarayı göstermiştir (36). Akciğer kanseri çoğunlukla sigara ve çevresel etmenlerden ortaya çıkmasına rağmen, solunumsal karsinojenler sağlıklı kişilerde önemli değişikliklere neden olmaktadır. Hastalığın riski etyolojik ajanlara hassasiyet ve kişinin bağışıklığı ile ilişkilidir (37).

Hem inhale edilen sigarada hem de dumanında yüzlerce karsinojen madde bulunmaktadır. Sigara dumanının karsinojenik etkisi, karsinojenlerin DNA'ya ulaşması, DNA'da hatalı kodlama ve mutasyon oluşumuna bağlıdır. Sigaranın kanser riskini artırması, aynı zamanda maruziyetin özelliklerine bağlıdır. Bu özellikler sigara içme süresi, günlük sigara içme miktarı, sigaranın ağızda kalma süresi, izmaritin; polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler, nitrozaminler, piridin alkaloidler ve radyoaktif bileşenleridir. Bunlar içinde nitrozamin en potent ve mutajen karsinojendir ve nikotinin nitrozasyonundan oluşur (38).

Pasif sigara içicileri çevresel dumanı dolaylı olarak inhale ederler. Sigara içmeyen evli kadınlarda yapılan iki çalışmada pasif içicilik muhtemel bir risk faktörü olarak değerlendirilmiştir. Sigara içmeyen eşlerde, sigara içenlerle evlenilmesi sonucunda akciğer kanserinin %30 daha fazla olduğu gösterilmiştir (37, 39).

2.2.2.2. Radon

Sigaradan sonra akciğer kanserinin ikinci en sık nedeninin radon olduğu belirlenmiştir. Radon uranyumun ve radyumun kırılmasıyla doğal olarak oluşan bir gazdır. Genellikle toprak ve suda bulunur. Radonla ilişkili risk artışı, konutlarda ortama yayılan parçalanma ürünlerinin inhalasyonu ile ilişkilidir. İn hale radonun karsinojenik etkisi, partiküle radon emisyonundan daha fazladır. Akciğer kanserinin %2-14'ünden radonun sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (40,41).

2.2.2.3. Asbest

Akciğer kanseri için en önemli mesleki risk faktörü asbest maruziyetidir. Asbest doğada bulunan, ısıya ve kimyasal maddelere dayanıklı olan altı farklı fibröz silika mineraline verilen genel addır. Gemi, uçak, otomobil, inşaat sanayinde ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. Asbestin bronş kanseri, malign mezotelyoma, gastrointestinal, orofarenks ve nazofarenks kanserlerine neden olduğu tespit edilmiştir. (42). Asbest maruziyetinde akciğer kanseri riski beş kat artarken, sigara ile birlikte olduğunda bu risk 50-100 kat artmaktadır. Asbestten başka mesleki olarak krom, nikel, kömür, kadmiyum, uranyum parçalanma ürünleri, demir, arsenik, alüminyum, polisiklik hidrokarbonlar, dizel partikülleri ve formaldehite maruz kalmak da akciğer kanseri riskini arttırmaktadır (43, 44).

2.2.2.4. Geçirilmiş Akciğer Hastalıkları

Tüberküloz, bronşektazi, pnömoni, abse, pulmoner emboli, interstisyel akciğer hastalıkları gibi akciğerde skar bırakan hastalıklarda, skar dokusunun kanser gelişimine zemin oluşturduğu bilinmektedir. Örneğin akciğer tüberkülozu geçiren olgularda akciğer kanseri gelişme riski sekiz kat fazladır (44).

2.2.2.5. Aile Öyküsü

Akciğer kanseri riski, akciğer kanserli hastaların hem sigara içen, hem de içmeyen akrabalarında 2.4 kat fazladır (44). Birinci ya da ikinci derece yakınlarında herhangi bir organ kanseri öyküsü olan Çinli kadınlarda akciğer kanseri riskinin 1.9 kat arttığı gösterilmiştir (45). Artmış ailesel riskin yaş, cinsiyet, mesleki maruziyet ve sigara içiciliğinden bağımsız olduğu ileri sürülmektedir. (46). Ailesinde akciğer kanseri öyküsü olan hastalarda; hastanın yaşı, sigara öyküsü, kanserin histolojik tipi ve evresinden bağımsız olarak, yaşam beklentisi daha kısa ve mortalitesi daha yüksek bir hastalık seyri gözlenmektedir (47).

2.2.2.6. Hava Kirliliği

Hava kirliliğinin akciğer kanseri üzerine olan etkisini ölçmek; uzun süreli doz ve yoğunluk ölçümü gerektirmesi, beraberindeki diğer risk faktörlerinin sinerjik etkileri ve akciğer kanserinin klinik olarak ortaya çıkmasının uzun yıllar alması nedenleriyle oldukça güçtür. Tüm bu güçlükler rağmen, hava kirliliğinin akciğer kanseri riskini artırdığını gösteren çok sayıda prospektif çalışma mevcuttur. Özellikle beraberinde sigara kullanımı veya mesleki maruziyet varlığında sinerjistik etki ile bu risk daha da artmaktadır (48). Başta poliaromatik hidrokarbonlar, arsenik, dizel partikülleri, nikel, krom gibi metaller olmak üzere fosil yakıt ürünleri, motorlu araçların egzoz dumanı ve

kömür dumanı hava kirliliğine yol açan karsinojenik etkenlerdir. Hava kirliliğinin yoğun olduğu kentlerde yaşayanlarda, kırsal kesimde yaşayanlarla karşılaştırıldığında küçük hücreli akciğer kanseri iki kat, büyük hücreli akciğer kanseri 1.2-3.4 kat daha fazla görülmektedir (48). Ayrıca kentlerde yaşayan kişilerde akciğer kanser mortalitesi kırsal alanda yaşayanlara kıyasla %30-40 daha fazladır (49).

2.2.3. Histopatolojik Sınıflandırma

Akciğer tümörlerinin %95'i bronş epitelinden kaynaklanır. Kalan %5'i içinde bronşiyal karsinoidler, mezotelyomalar, bronşiyal gland neoplazmaları, mezenkimal tümörler (fibrosarkomlar, leiomyomlar), lenfomalar ve bazı benign lezyonlar bulunur (50).

Başlıca dört histolojik tipte akciğer kanseri bulunmaktadır. Squamöz hücreli, adenokanser, büyük hücreli ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olarak sınıflandırılmaktadır. Tedavi kararı alınırken çoğu kez ilk üç tip bir kategoriye sokulup küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu şekilde KHAK bu gruptan ayrılmaktadır. Bazı olgularda bu histolojik tipler kombine bulunabilirler (Tablo 2.5) (50).

Tablo 2.5:Bronkojenik karsinomunun histolojik sınıflandırılması ve yaklaşık insidansı

1.Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) (%70-75)
a-Squamöz hücreli karsinom (%25-30)
b-Adenokarsinom (bronkoalveolar karsinom dahil) (%30-35)
c-Büyük hücreli karsinom (%10-15)
2.Küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK) (%20-25)
3.Kombine tipler (%5-10)
En sık görülenler
-Miks squamoz epitel hücreli ve adenokarsinom
-Miks squamoz epitel hücreli ve küçük hücreli akciğer karsinomu

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSO) akciğer tümörleri sınıflaması ilk olarak 1981 yılında yapılmıştır. Bu tarihten sonra patolojik tanı yöntemleri ve kriterlerinde belirgin değişiklikler gerçekleşmiş ve sınıflama DSO tarafından 1999 yılında yeniden düzenlenmiştir (Tablo-2.6) (51).

Tablo 2.6:Akciğer kanseri sınıflandırılması –DSO 1999

<p>1. Squamöz hücreli karsinoma Varyantlar; Papiler Berrak hücreli Küçük hücreli Bazaloid</p>	<p>4. Büyük hücreli karsinoma Varyantlar; Büyük hücreli nöroendokrin karsinoma Kombine büyük hücreli nöroendokrin Bazaloid Lenfoepitelyoma benzeri Berrak hücreli Rabdoid fenotipinde büyük hücreli</p>
<p>2. Küçük hücreli karsinoma Varyant; Kombine küçük hücreli karsinoma</p>	<p>5. Adenosquamöz karsinoma</p>
<p>3. Adenokarsinoma Asiner Papiller Bronkioloalveoler Non-müsinöz Müsinöz Miks müsinöz ve non-müsinöz ya da intermedier hücre tipi</p>	<p>6. Pleomorfik, sarkomatoid ya da sarkomöz elemanlar içeren karsinomlar İğ hücreli ve/veya dev hücreli Pleomorfik İğ hücreli Dev hücreli Karsinosarkom Pulmoner blastom</p>
<p>Müsin salgılayan solid Miks subtipler Varyantlar; İyi diferansiye fötal Müsinöz (kolloid) Müsinöz kist Taşlı yüzük hücreli Berrak hücreli</p>	<p>7. Karsinoid Tümörler Tipik karsinoid Atipik karsinoid</p>
	<p>8. Tükrük bezi tipindeki karsinomlar</p>
	<p>9. Sınıflandırılmayan karsinomlar</p>

2.2.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK), akciğer kanserinin en agresif tipidir. Çok hızlı metastaz yapabilir ve çok hızlı büyür. Sigara KHAK'nın ana nedenidir ve sigara içim süresi uzadıkça KHAK riski artar (52). KHAK erkeklerde kadınlara oranla daha sık olup sigara içimi ile çok yakın ilişkisi vardır. Santral lokalizasyonda kitleler olup hiler ve mediastinal lenf nodlarını erken fazda tutarlar. Hızlı büyüyen,

geniş infiltrasyon yapan ve erken metastaz yapan lezyonlar olup nadiren rezekt edilebilir durumda yakalanır. Bu tümörler akciğerin nöroendokrin hücrelerinden köken alırlar. Nörosekretuar granüller içerirler; nöron spesifik enolaz, adrenokortikotropik hormon (ACTH), kalsitonin, gastrin-releasing peptid ve kromogranin-A gibi polipeptid hormonlar salgırlar. Dolayısı ile bu tümörler çeşitli paraneoplastik sendromlarla birlikte (50).

2.2.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

Akciğer kanserinin yaklaşık %80'nini oluşturur. Squamöz hücreli, adenokanser, büyük hücreli olarak sınıflandırılmaktadır. Metastaz yapma oranı KHAK' ya göre çok azdır. Türkiye de en çok rastlanan tipi squamöz hücreli akciğer kanseridir. Squamöz hücreli karsinomlar erkeklerde daha sık görülür, büyük bronşların santrallerinden çıkmaya meyillidir, lokal hiler lenf nodlarına kolay yayılır, fakat toraks dışına diğer akciğer tümörlerinde olduğundan daha geç yayılır. Squamöz kanser bronş epitelinden yıllar önce başlayan bir metaplazi veya displaziye izleyen in-situ karsinomdan birkaç yıl sonra ortaya çıkar. Bu durumda henüz klinik ve radyolojik bir bulgu olmadığı halde; balgamda veya bronş lavajında atipik hücreler görülür (50).

Adenokarsinomların erkek ve kadınlarda görülme sıklığı eşit olup, sigara ilişkisi squamöz kansere göre daha azdır. Genellikle periferde yerleşir, birçoğu da periferal akciğer skarlarından çıkar. Genel olarak bu tümörler yavaş büyür, daha küçük kitle yapar ve diğer subtiplere göre daha erken safhada metastaz yaparlar (50).

Büyük hücreli akciğer kanseri, sitolojik diferansiasyon göstermeyen, squamöz veya glandüler neoplazmların herhangi bir kategoriye giremeyecek kadar undifferansiye şeklidir. Genellikle periferik yerleşimlidir ve anaplastik olup büyük ve veziküler

nükleusları vardır. Erken dönemde uzak metastaz yapma eğiliminden dolayı kötü prognozludur (50).

2.2.4. Akciğer Kanserinde Evreleme

Akciğer kanseri tanısı konduktan sonra etkili bir tedavi uygulamak ve tedavi uygulandıktan sonra sonuçların değerlendirilmesini bilimsel bir şekilde yapmak için evrelendirme çok önemli bir noktadır. Akciğer kanserinde, birincil tümör büyüklüğü ve yayılımına (T), bölgesel lenf bezi tutulumuna (N), uzak metastaz varlığına (M) dayanan TNM evrelendirilmesi yapılmıştır (53). Sonraki yıllarda daha sağlıklı evrelendirme yapabilmek amacıyla TNM sisteminin yeniden geliştirilmesi ile squamöz, büyük hücreli ve adenokarsinomlu (Küçük hücreli dışı, Non small cell, NSCLC) hastalar yapılacak tedavi ve prognoz yönünden Evre IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB ve IV şeklinde sınıflandırılmaktadır. Küçük hücreli akciğer kanserli hastalarda TNM sistemi yerine **VALG** (Veterans Administration Lung cancer Group) tarafından önerilen evreleme sistemi kullanılmaktadır. Buna göre hastalığın konumu göğüs kafesinin yarısında (bir hemitoraksta) ise “sınırlı”, her iki hemitoraksta yada hemitoraksın dışında ise “yaygın” olarak evrelendirilmektedir. Bununla beraber TNM evreleme sistemi küçük hücreli hastalarda da kullanılabilir (54).

- **Evre 1:** Tümör, sadece akciğerin küçük bir bölümünde görülme halidir.
 - Evre 1A: Kanser sadece bir akciğerdedir.
 - Evre 1B: Kanser ya (a) akciğer içinde büyür, ya (b) akciğerin ana bronşuna yayılır, ya da (c) akciğeri kaplayan plevranın iç tabakasına yayılır.
- **Evre 2:** Hastalık, en yakın lenf bezlerine atlamış durumdadır.

- Evre 2A: Kanser, göğüste bulunduğu taraftaki lenf bezlerine yayılır.
- Evre 2B: Kanser ya Evre 1B'deki gibidir ve aynı taraftaki lenf bezlerine yayılmıştır; veya kanser lenf bezlerine yayılmamıştır ama şunlardan bir veya daha fazlasına yayılmıştır: (a) Göğüs duvarına (b) Diyaframa, veya (c) akciğerler arasındaki plevraya, (d) kalbin etrafındaki zara ve/veya (e) ana bronşa.
- **Evre 3:** Tümör, plevra veya iki akciğer arasındaki mediasten deneni boşluğa veya buradaki bezlere yayılmışsa bu durum 3. evredir.
 - Evre 3A: Kanser kendisiyle aynı taraftaki lenf bezlerine yayılmıştır. Ayrıca şunlardan bir veya daha fazlasına da yayılmış olabilir: (a) Göğüs duvarına (b) Diyaframa, veya (c) akciğerler arasındaki plevraya, (d) kalbin etrafındaki zara (perikardiyum) ve/veya (e) ana bronşa.
 - Evre 3B: Kanser köprücük kemiğinin üstündeki lenf bezlerine veya göğsün karşı tarafındaki lenf bezlerine yayılmıştır ve/veya şunlardan biri veya daha fazlasına yayılmıştır: (b) kalbe, (c) aşağı vena kava ve aorta, (d) göğüs duvarına, (e) diyaframa, (f) trakeaya, (g) sternum ve yutağa.
 - Evre 3C: Kanser ayrıca plevra tabakaları arasındaki sıvıya da yayılmış olabilir.
- **Evre 4:** Karaciğer, kemik, böbrek üstü bezi gibi uzak organlara yayılmış durumudur.

2.2.5. Akciğer Kanseri Oluşumunda Gen Amplifikasyonunun Rolü ve Sitokrom P-450 Enzim Genleri

Amplifikasyon bir gen bölgesinin normal genomdan bağımsız olarak anormal şekilde çoğalması ve bu bölgenin gen ürününün çok fazla miktarda artması olayıdır. Gen amplifikasyonlarının çeşitli nedenleri olmakla birlikte en önemli nedenlerinden birisi kimyasal kanserojenlerdir. Bu kimyasallar arasında akciğer kanserleri ile direkt ilişkili olan sigara dumanı ve içerisinde bulunan benzen, benzo(a)ren, N-nitrosaminler gibi maddelerdir. Bu konuda gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalarda benzo(a)ren'in Sitokrom P-450 enzimleri tarafından metabolize edildikten sonra DNA molekülünde G&T ve T&A gibi transversiyon tipi mutasyonlar oluşturduğu saptanmıştır. Bu gibi maddelerin protoonkogenlerde mutasyon yaratarak onları aktif kanser genleri olan onkogen haline getirmesi akciğer kanserlerinin oluşumunda temel nedenlerden birisidir. Bu onkogenlerin en önemlilerinden birisi 8. kromozom üzerinde lokalize olan C-myc onkogenidir. Bu genin ürünü nükleusta bulunan bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Ayrıca akciğer kanserlerinin oluşumunda L-myc ve K-ras onkogenlerinin rolü olduğu bilinmektedir. Bilindiği gibi protoonkogenler hücre büyümesi ve bölünmesini ileri derecede stimüle etmekte ve sonuçta kanserleşme olayı meydana gelmektedir (55,56).

Sitokrom P-450 enzim genleri insanlarda yaklaşık 50 genden oluşan çok geniş bir gen ailesidir. Sitokrom P-450 enzimlerinin görevi, sigara dumanında bulunan benzen, benzo(a)ren (BP), benzo(a)pyrene diol epoxide(BPDE), dimetil sülfat ve dimetilnitrosamin gibi maddelerin metabolize edilerek hücreden dışarı atılmasıdır. Bu işlem sırasında Faz I enzimleri adı verilen enzimler çevresel kimyasallara bir oksijen

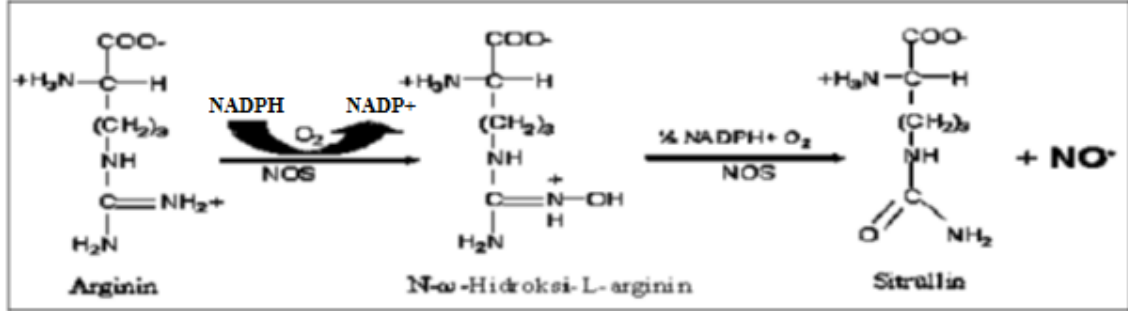
molekölü bağlayarak bu maddelerin epoksit türevlerine dönüşmesini sağlarlar. Daha sonra Faz II enzimleri adı verilen glutatyon transferaz, glukronil transferaz ve sülfatazlar gibi enzimler bu moleküllerin suda çözünmesini sağlayarak hücreden dışarı atılmasını ve böylece bu maddelerden hücrenin zarar görmesini engellerler. Akciğer kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda Faz I enzimlerinin çok hızlı çalıştığı, buna karşılık Faz II enzimlerinin ise daha yavaş çalıştığı gösterilmiştir. Bunun sonucu epoksit türevleri hücrede birikmekte ve instabil olan bu maddeler DNA molekülüne kovalent bağlarla bağlanarak DNA molekülünde mutasyonlara ve dolayısıyla kanser oluşumuna yol açmaktadırlar (56,57).

2.3. Nitrik oksit (NO) ve Fizyolojik Etkileri

Nitrik oksit (NO), bir nitrojen ve bir oksijen atomundan oluşan, molekül ağırlığı 30 kD olan, yağda çözünen, biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilen, 3-5 sn gibi çok kısa yarı ömre sahip, serbest radikal özelliğinde renksiz bir gazdır. Azot merkezli radikal olarak bilinen NO diğer radikal türlerinin aksine, paylaşılmamış elektron nitrojen atomu üzerinde yerleşik değil; azot ve oksijen atomları üstünde delokalize bir şekilde bulunur. NO radikalının bu özelliği kendi reaktivitesini baskılar, stabilitesini artırır ve biyolojik koşullarda sentezlendiği yerden daha uzak mesafelere difüzyonunu kolaylaştırır. Nitrojen oksit türevlerinden biri olan NO radikali endojen olarak da sentezlenmektedir (58).

NO; düz kas, endotel hücresi ve diğer birçok memeli hücresinde L-arjinin aminoasidinin guanido azotunun, sitokrom P-450 redüktaz homologu ve nitrik oksit sentaz (NOS) olarak adlandırılan enzimi aracılığı ile oksitlenmesi sonucu sentez edilir. Sentez için nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), kalmodulin, oksijen ve

dört kofaktöre (hem, flavin mononükleotid (FMN) , flavin adenin dinükleotid (FAD) ve tetrahidrobiyopterine (BH₄) ihtiyaç bulunmaktadır (Şekil 2.6) (59).



Şekil 2.6: Nitrik oksit sentezi

Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO• serbest radikal yapısında olmasından dolayı yarı ömrü çok kısadır. NO• lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir (60, 61).

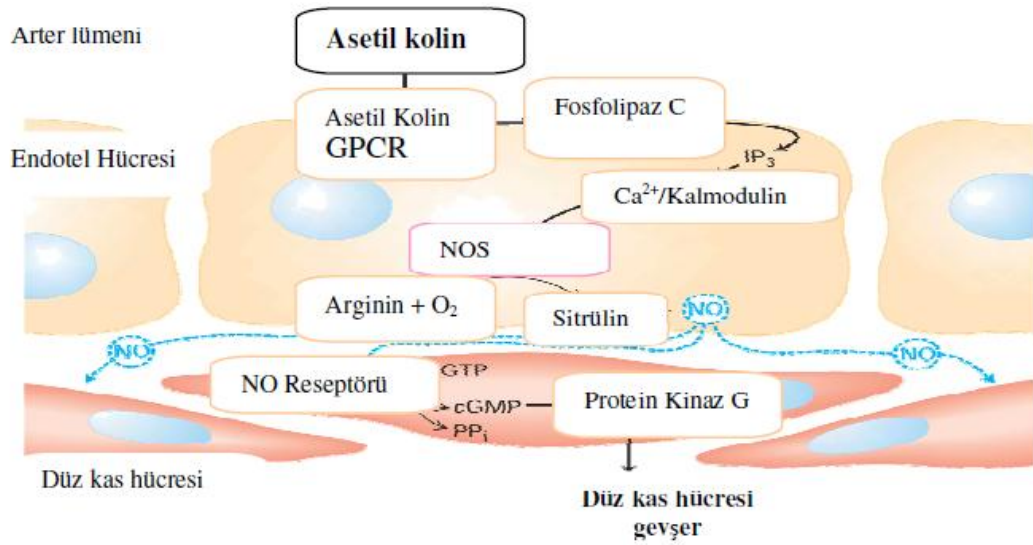
Düşük konsantrasyonlar da iken NO• toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevlerin gerçekleşmesinde rol alır. Havadaki NO• oksijenle oksitlenerek çok kısa sürede NO⁻² (nitrit) ve NO⁻³ (nitrat) oluşturur. NO•'nun açık formülünde görülen çiftlenmemiş elektronu, azot ve oksijen atomları üzerinde yer değiştirerek ' rezonans stabilite' sağlar. NO reseptörden bağımsız olarak hücre membranından kolayca difüze olabilir. Tüm bu özellikler NO•'ya ideal bir haberci özelliği kazandırmaktadır (62, 63).

NO'nun bu özelliklerinin tanımlanmasından sonra, NO'nun vasküler etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış (64) ve NO/eNOS hücre biyolojisi ve moleküler biyolojide önemli araştırma konularından biri haline gelmiştir (65).

NO, lokal vasküler denge için esansiyel olup, kimyasal olarak stabil olmayan bir serbest radikaldir. 5-10 saniye arasında değişen yarı ömrü nedeniyle hücre dışı alanda sadece lokal bir etkiye sahiptir. NO, tüm nitrovazodilatörlerin aktif bileşenidir

(66-68). Düz kas hücrelerinin gevşetilmesi, trombosit aktivasyonunun inhibisyonu, damar düz kas hücrelerinde büyüme ve göçün baskılanması ile damar duvarında sentezlenen endotelinin düzenlenmesi NO'nun başlıca görevleridir (69, 70).

Asetilkolin, endotel hücre yüzeyinde bulunan G-proteine bağlı reseptörüne bağlandığında G-proteininde yapısal değişiklik meydana gelir ve fosfolipaz-C aktiflenir. Aktiflenen fosfolipaz-C, (fosfatidilinozitolbifosfat'ı PIP₂) inositoltrifosfata (IP₃) dönüştürür. Sitoplazmada IP₃ seviyesinin artışı endoplazmik retikulumda depolanan Ca⁺²'un sitoplazmaya geçişini tetikler. Sitolozde oluşan Ca⁺² / kalmodulin kompleksinin NOS' u aktiflemesi sonucu Larginin ve O₂' den, sitrülin ve NO sentezlenir (Şekil 2.7) (71-73).



Şekil 2.7: NO sentezi ve etki mekanizması

Endotel hücresinden salınan NO, düz kas hücrelerine difüzyon ile geçer. Kas hücresi içerisinde artan NO konsantrasyonu, cGMP artışını tetikleyerek protein kinaz G'yi aktive eder, hücre içi Ca⁺² seviyesi azalır ve kas hücresi gevşer (71).

2.3.1. Nitrik Oksit, Hücre Proliferasyonu ve Kanser

NO tümör hücre büyümesine, genotoksik lezyonların indüksiyonuna yol açabilmektedir. NO ve NO kaynaklı reaktif nitrojen türleri, DNA hasarında (nükleik asitlerin nitrosatif deaminasyonu, alkilleme ve DNA zincir kırılımı gibi) ve DNA onarım enzimlerinin (DNA ligaz gibi) inhibisyonunda doğrudan veya dolaylı mekanizmalarla sonuçlanan oksidatif ve nitrosatif stresi indükler (7,74). Nitrasyon, nitrosasyon, fosforilasyon, asetilasyon veya poliADP ribozilasyonu ile kanserle alakalı genlerdeki yada proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonlarındaki mutasyonların indüklenmesi, kanser riskini arttıran anahtar olaylardan bazılarıdır. Özellikle yüksek düzeydeki NO; DNA'nın doğrudan modifiye edilmesiyle veya karsinojenik nitrosaminlerin oluşumuyla genotoksiktir. NO, NO₂, N₂O₃'ün aerobik solüsyonlarının nükleik asitlerin deaminasyonlarına sebep olduğu bulunmuştur. NO ayrıca hücre döngüsünün kontrol noktalarını, apoptosisi ve DNA onarımını bozarak karsinojenik sürece etki etmektedir (8-11).

NO hem DNA hasarına neden olabilir hemde sitotoksiteden korur. Hücre proliferasyonunu hem inhibe hem stimüle edebilir. Hem pro hem anti apoptotik etkileri olabilir (75, 76). NO'nun bu farklı etkilerinin, kimyasıyla (posttranslasyonel modifikasyonlar ile alakalı modifikasyonlar) ve biyolojik heterojenliğiyle (hücrel üretim, tüketim ve yanıtlar) alakalı olduğu düşünülmektedir. Bu paradoksun sebepleri genellikle büyüme durmasına, apoptosise veya adaptasyona sebep olan p53 ve hipoksi indüklenebilir faktör-1(HIF-1) tarafından aracılık edilen stres yanıtının NO tarafından yapılan regülasyonu olabilir (76-78). NO'nun antitümoral özellikleri genel olarak çekirdekte p53 birikimini indüklemesiyle ilgilidir (78-81). NO donörleri, RAW 264.7 makrofajlarındaki JNK-1/2 aktivasyonu vasıtasıyla p53 birikimini ve apoptosisi

indüklerler. p53 proteinindeki JNK bağlanma bölgesine uygun bir peptit etkili olarak ubiquitinasyonunu bloke eder ve sonuç olarak p53 yarılanma ömrünü arttırır (82,83).

NO ayrıca HIF-1 üzerindende etkili olmaktadır. HIF-1 α bir transkripsiyonel faktördür ve 60'dan fazla hipoksiyle düzenlenen genin doğrudan HIF-1 α tarafından düzenlendiği belirtilmektedir. HIF-1 α molekülünün hipoksiye cevap olarak ifade edilmesi artar ve vücudun hipoksiye adaptasyonu için gereklidir. Anahtar onkogenleri ve insan kanserlerindeki tümör baskılayan genleri etkileyen tümör içi hipoksinin ve/veya genetik değişimlerin sonucu olarak HIF-1 α aşırı ifade edilir. Fakat HIF-1'deki tiol grupları ve HIF-1 regülasyonuna katılan proteinler NO tarafından posttranslasyonel modifikasyonlar için potansiyel hedeftirler. NO ile alakalı HIF-1 aktivasyonu normooksik insan glioblastoma ve hepatoma hücrelerindeki VEGF ifade edilmesini arttırdığı gösterilmiştir (84, 85).

NO'nun kanser oluşumu, tümör büyümesi, apoptosis üzerindeki etkilerinin NO'ya tümör hücrelerinin duyarlılığındaki farklılıkların neden olduğu düşünülebilir (86). NO'nun ve reaktif nitrojen ürünlerinin genotoksik ve anjiogenez özellikleri olduğu bilinmektedir. Artmış NO üretimi VEGF üzerinden kanserli hücrelerde anjiogenezi arttırmaktadır (87). NO ve metabolitleri proteinlerin nitrasyonuna yol açar ve bu NO'nun protein modifikasyonları ve kanser oluşumunu desteklediğinin delilidir (88).

2.4. Nitrik Oksit Sentaz ve Görevleri

Nitrik oksit sentaz (NOS), L-Arjininden NO sentezler. NOS'un üç izoformu vardır.

Bunlar;

- nNOS : Nöronal izoformudur. Sempatik sinir sonlarında bulunur.

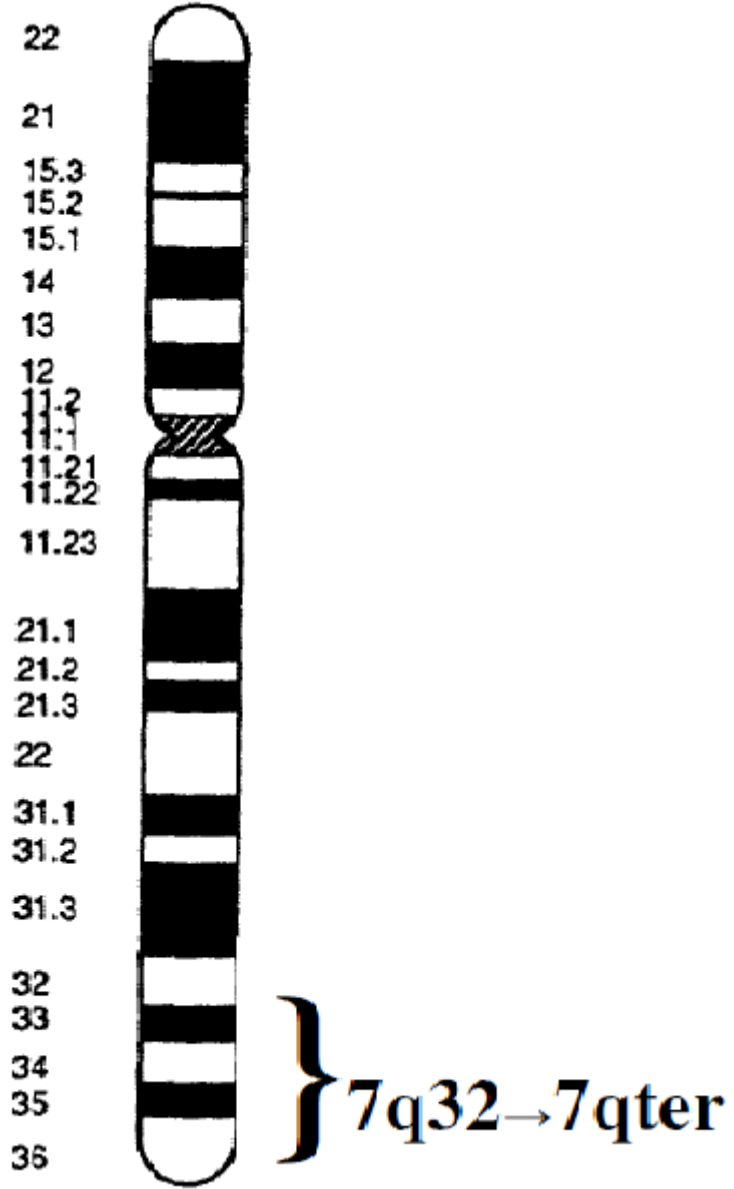
- iNOS: Uyarılabilir izoformudur. Aktif makrofaj ve miyositlerde bulunur.

-eNOS: Endotelial izoformudur. Vasküler endotel, trombositler ve endokardda bulunur.

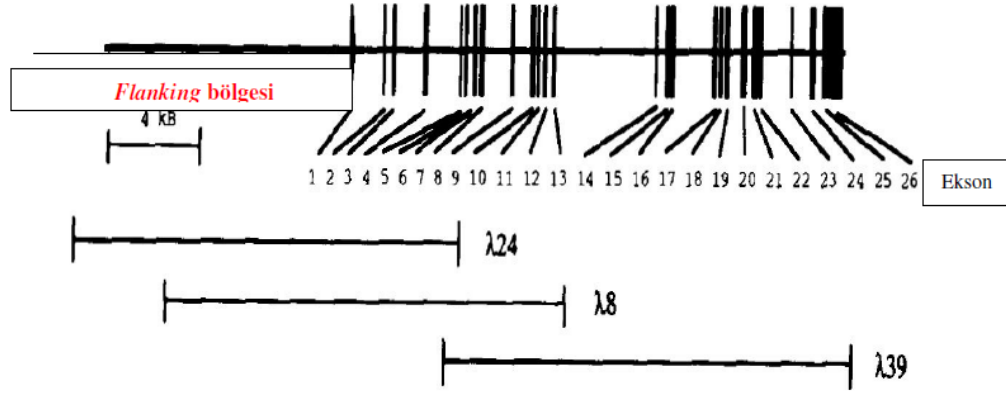
NOS'un endotelial ve nöronal izoformları Ca^{+2} /kalmodulin mekanizmasına bağımlı bir şekilde bazal NO seviyesini az miktarda yükseltir. Buna karşılık uyarılabilir NOS doğru fizyolojik uyarı ile yüksek seviyelerde NO üretir. Bu üretim Ca^{+2} 'dan bağımsızdır. NOS enziminin her üç izoformu kalpte mevcuttur. eNOS hem in vivo hem de in vitro şartlarda sürekli sentez edilen tek NOS izoformudur (89, 90).

2.5. eNOS Geni

eNOS (endotelial Nitrik Oksit Sentaz) geni, 7q 32 _ 7q terminal (ter) bölgesinde yer alır (Şekil 2.8). eNOS geni 26 ekson içerir ve yaklaşık olarak 21 kilobazlık genomik DNA'dan oluşur. eNOS genine ait ayrıntılı bilgiler şekil 2.8 ve şekil 2.9'da görülmektedir. eNOS geninin kodladığı mRNA 4052 nükleotid içerir ve haploid genomda tek kopya olarak bulunur (91).

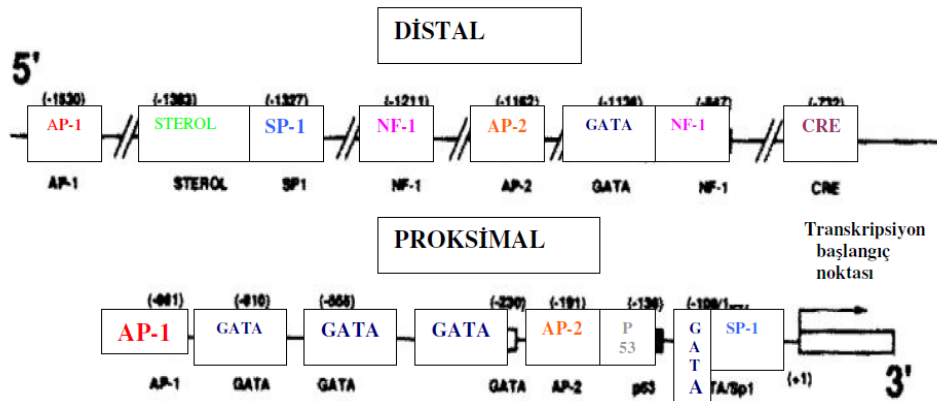


Şekil 2.8: eNOS genine ait kromozomal yerleşim



Şekil 2.9: eNOS geni üzerindeki *flanking* bölgesi ve eksonların yerleşimleri

eNOS geninin 5' ucunda yer alan *flanking* bölgesi, promoter bölgesinide taşır. eNOS geni TATA kutusu yerine, proksimal promoter elementleri taşır. Yapılan çalışmalar proksimal elementlerin, endotel hücresinin yapısal genlerinde bulunan promoter elementleri ile uygunluk gösterdiğini ortaya koymuştur. eNOS geninin proksimal promoter elementleri AP-1, AP-2, sterol düzenleme bölgesi, SP-1, GATA kutusu, NF-1, CRE ve p53' dür (Şekil 2.10) (91).



Şekil 2.10: Proksimal promoter elementlerinin *flanking* bölgesi üzerindeki yerleşimleri

AP-1 ve AP-2: Forbol esterleri ve cAMP'ye cevap olarak AP-1 ve AP-2'nin eNOS transkripsiyonunu etkiledikleri düşünülmektedir. AP-1 nükleotid (nt) -1530 ve nt -661, AP-2 ise nt -1162 ile nt -191 de yer alır.

Sterol düzenleme bölgesi: Nt -1383'te başlayan iki adet sterol düzenleme bölgesi bitişik olarak yer alır. Sterollerin bölgeye bağlanması ile eNOS transkripsiyonu baskılanır. Sterollerin yokluğu ise eNOS transkripsiyonunu hızlandırır.

SP-1: RNA polimeraz II ile eNOS transkripsiyonunun başlaması bu bölgeye çinko-parmak ailesinden olan SP-1 proteinlerinin bağlanmasını kolaylaştırır.

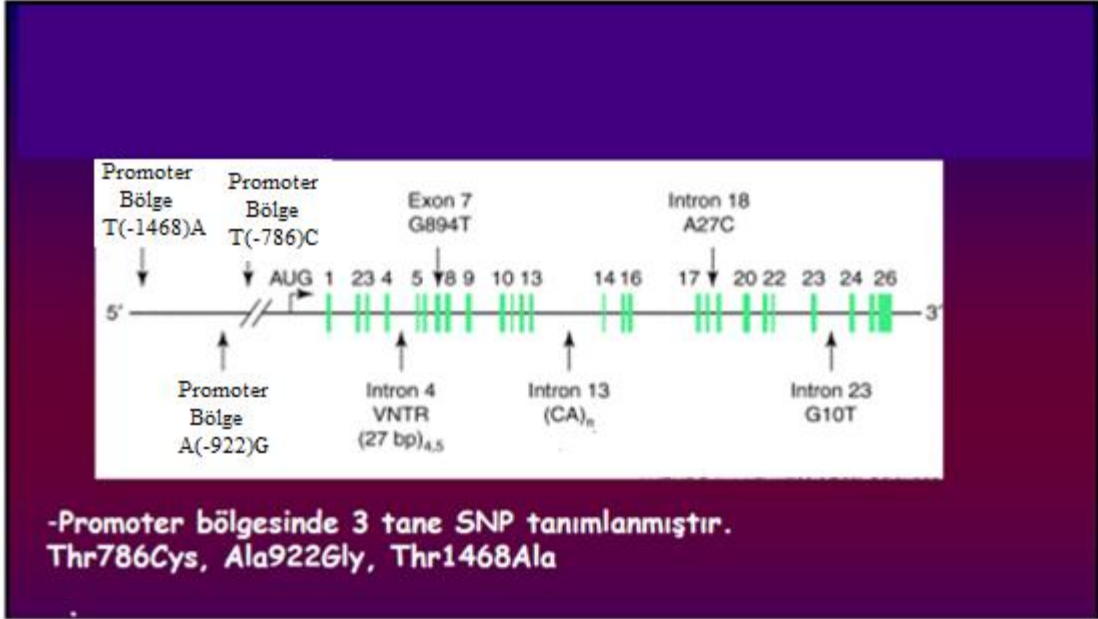
GATA: DNA'ya bağlanan proteinlerden olan çinko-parmak proteinleri, transkripsiyon faktörlerinden GATA kutusu ailesi tarafından tanınır. *Flanking* bölgesinde 5 adet GATA kutusu nt -1136, nt -610, nt -555, nt -230, nt -108'de yer alır.

NF-1: NF-1 transforme edici büyüme faktörü β' ya yanıt oluşturur.

CRE: cAMP'ye cevap elementidir. Hücre içi cAMP değişikliklerine bağlı olarak transkripsiyonu düzenler. Gen transkripsiyonunun ani olarak hızlandırılmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

p53: Nükleer fosfoprotein olan p53, eNOS gen transkripsiyonunu aktive veya inhibe edebilir.

eNOS genine ait SNP'den ikisi genin promoter bölgesindeki T-786C ve ekson 7'deki G894T polimorfizmleridir. Bu iki polimorfizm ve diğer SNP'lerden birkaçı şekil 2.11'de gösterilmiştir.

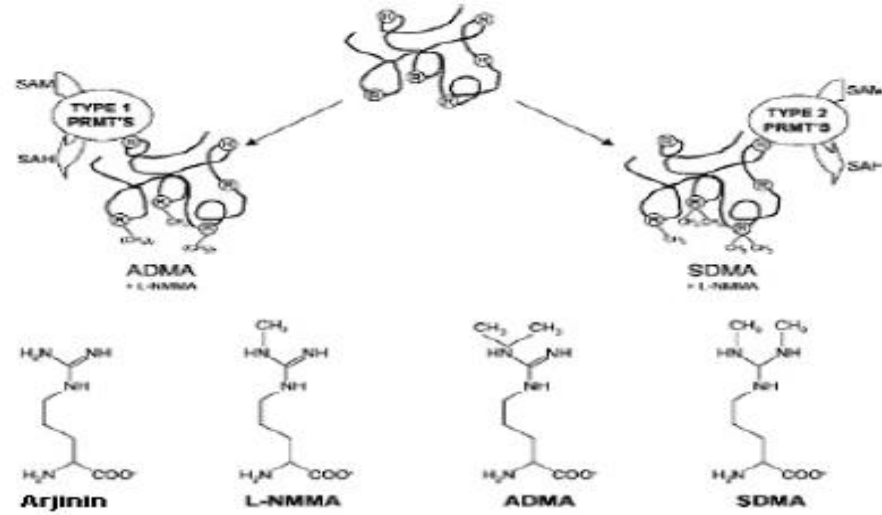


Şekil 2.11: eNOS genine ait polimorfizmler

2.6. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA)

1992 yılında Vallance ve arkadaşları ADMA'yı ilk olarak insan plazma ve idrarında NO sentazın endojen inhibitörü olarak tanımlamışlardır (12). ADMA, plazmada doğal olarak bulunan bir aminoasittir. ADMA, arjininin translasyon sonrası modifikasyona uğramış halidir (13).

ADMA, vasküler endotel hücreler de dahil birçok dokuda normal protein döngüsü sırasında arjinin kalıntılarının metilasyonu ile elde edilmekte ve dimetilarginin dimetilaminohidrolaz enzimi aracılığıyla sitriline metabolize olmaktadır (12, 92) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: Arjininin metillenmiş formları

Asimetrik dimetilarjinin, metillenmiş proteinlerin degradasyon ürünüdür. Proteinlerdeki arjininleri metilleyen protein arjinin metiltransferaz (PRMT) enzimi iki çeşittir; protein arjinin metiltransferaz tip 1 (PRMT-1) ve protein arjinin metiltransferaz tip 2 (PRMT2). PRMT-1 enzimi ile N-monometil-L-arjinin (L-NMMA) ve ADMA oluşur. PRMT-2 enzimi ile L-NMMA ve simetrik dimetilarjinin (SDMA) oluşur. Tip1 PRMT en çok rastlanılan tipidir ve kardiovasküler sistemde kalp, düz kas hücreleri ve endotelial hücrelerde bulunduğu gösterilmiştir. Tip 1 PRMT aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin nitrik oksit sentazı inhibe edebilme özelliği vardır. Tip 2 PRMT, SDMA oluşumunda rol oynar. SDMA'nın NOS'u inhibe etme özelliği yoktur. ADMA'nın büyük bir kısmı, yapıldığı hücrede hemen dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından yıkılmaktadır. Küçük bir kısmı ise hücre içi yıkımdan kaçarak kan dolaşımına girmektedir. Kan dolaşımına geçen bu küçük miktardaki ADMA, ya böbreklerden değişime uğramadan idrar ile atılmakta ya da başlıca karaciğer ve böbrekte olmak üzere tekrar hücre içine alınarak DDAH tarafından metabolize edilmektedir. DDAH, ADMA seviyelerini regüle etmede önemli rol oynar. SDMA

intravenöz olarak enjekte edilirse %60 oranında idrara çıkar, fakat ADMA intravenöz olarak enjekte edildikten sonra %5 oranında idrara çıkar. Bu nedenle renal yetmezlikte SDMA ADMA'ya göre plazmada çok daha yüksek seviyelerde bulunur. Yapılan araştırmalar ADMA'nın DDAH için substrat olduğunu, SDMA'nın olmadığını göstermiştir. ADMA'nın SDMA'ya göre yaygın bir metabolizmasının olduğu gösterilmiştir (93,94).

3 adet metilarjinin (ADMA, SDMA ve L-NMMA) Y taşıyıcı protein adı verilen katyonik aminoasit taşıyıcıları aracılığıyla endotel hücrelerin içine girerler. Metil arjininler birbirleriyle ve arjinin aminoasidi ile hücre içine giriş için yarışır. Yüksek konsantrasyondaki ADMA, L- Arjininin hücre içine transportunu engeller. Sonuç olarak NO sentezi azalır (95).

2.6.1. ADMA, Endotel ve Nitrik Oksit

Endotel hücreleri vasküler ağın içindeki tüm kan damarlarının iç yüzeyini kaplamaktadır. Vasküler homeostazın ana düzenleyicisi olan endotel; vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon, trombogenez ve fibrinoliz arasındaki dengeyi sağlar. Bu dengenin bozulması halinde endotel disfonksiyonu oluşur. Normal endotel fonksiyonlarının geniş spektrumu düşünüldüğünde, endotel disfonksiyonunu açıklayabilecek tek bir tanımlama mümkün değildir. Ancak en sık kabul edilen endotel disfonksiyon tanımlaması, damar lümen regülasyonundaki anormallikler olarak kabul edilmektedir. NO tarafınca düzenlenen asetilkoline veya hiperemiye verilen vazodilatatör cevabın küntleşmesi en çok kabul gören endotel disfonksiyon tanımlamasıdır. Vasküler tonusun sağlanması, birçok dilatatör ve konstriktor maddenin salgılanmasıyla düzenlenir. Vazodilatasyonun

bozulması ile gösterilen NO aktivitesindeki veya üretimindeki azalma aterosklerozun en erken bulgularından birisidir (96).

NO, endotel kaynaklı en önemli vazodilatördür. NO, L-arjinin aminoasidinden eNOS enzimi tarafından endotel hücre yüzeyine etki eden uyarıcılara yanıt olarak üretilir. Sağlam damar endoteli, bazal bir hız ile sürekli NO oluşturur. NO'nun vasküler düz kas proliferasyonuna, trombosit agregasyonu ve vasküler süperoksit üretimine olumlu etkileri olduğu gibi antiaterosklerotik özellikleride vardır. Serbest ADMA, eNOS'un endojen yarışmalı inhibitörüdür ve eNOS'un üretim ve biyoyararlanımını azaltmaktadır. Artan ADMA seviyesi NO sentezinde azalmaya neden olur. NO üretimindeki azalma, ateroskleroz gelişimine veya komplike olmasına yol açan olayların artması ile sonuçlanır. ADMA'nın NOS enzimini inhibe ettiği gösterilirken, ADMA'nın stereoizomeri olan SDMA'nın, NOS enzimini inhibisyonu gösterilememiştir. Yüksek konsantrasyondaki ADMA, NOS inhibisyonu yanı sıra L-Arjininin hücre içine transportunu engelleyerek de NO sentezini azaltır (95, 97,98,99).

Endotelial NOS sentezinde veya aktivitesinde azalma, oksijen türevi serbest radikallerin sentezinde artma endotel disfonksiyonuna neden olan faktörlerdir. ADMA ile oluşan endotel disfonksiyonu mekanizması vasküler NO elde edilebilirliğinin azalması ve vasküler süperoksit seviyelerinin artması ile olmaktadır (100).

Reaktif oksijen ürünleri, NO ile reaksiyona girerek NO'nun vasküler biyoyararlanımını azaltır ve hücre hasarını tetiklerler. Artmış oksidatif stres, bozulmuş endotel vazodilatasyon fonksiyonu ile ilişkilidir ve endotel disfonksiyonunun patogenezindeki ana mekanizma olarak kabul edilmektedir. Klasik ve klasik olmayan

risk faktörlerinin, endotel üstündeki etkilerinin son ortak yolu olduğu düşünülmektedir (101, 102).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya, Atatürk Üniv. Tıp Fak. Etik Kurul Başkanlığı'nın 22.05.2009 tarih ve 164 no.lu kararı ile etik kurul onayı alındıktan sonra başlandı.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Seçilmesi

Çalışmamıza, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Aziziye Süleyman DEMİREL Araştırma Hastanesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine baş vurup patolojik ve radyolojik tetkiklerden sonra akciğer kanseri tanısı konmuş ve yatarak tedavi alan 100 akciğer kanserli hastayı (Erkek:78, Kadın:22) dahil ettik. Bu hasta grubunun akciğer kanseri sınıflandırılması Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır. Hastaların sigara içme durumları, cinsiyetleri ve yaşları hasta dosyalarından temin edilmiştir. Çalışmamızda yer alan ve 100 kişiden oluşan kontrol grubu; hasta grubun yaş ortalaması (63.6 ± 8.1) göz önüne alınarak bu ortalamaya yakın (62.05 ± 9.34) yaşlara sahip ve herhangi bir kronik hastalığı olmayan sağlıklı gönüllülerden seçildi.

3.1.2. Numunelerin Toplanması

Hasta ve sağlıklı kontrol grubundan bir kereye mahsus olmak üzere polimorfizm tespiti için 6 mL venöz kan alınarak 3'er mL olacak şekilde antikoagülan olarak EDTA içeren tüplere alıgotlandı. Alıgotlanan numuneler çalışma gününe kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

3.1.3. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Tablo 3.1:Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemeler

Alet/Cihaz	Marka
Derin Dondurucu (-80 °C), Derin Dondurucu (-20 °C)	Sanyo Ultra Low, Sanyo Electric Co Ltd, Arçelik, Türkiye
Spektrofotometre	Cecil CE 304 UV ve Beckman DU 500
Laminar Flow Kabin	Nüve LN 120, Türkiye
Mikrosantrifüj	Mikro 200 Hettich, Germany
Mikro Otomatik Pipetler	Eppendorf, Finnpiette, Medispes plus
Termomikser	Thermomixer Comfort Eppendorf, Germany
Elektroforez Sistemleri	
Tank	Biometra Agagel Midi
Translüminatör	
Güç Kaynağı	Biometra BDA Digital
Vorteks Yellov Line TTS2	Biometra High Voltage Power Pack P30 IKA, USA
Farklı Boyutlarda Filtreli Pipet Uçları	Biosphere filter tips, Nümbrecht, Germany
PCR Tüpleri (DNAaz ve RNAaz free)	Axygen, Union City, USA
Pudrasız Tek Kullanımlık Eldivenler	Aldrich, Malasia
UV Küvetler	Plastbrand, Germany
Otoklav	Hmc-Hırayama, Japan.
Olympus BX51 floresan mikroskobu	Olympus Europa, Germany
Hassas Terazi	Denver Instrument, Germany
Saf Su Cihazı	Mes mp minipure, Türkiye
Su Banyosu	Kotterman, Germany
Magnetik Karıştırıcı	Fisher,USA ve Yellowline MSH Basic, Germany
HPLC	Agilent Modüler Sistem

Tablo 3.2:Kullanılan kit ve kimyasal maddeler

Kimyasal Malzeme veya Reaktif Adı	Temin Edildiği Firma
CVD StripAssay A Kiti	ViennaLab Diagnostics
Lysis Solution	ViennaLab Diagnostics
GENXTRACT Resin	ViennaLab Diagnostics
Taq Dilution Buffer	ViennaLab Diagnostics
DNAT	ViennaLab Diagnostics
Typing Trays	ViennaLab Diagnostics
Test Strips	ViennaLab Diagnostics
Hybridization Buffer	ViennaLab Diagnostics
Wash Solution A	ViennaLab Diagnostics
Conjugate Solution	ViennaLab Diagnostics
Wash Solution B	ViennaLab Diagnostics
Color Developer	ViennaLab Diagnostics
EUROIMMUN Immunfluorescence test kiti	Euroimmun, Germany
Etanol (%96–100)	Merck
Agaroz	Sigma

3.2. Yöntemler

Hasta ve kontrol grubundan alınan kan örneklerinden eNOS T-786C ve eNOS G894T polimorfizmlerinin tespiti yapıldı. Bunun için ticari olarak elde edilen CVD stripAssay A kiti (Viennialab Diagnostics; Vienna, Austria) kullanıldı. Bu kitte polimorfizm analizi için üç aşama bulunmaktadır; DNA izolasyonu, biotinlenmiş primerlerin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve amplifikasyon ile amplifikasyon ürünlerinin revers–hibridizasyonu.

3.2.1. Polimorfizm Analizi

3.2.1.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için daha önce -80°C 'de depolanmış olan EDTA'lı venöz kan örnekleri kullanıldı. Çalışmaya başlamadan bir gün önce numuneler -20°C 'lik dolaba transfer edildi ve çalışma günü $+4^{\circ}\text{C}$ 'lik dolapta çözündü. Daha sonra numunelere aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı;

- i. 100 μL tam kan örneği 1.5 mL 'lik steril mikrotüplere alındı.
- ii. Numunelerin üzerine 1 mL lizis çözeltisi eklendi ve tüpün ağzı kapatılarak karıştırıldı, daha sonra 15 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
- iii. 3000 rpm (yaklaşık 1000 g) 5 dk. santrifüj edildikten sonra üstteki süpernatant kısımdan 1 mL alınarak atıldı.
- iv. Tüpün altında kalan pellet kısmına 1 mL lizis çözeltisi eklenerek birkaç kez karıştırıldı.
- v. Karışım 12000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
- vi. Pellete 200 μL GEN^XTRACT resin çözeltisinden eklenerek 10 sn. vortekslendi.
- vii. 56°C 'de 20 dakika, 98°C 'de 20 dk. inkübe ettikten sonra 12000 rpm de 5 dk santrifüj edildi.

PCR'da kullanılacak DNA'yı içeren süpernatant PCR işlemine kadar $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

3.2.1.1.1. DNA Saflık Tayini ve Konsantrasyonunun Hesaplanması

DNA konsantrasyonları ve saflık dereceleri, quartz küvette, 195 μL saf su + 5 μL süpernatant olacak şekilde, 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapılarak belirlendi. A_{260}/A_{280} oranının 1.7-1.8 olması PCR analizinde kullanılabilir.

saflık derecesi olarak kabul edildi. DNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{DNA konsantrasyonu (ng/}\mu\text{L)} = A_{260} \times 50 \times \text{seyreltme faktörü}$$

3.2.1.2. İn Vitro Amplifikasyon (PCR)

PCR işleminde, termal siklus programı başlayıncaya kadar, tüm basamaklar buz üzerinde yapıldı ve PCR reaktifleri ile DNA örnekleri donmuş halde tutuldu. Taq Dilüsyon Buffer'de Taq DNA Polimeraz'ın taze bir dilüe örneği hazırlandı (0.2 U/ μ L). Amplifiye edilecek her bir örnek için bir reaksiyon tüpü, buz üzerine yerleştirildi.

PCR reaksiyon karışımı şu şekilde oluşturuldu:

- 15 μ L Amplifikasyon Mix
- 5 μ L dilüe Taq DNA Polimeraz (1 U DNA polimeraz + 4 mL dilüent)
- 5 μ L DNA Template

Thermocycler 94 °C'ye ısıtıldı. Reaksiyon tüpleri bölmelere yerleştirildi ve aşağıdaki PCR programı uygulandı:

- Pre-PCR : 94 °C/2 dakika
- Thermocycling: 94 °C/15 saniye, 58 °C/30 saniye, 72 °C/30 saniye (35 siklus)
- Final ekstansiyonu: 72 °C/3 dakika

Elde edilen amplifikasyon ürünleri 2-8 °C'de saklandı.

3.2.1.3. Amplifikasyon Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroförezinde

Analizi

%3'lük agaroz jel hazırlandı. Mikrodalga fırında ısıtılarak hazırlanan agaroz jele, 0.5 µg/mL olacak şekilde, etidyum bromür eklendi ve elektroförez tepsisine döküldü. Uygun dişli tarak jele yerleştirilerek 24 saat boyunca +4 °C'de tutuldu. Bu şekilde donması sağlanan jel, yükleme noktası (-) kutba yakın olacak biçimde elektroförez sistemine konuldu. ½ x TBE (Tris, Borik asit, EDTA) tamponu, jelin üstünü kapatacak şekilde elektroförez tankına eklendi. 6X yükleme tamponu ile DNA belirteci ve amplifikasyon ürünleri jel üzerinde bulunan kuyucuklara sırası ile yerleştirildi. Sisteme 5 volt/cm voltaj, 2 saat boyunca verildi ve numuneler jel üzerinde yürütüldü.

3.2.1.4. Hibridizasyon

Hibridizasyon işleminden önce; Su banyosunun su yüksekliği Typing Tray'ın yüksekliğinin yarısı olacak şekilde ayarlandı ve sıcaklık 45 °C'ye ayarlandı, daha sonra hibridizasyon tamponu ve yıkama çözeltisi A'nın sıcaklıkları 45 °C'ye getirildi. Böylece 2-8 °C'de oluşan presipitantların çözünmesi sağlandı. Test stripleri, renk oluşturucular yıkama çözeltisi B, DNAT ve konjugat çözeltilerinin oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Son olarak her bir örnek için test stripi çıkarıldı ve etiketlendi.

Hibridizasyon işlemi için aşağıdaki prosedür uygulandı:

- i. 10 µL DNAT, striplerin yerleştirildiği pleyttteki kuyucukların köşelerine pipetlendi.
- ii. 10 µL amplifikasyon ürünü eklendi ve karıştırıldı. Karışım 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi.

- iii. Karışım, önceden 45°C 'ye yükseltilmiş hibridizasyon tampondan 1 mL eklendi ve mavi renk kaybolup solüsyon homojen bir hal alıncaya kadar yavaşça çalkalandı.
- iv. Striplerin işaretlenmiş yüzeyleri yukarı bakacak şekilde kuyucuklara yerleştirildi ve 45°C 'lik su banyosunda 30 dk. inkübe edildi.
- v. İnkübasyondan sonra hibridizasyon tamponu kuyucuklardan vakumlanarak uzaklaştırıldı.

3.2.1.5. Yıkama İşlemi

- i. Kuyucuklara 1 mL yıkama çözeltisi A dan eklendi ve 10 sn. hafifçe karıştırıldı. Yıkama çözeltisi vakumla uzaklaştırılarak tekrar 1 mL eklendi ve 15 dk. 45°C 'de inkübe edildi.
- ii. Yukardaki işlemin aynısı tekrarlandı ve bu işlemden sonraki tüm işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

3.2.1.6. Renklendirme İşlemi

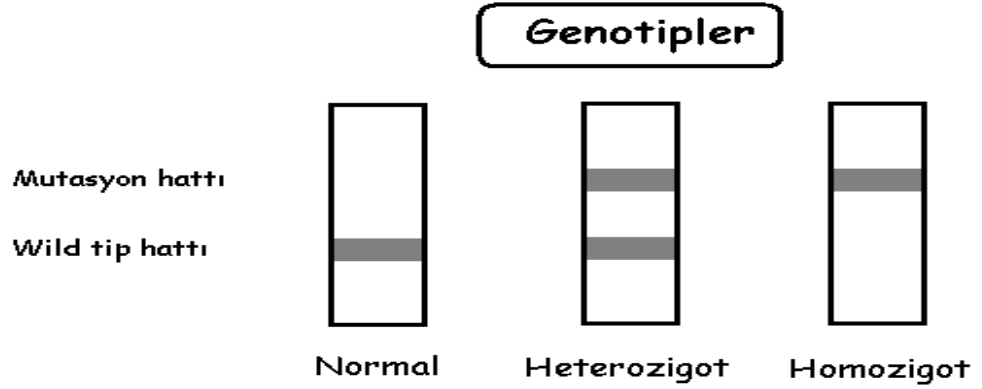
Renklendirme için aşağıdaki prosedür uygulandı:

- i. 1 mL konjugat çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk. orbital karıştırıcıda inkübe edildi.
- ii. Konjugat çözeltisi vakumla uzaklaştırıldı ve boş kuyucuklara 1 mL yıkama çözeltisi B eklendi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
- iii. Yıkama solüsyonu vakumla uzaklaştırıldı ve yeniden yıkama solüsyonu B eklenerek 5 dk. daha inkübe edildi.

- iv. Yıkama solüsyonu tekrar vakumla uzaklaştırıldı ve 1 mL renklendirici çözelti eklendi.
- v. Karanlıkta 15 dk. inkübe edildi. Stripler kuyucuklardan çıkarılarak kurutma kağıdı ile kurutuldu ve striplerin değerlendirme işlemi yapıldı.

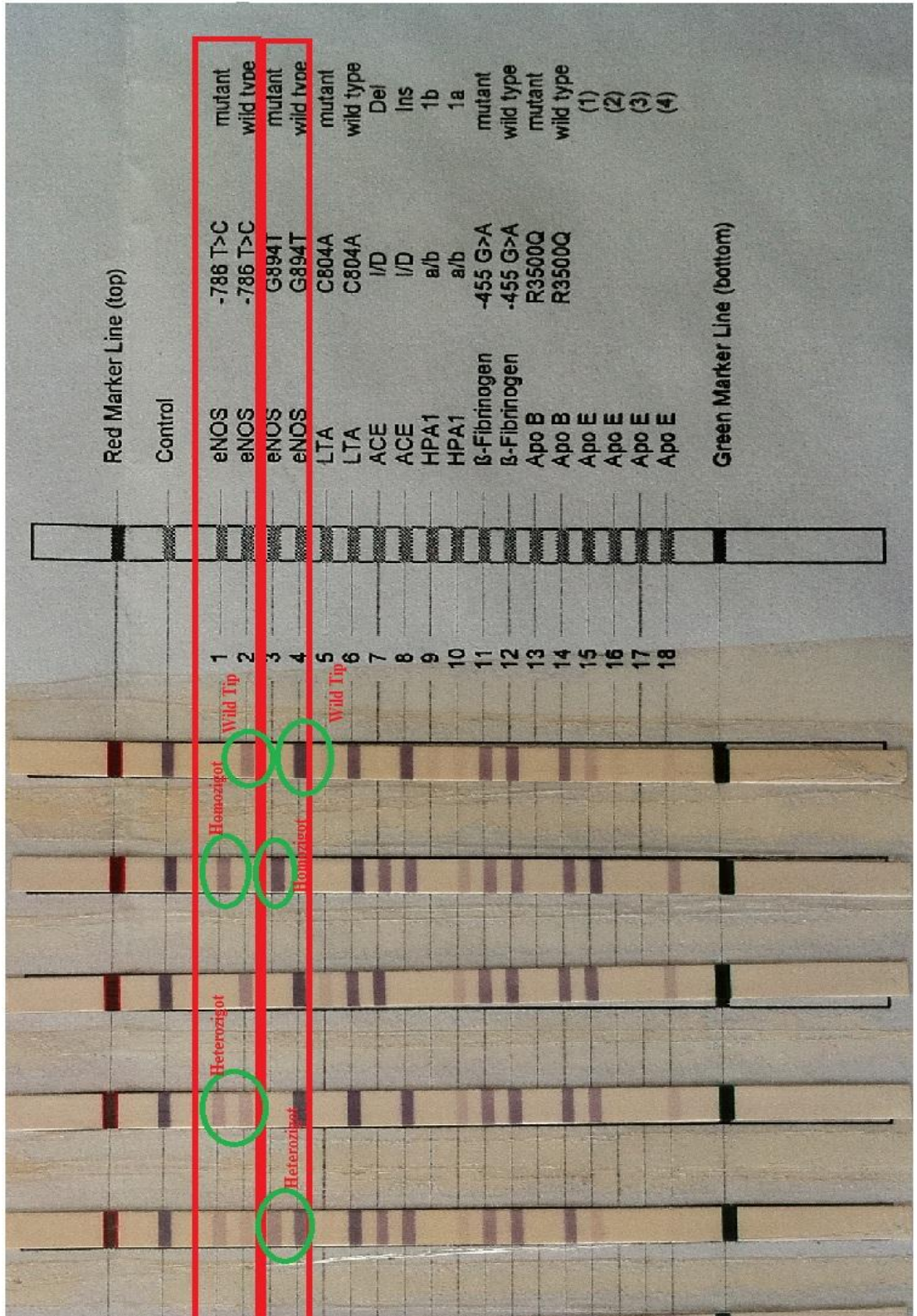
3.2.1.7. Striplerin Değerlendirilmesi

Renklendirme işlemlerinin ardından, striplerde wild tip ve/veya mutasyon bantları ortaya çıktı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Striplerde oluşan Wild Tip ve mutasyon bantları

Striplerde yalnızca wild tip bandının oluşması normal; hem wild tip hem de mutasyon bandının oluşması heterozigot; sadece mutasyon bandının oluşması ise homozigot genotip olarak değerlendirildi. Birkaç örneğin değerlendirilmesi aşağıda şekil 3.2’de görülmektedir.



Şekil 3.2: Polimorfizmlerin stripte değerlendirilmesi

3.2.2. NO Ölçümü

NO son derece kısa yarı ömürlü bir molekül olduğu için NO ölçümünde stabil son ürünleri olan nitrat ve nitrit ölçülmektedir. Nitrat + nitrit konsantrasyonunun belirlenmesinde, nitratlar nitrat redüktaz enzimi ile nitrite redüklenmekte ve toplam nitrit ölçümü yapılmaktadır. Nitrit ölçümü Griess reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik bir ölçümdür (58). Griess reaktifinde bulunan H_3PO_4 ile nitrit reaksiyona girer ve nitroz asit meydana gelir. Nitroz asit sulfanilamid ile reaksiyona girerek diazobenzosülfonik asiti meydana getirir. Bu da ortamda bulunan naftiletilendiaminle koyu pembe renkli bir bileşik (azo bileşiği) verir, bu bileşiğin renk şiddeti spektrofotometrede ölçülmektedir.

3.2.2.1. NO Ölçümü İçin Gerekli Çözeltiler

- 1- $ZnSO_4$: 30 gr $ZnSO_4$ bir miktar distile suda çözülerek son hacim 100 mL'ye tamamlanır.
- 2- Griess reaktifi: 0,5 gr sulfanilamide + 12,5 gr meta-fosforik asit + 0,050 gr N-1 naftiletilendiamin bir miktar distile suda çözülerek son hacim 500 mL'ye tamamlanır.
- 3- NADPH+FADH+1 kutu nitrat redüktaz karışımı 50 mL distile su içinde 0,004 gr NADPH (50 $\mu\text{mol/L}$) + 0,0004 gr FAD (5 $\mu\text{mol/L}$) çözülür. Bu sıvı pipetle çekilir ve 1 kutu Nitrat redüktaz (200 U/L) şişesine boşaltılır tekrar geri çekilir aynı karışıma eklenir.
- 4- Laktat Dehidrogenaz: 10 mL distile suda 10 mg LDH çözülür. (Deney ortamında son hacimde)

5- Sodyum piruvat 10 mM: Piruvik asit sodyum tuzundan 1,1 gr alınarak 10 mL distile suda çözülür (Deney ortamında son hacimde) .

6- Meta-Fosforik asit: 25 gr /L. Numune körü olarak griess reaktifi yerine kullanılır. 2,5 gr meta fosforik asit 100 mL distile suda çözülür.

7- Sodyum nitrit (NaNO₂): Standart olarak 0-200 µmol/L aralığında olacak şekilde hazırlanır. 0,690 gr sodyum nitrit alınır ve 100 mL distile suda çözülür. Bundan 10 µL olarak üzerine 9990 µL distile su eklenir. Bunun konsantrasyonu 200 µM'dır. Bu solüsyondan bir seri dilüsyonla altı standart hazırlanır. 7. basamaktan itibaren reaksiyon ortamına standart olarak eklenir.

3.2.2.2. Çalışmanın Yapılışı

Nitrat önce nitrat redüktaz ile nitrite enzimatik olarak dönüştürüldü. Bunun için plazma örneği (100 µL) distile su (400 µL) ile 4 kat dilüe edildi. Üzerine 500 µL NADPH, FAD ve Nitrat redüktaz karışımı pipetlenerek karanlıkta 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Karışıma 10 µL LDH ve son hacimde 10 mM olacak şekilde sodyum piruvattan 10 µL eklendi nazikçe karıştırıldı ve karanlıkta 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Deproteinizasyon işlemi için 50 µL ZnSO₄ inkübe edilen numune karışımına pipetlendi. 1000 rpm de 15 dakika santrifüj edildi ve üst fazdan 125 µL mikroplate kuyucuklarına konarak üzerine 125 µL Griess reaktifi eklendi. Ayrıca her numune için numune körü alındı. Bunun için griess reaktifi yerine hazırlanan meta fosforik asit konuldu. 8-10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 540 nm dalga boyunda ELISA mikroplate reader'de okutuldu. Standart grafik için 0-100 µmol/L aralığında konsantrasyonu olacak şekilde sodyum nitrit standart olarak hazırlandı.

3.2.3. ADMA Analizi

ADMA analizi ticari olarak elde edilen high-pressure liquid chromatography (HPLC) yöntemine dayalı kit ile çalışıldı. İlk önce plazma örnekleri katı faz ekstraksiyonuyla ekstrakte edildi. Bunun için kitte mevcut olan katı faz kolonu kullanıldı. Daha sonra ekstraksiyondan elde edilen ekstrakte 200µL reagent N (tampon çözelti), 150µL (tampon çözelti), 30µL reagent J (başlama çözelti), 30µL reagent L (derivat çözelti) ilave edilerek 20°C'de 30dk inkübe edildi. 150 µL HPLC grade su ilave edilerek HPLC sistemine verildi.

Kromatografik Koşullar:

- i. Akış hızı: 1mL/dk
- ii. Enjeksiyon hacmi: 100µL
- iii. Kolon: 250mm x 4,6 mm, 5µ yarıçaplı kolon
- iv. Floresans dedektör 420nm ekstasyon, 483nm emisyon
- v. Kolon basıncı: 90± 10 barr
- vi. Analiz süresi: 25 dk

Tekrarlanabilirliği: >%98

Sensitivitesi: <0.05 µmol/L ADMA

Linearite: >16 µmol/L ADMA

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda verilerin istatistiksel analizi IBM-SPSS 19.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin dağılımlarına Kolmogorov Smirnov testi ile bakıldı.

Sayısal değişkenler normal dağıldığı için, iki grup arasındaki farkların değerlendirilmesi Sample-T ile 3 ve daha fazla grup arasındaki farkın değerlendirilmesi ONEWAY-ANOVA testi ile yapıldı. Katagorik verilerin analizi için X^2 (Chi-square) testi kullanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.

4. BULGULAR

Akciğer kanserli hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubuna ait demografik özellikler tablo 4.1’de verilmiştir. Hasta grubu ve kontrol grubu yaş ortalamaları ve cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p >0.05$). Sigara içenlerin oranı hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ($p <0.05$).

Tablo 4.1: Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri

	Akciğer kanserli hastalar N=100	Sağlıklı kontrol grubu N=100	P değeri
Yaş (X±SD)	63.66±8.10	62.05±9.34	0.204
Cinsiyet			
Erkek	78 (%78)	66 (%66)	0.059
Kadın	22(%22)	34 (%34)	0.059
Sigara içme Durumu			
İçmiyor	6 (%6)	27 (%27)	0.01
İçiyor	94(%94)	73(%73)	0.01

Çalışmamızda yer alan akciğer kanserli hastalar ve kontrol grubu arasındaki eNOS T-786C promoter gen bölgesindeki TT, TC, CC polimorfizmlerinin ve eNOS G894T ekson 7 gen bölgesindeki GG, GT, ve TT polimorfizmlerinin dağılımı tablo 4.2’de verilmiştir. Gruplar arasında bu polimorfizmlerin dağılımında herhangi bir istatistiksel fark tespit edilmedi ($p >0.05$).

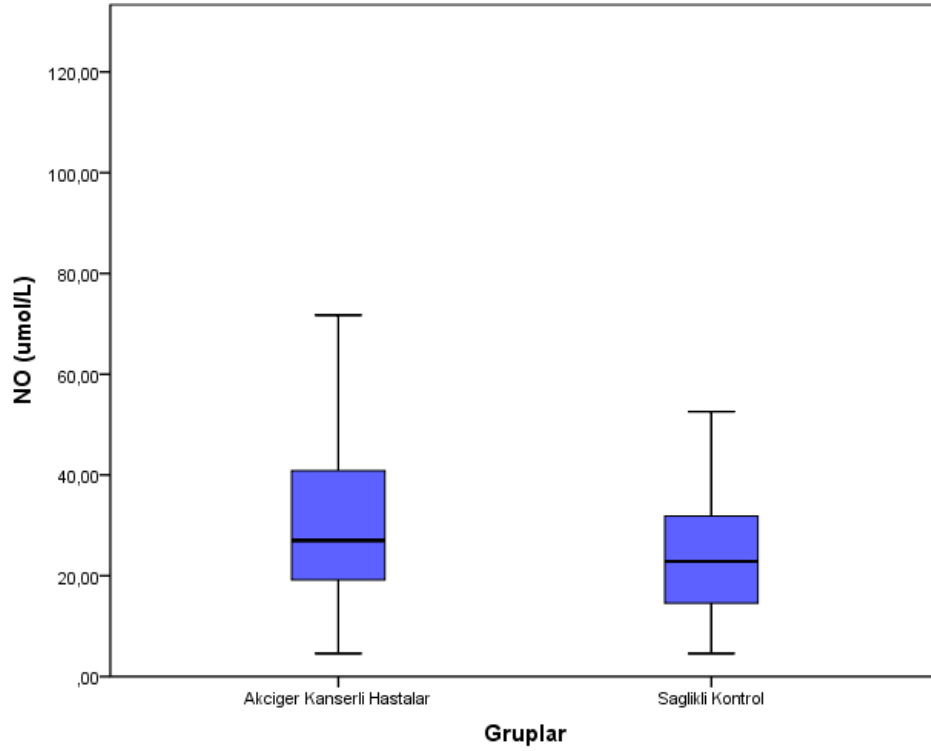
Tablo 4.2:Hasta ve kontrol grubunda eNOS T-786C ve G894T polimorfizmlerinin dağılımı.

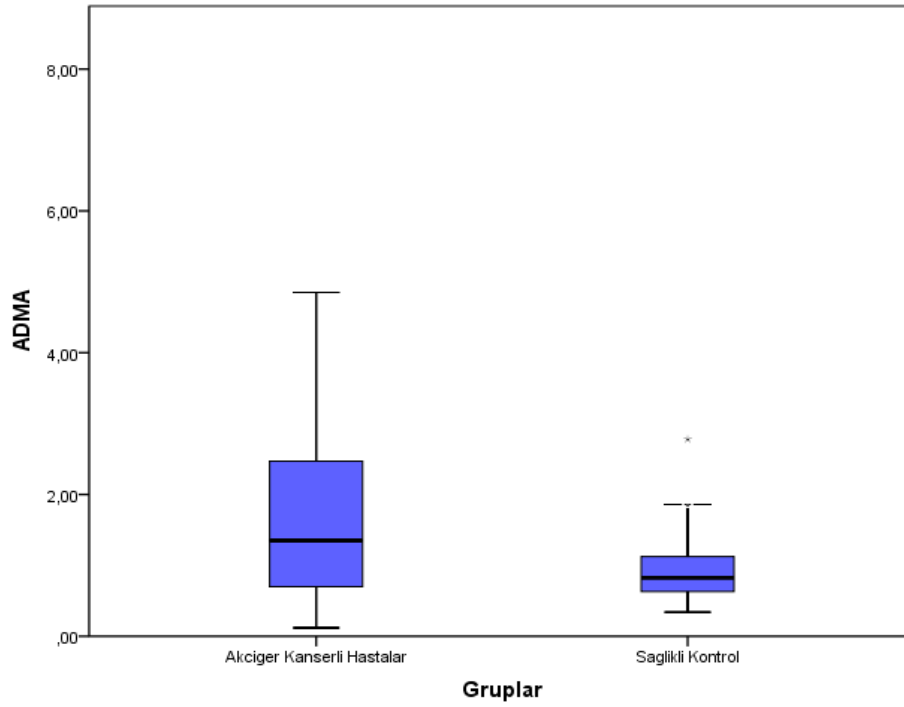
	Akciğer Kanserli Hastalar N=100	Sağlıklı Kontrol Grubu N=100	P değeri
eNOS T-786C			
TT	42 (%42)	53 (%53)	
TC	47 (%47)	39 (%39)	0.288
CC	11(%11)	8 (%8)	
Allel Frekansı			
T alleli	0.655	0.725	
C alleli	0.345	0.275	
eNOS G894T			
GG	56 (%56)	60(%60)	
GT	34(%34)	31(%31)	0.848
TT	10 (%10)	9 (%9)	
Allel Frekansı			
G alleli	0.73	0.755	
T alleli	0.27	0.245	

Akciğer kanserli hastalar ve kontrol grubunda ölçtüğümüz ADMA ve NO seviyeleri aşağıdaki tabloda verilmiştir. Her iki parametre için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p<0.05$).

Tablo 4.3: Akciğer kanserli hastalar ve kontrol grubunda ADMA ve NO seviyeleri.

	Akciğer Kanserli Hasta N=100 ($\bar{X}\pm SD$)	Sağlıklı Kontrol N=100 ($\bar{X}\pm SD$)	p Değeri
ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	1.72 \pm 1.27	0.94 \pm 0.45	0.000
NO ($\mu\text{mol/L}$)	30.95 \pm 18.20	24.03 \pm 12.61	0.011

**Şekil 4.1:** Gruplar arasındaki NO dağılımı

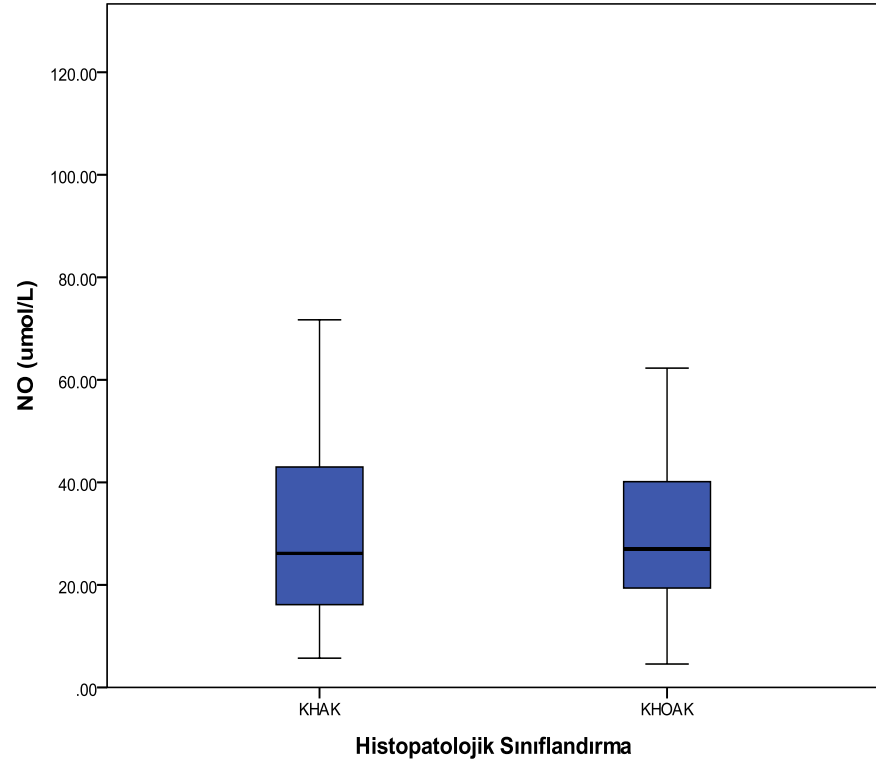


Şekil 4.2: Gruplar arasındaki ADMA dağılımı

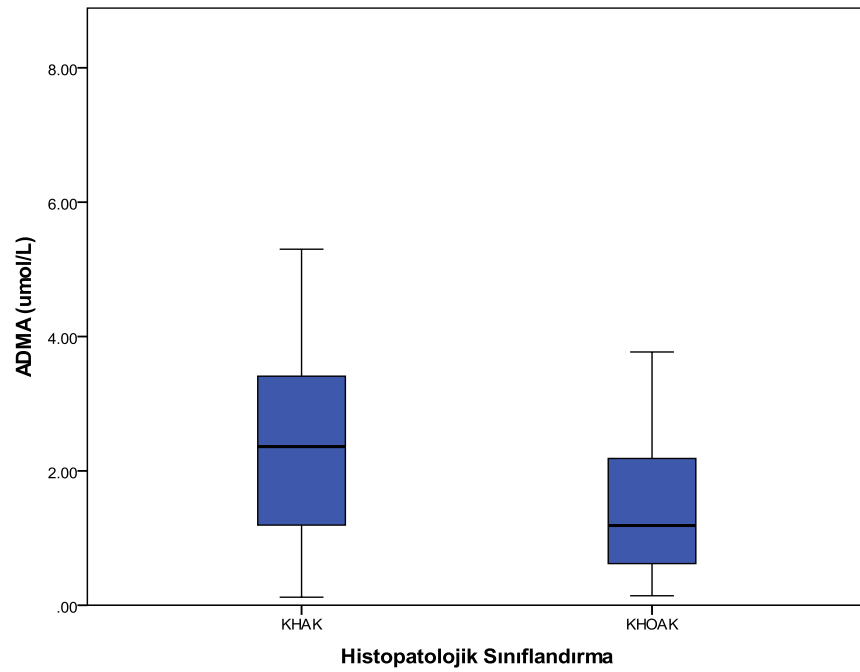
Akciğer kanserli hastalarda sınıflandırılması baz alınarak ADMA ve NO seviyelerinin istatistiksel analizi aşağıdaki tabloda verilmiştir. ADMA seviyeleri KHAK'da KHDAK'ya oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu.

Tablo 4.4: Histopatolojik sınıflandırmaya göre ADMA ve NO seviyeleri dağılımları

Sınıflandırma			
	KHAK (N=24) ($\bar{X} \pm SD$)	KHDAK (N=76) ($\bar{X} \pm SD$)	p değeri
ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	2.51 \pm 1.68	1.47 \pm 1.01	0.01
NO ($\mu\text{mol/L}$)	30.65 \pm 19.25	31.04 \pm 17.99	0.93



Şekil 4.3: Histopatolojik sınıflandırmaya göre NO seviyeleri dağılımı



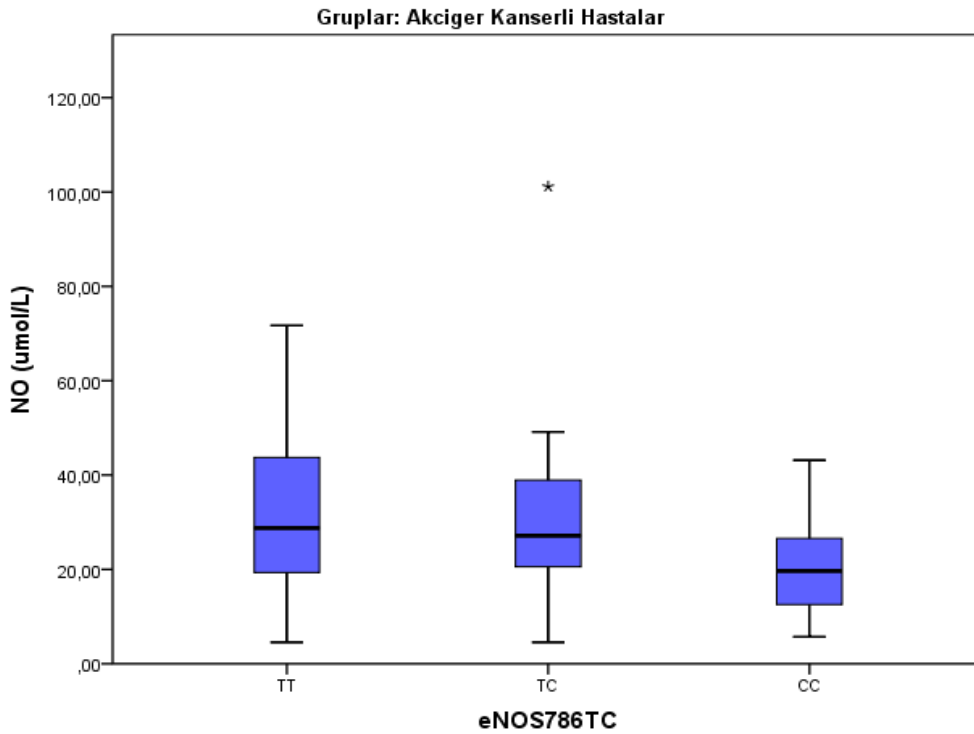
Şekil 4.4: Histopatolojik sınıflandırmaya göre ADMA seviyeleri dağılımı

eNOS T-786C promoter gen bölgesinde bulunan polimorfizmlere göre ADMA ve NO seviyelerinin dağılımları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

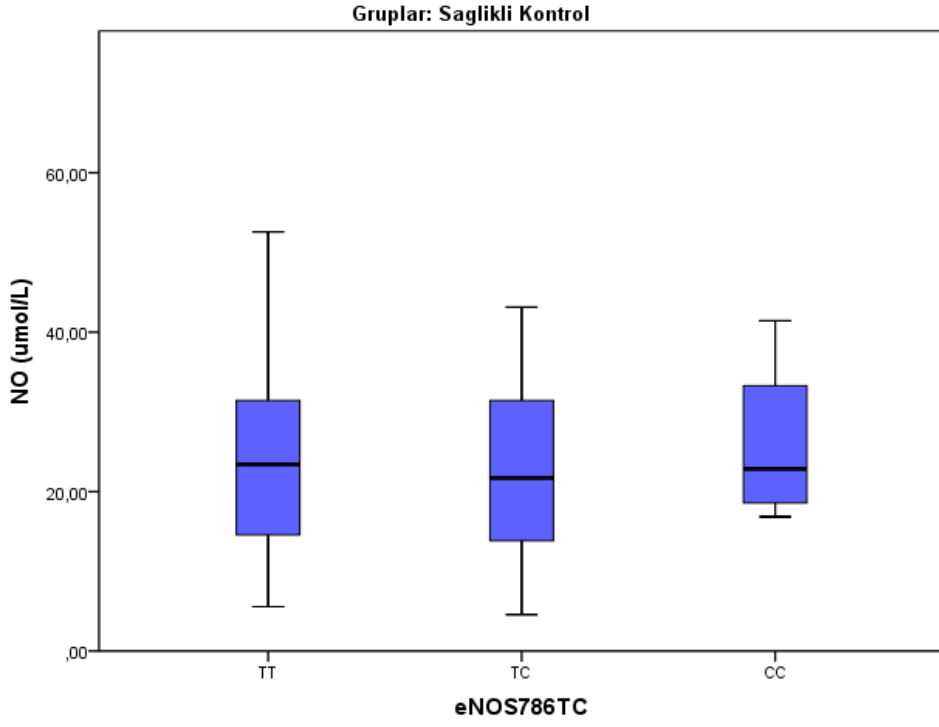
Tablo 4.5:eNOS T-786C polimorfizmlerine göre gruplardaki ADMA ve NO seviyeleri

eNOS T-786C	Akciğer Kanseri Hastalar N=100			Sağlıklı Kontrol N=100			Toplam N=200		
	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	N	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	N	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	N
TT	31.45 \pm 17.22	1.51 \pm 1.18	42	24.35 \pm 12.98	0.84 \pm 0.35	53	27.49 \pm 15.33	1.14 \pm 0.89	95
TC	32.76 \pm 19.73	1.45 \pm 1.05	47	23.2 \pm 12.41	0.84 \pm 0.35	39	28.42 \pm 17.39	1.17 \pm 0.85	86
CC	21.29 \pm 12.44	3.62 \pm 0.89*	11	25.96 \pm 9.09	2.06 \pm 0.37*	8	23.26 \pm 11.12	2.96 \pm 1.06*	19

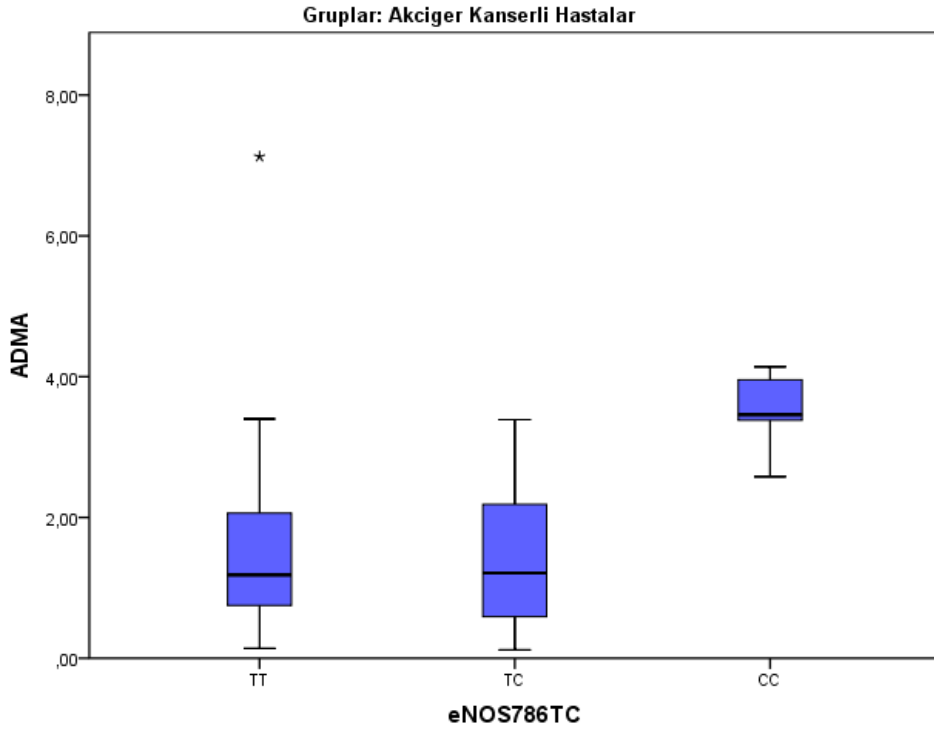
*: CC alleli taşıyanların ADMA seviyeleri diğer iki tipten istatistiksel olarak anlamlı yüksek ($p<0.05$)



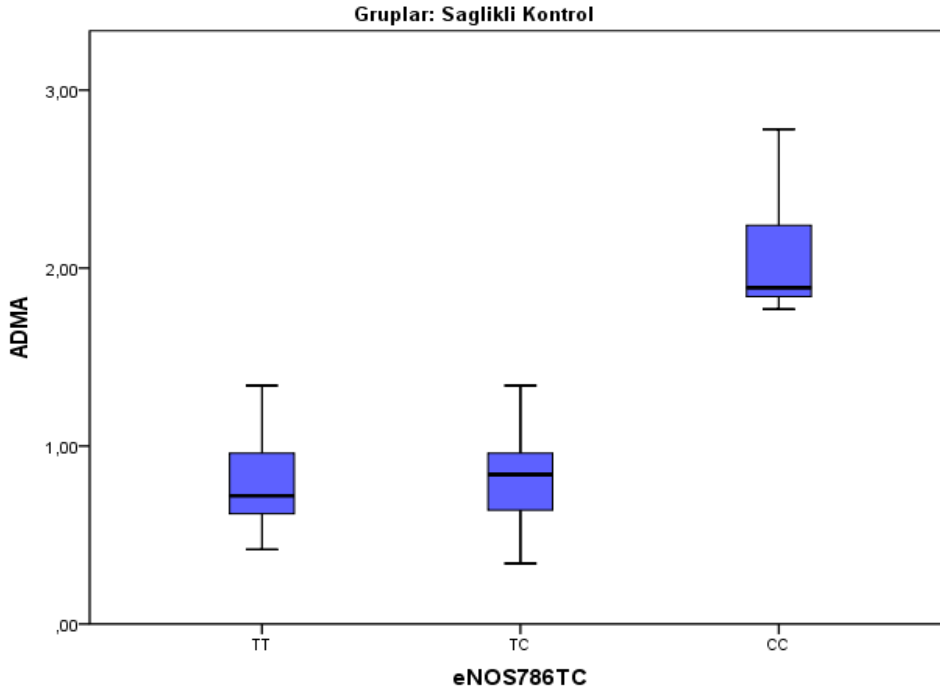
Şekil 4.5: Hasta grubunda eNOS T-786C polimorfizmine göre NO dağılımı



Şekil 4.6: Sağlıklı kontrol grubunda eNOS T-786C polimorfizmine göre NO dağılımı



Şekil 4.7: Hasta grubunda eNOS T-786C polimorfizmine göre ADMA düzeyleri



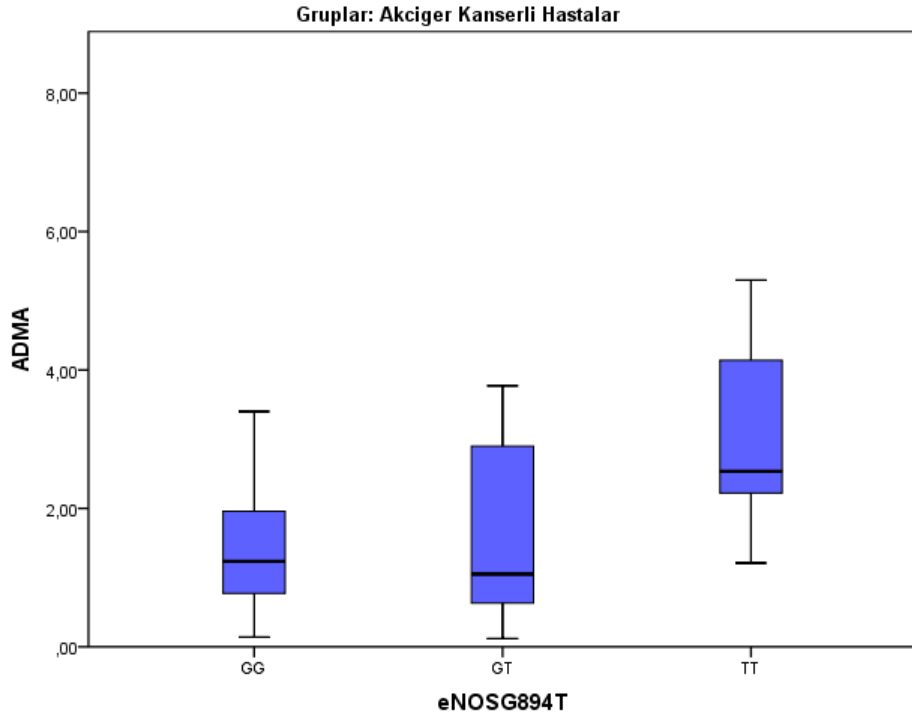
Şekil 4.8: Sağlıklı grupta ADMA düzeyleri

eNOS geninin eNOS G894T ekson 7 gen bölgesinde bulunan polimorfizmlere göre ADMA ve NO seviyelerinin dağılımları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

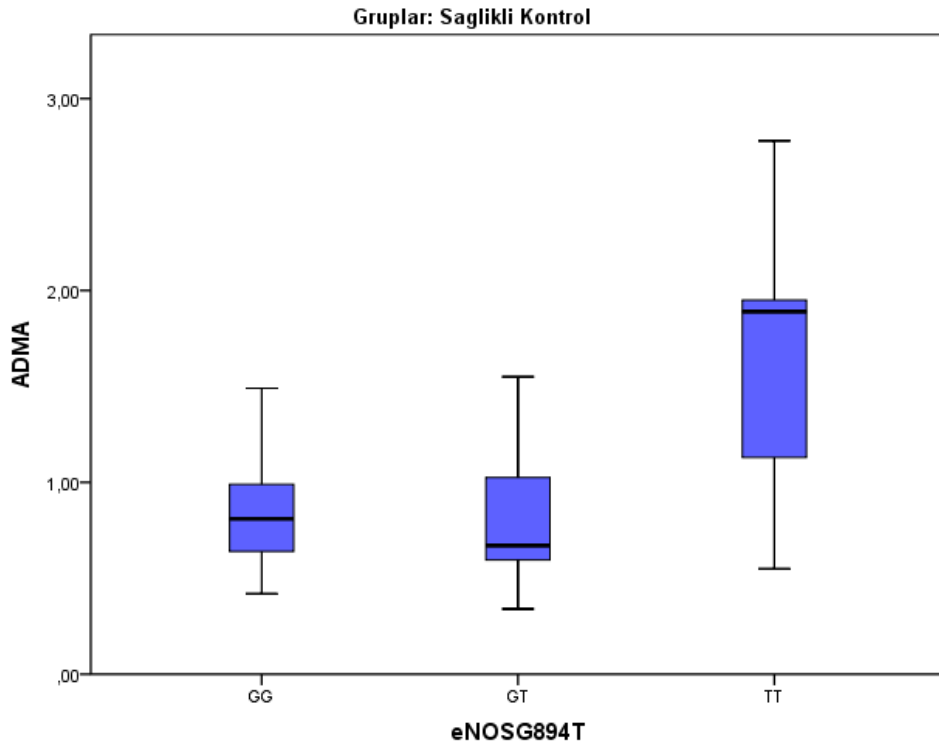
Tablo 4.6:eNOS G894T polimorfizmlerine göre gruplarda ADMA ve NO seviyeleri

eNOS	Akciğer Kanserli Hastalar		Sağlıklı Kontrol		Toplam				
G894T	N=100		N=100		N=200				
	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ADMA ($\mu\text{mol/L}$)			
	N		N		N				
GG	56	31.01 \pm 17.4	1.44 \pm 0.92	60	23.55 \pm 13.6	0.87 \pm 0.32	116	27.15 \pm 15.93	1.15 \pm 0.73
GT	34	31.18 \pm 18.82	1.78 \pm 1.52	31	24.02 \pm 11.06	0.85 \pm 0.38	65	27.77 \pm 15.9	1.34 \pm 1.21
TT	10	29.77 \pm 22.02	3.06 \pm 1.32*	9	27.23 \pm 8.29	1.69 \pm 0.76*	19	28.57 \pm 16.69	2.41 \pm 1.27*

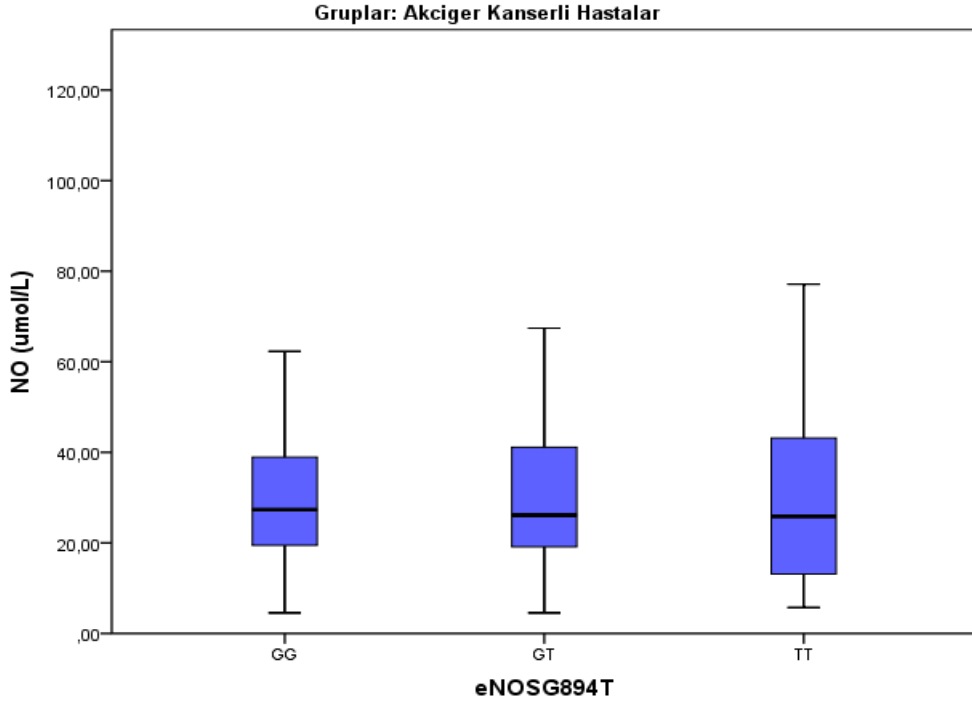
*: TT alleli taşıyanların ADMA seviyeleri diğer iki tipten istatistiksel olarak anlamlı yüksek ($p<0.05$)



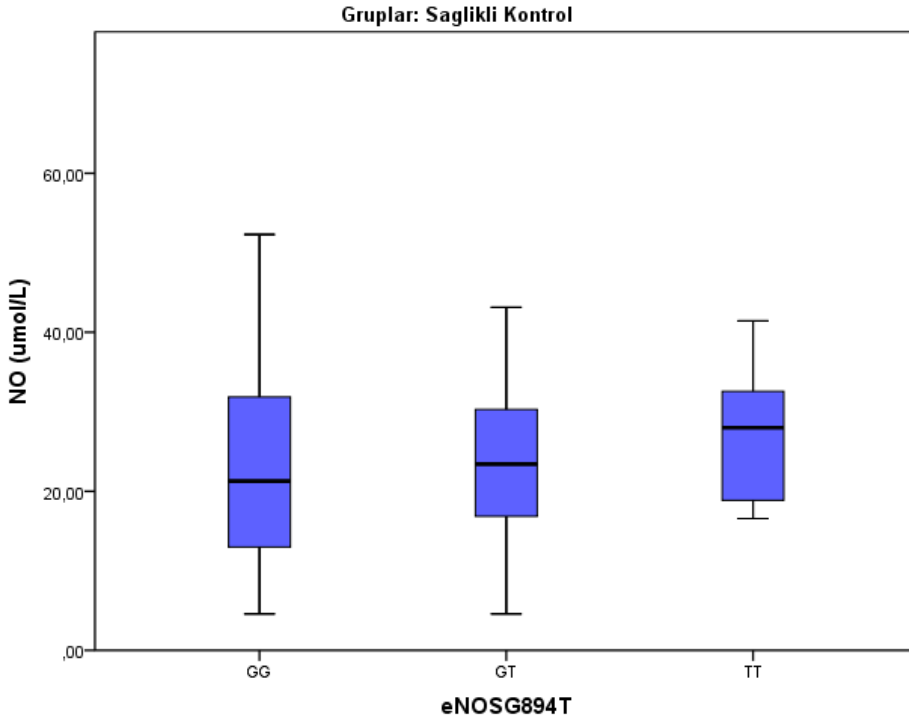
Şekil 4.9: eNOS G894T polimorfizmlerine göre hasta grubunda ADMA seviyeleri



Şekil 4.10: eNOS G894T polimorfizmlerine göre sağlıklı grupta ADMA seviyeleri



Şekil 4.11: eNOS G894T polimorfizmlerine göre hasta grubunda NO seviyeleri



Şekil 4.12: eNOS G894T polimorfizmlerine göre sağlıklı grupta NO seviyeleri

Aşağıdaki tabloda akciğer kanserli hastaların sınıflandırmalarına göre eNOS gen polimorfizmi açısından dağılımı görülmektedir. Yapılan analizde sınıflandırmaya göre eNOS T-786C promoter gen bölgesindeki polimorfizmler açısından TT, TC ve CC genotipindeki bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p=0.041$). Bununla birlikte eNOS G894T ekson 7 gen bölgesindeki polimorfizmler açısından GG, GT ve TT genotipindeki bireylerde sınıflandırma bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p=0.107$).

Tablo 4.7:Hasta grubunda histopatolojik sınıflandırmaya göre eNOS T-786C ve eNOS G894T polimorfizm dağılımları

Akciğer Kanserli Hastalar		
	KHAK	KHDAK
eNOS T-786C		
TT	9 (%37.5)	33(%43.4)
TC	9(%37.5)	38(%50)
CC	6(%25)	5(%6.6)
Allel Frekansı		
T alleli	0.562	0.684
C alleli	0.437	0.315
eNOS G894T		
GG	13(%54.2)	43(%56.6)
GT	6(%25)	28(%36.8)
TT	5(%20.8)	5(%6.6)
Allel Frekansı		
G alleli	0.666	0.75
T alleli	0.333	0.25

5. TARTIŞMA

Kanser sık görülen önemli mortalite, morbiditeye sebep olan ve ekonomik olarak yük oluşturan bir sağlık problemidir. Kanser oluşumu genetik, çevresel ve diyetsel maddelerin etiolojide yer aldığı karmaşık bir süreçtir. Bu hastalıkta aile hikayesi uzun zamandan beri bilinmekte olup, genomik çalışmalardaki ilerlemeler ile altta yatan genetik sebepler tanımlanmaya başlamıştır. Klinik pratikte tüm kanserler içerisinde en çok ölüme yol açan kanser akciğer kanseridir ve bu kanserin oluşumu özellikle sigara içilmesi, genetik ve birçok çevresel faktörle ilişkilendirilmiştir (3,4).

NO'nun 1987 yılında keşfinden sonra kanser ile NO ilişkisi üzerine oldukça fazla çalışmalar yapılmış ve NO'nun hem kanser oluşumunda hem de oluşmuş olan kanserin büyüme ve gelişmesinde etkili olabileceği düşünülmüştür. Bunu da özellikle DNA hasarını ortaya çıkararak yaptığı, üzerinde durulan ana görüştür. Yapılan çalışmalar NO'nun hem tümör oluşumunda hem de tümör oluşumunu önlemede etkileri olduğunu düşündürmektedir. NO'nun DNA üzerindeki olumsuz etkilerini; karsinojenik nitrosaminlerin oluşumu, DNA'da direkt modifikasyon, DNA tamiri için gerekli sistemlerin NO tarafından inhibisyonu ile oluşturduğunu yapılan çalışmalar göstermiştir. Buna ek olarak RNOS'ların DNA sarmal kırıklarına yol açtığı gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonda NO'nun süperoksit, peroksinitrit gibi RNOS'ların üretimine yol açtığı ve bunlar üzerinden DNA'da çeşitli lezyonlar oluşturduğu gösterilmiştir (103-105). Plasmidler ile invitro yapılmış bir çalışmada DNA üzerinde transversiyon ve transisyon şeklindeki mutasyonları NO donörleri, NO, nitrit ve peroksinitrit arasından en çok peroksinitritin oluşturduğu gösterilmiştir (106).

Ayrıca yapılan çalışmalar nükleik asitlerin oksidasyon ve deaminasyonu yanısıra DNA sarmal kırılmalarının indüksiyonunun vücutta nadiren oluşan yüksek doz NO ya da RNOS konsantrasyonlarını gerektirdiğini göstermiştir. Vücutta bol miktarda bulunan antioksidanlar NO ya da RNOS'ların konsantrasyonlarını azaltarak DNA'da hasar oluşturacak yeterli konsantrasyona ulaşmalarını önlemektedir (105).

Son zamanlarda ki çalışmalar NO'nun birçok DNA tamir enzimlerinin aktivitelerini bunları kodlayan DNA bazlarının deaminasyonu (nitrosamin oluşumuyla) ile indirekt olarak etkilediğini göstermiştir (103). Ayrıca RNOS'lar aminoasitlerin tiol rezidülerine yüksek afinite göstermektedirler ve bu durum onların tiol rezidüleri üzerinden enzimlerin kritik inhibisyonlarını desteklemektedir (107). DNA tamir enzimlerinden DNA ligazın RNOS ve NO tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (74). NO'ya maruz kalan hücrelerde genetik materyelde tek sarmal kırıkları ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte izole edilmiş DNA'nın invitro şartlarda NO'ya ve ondan türeyen RNOS'lara maruz bırakılması halinde DNA'da tek sarmal kırıkları gözlenmemiştir (108). Bu sonuçlar NO ya da RNOS tarafından DNA'nın direkt kimyasal modifikasyonunun DNA sarmal kırıklarına yol açmadığı ve bu DNA sarmal kırıklarının invivo şartlarda başka mekanizmalarla oluşabileceğini düşündürmektedir. Bu noktada DNA'nın transkripsiyonu ya da tamiri esnasında ortaya çıkan DNA sarmal kırıklarının düzeltilmesinde görevli DNA ligazın aktivitesinin NO tarafından inhibisyonu önemli bir neden olabilir. NO aracılı DNA ligaz'ın inhibisyonu ile artan DNA sarmal kırıkları sırasıyla p53 tümör süpresör gen (109) ve poli ADP-Riboz sentetaz'ın aktivasyonuna neden olabilir (110).

NO hücre siklusu ve apoptosiste kritik öneme sahip proteinlerin aktivitelerini ve DNA'da mutasyonlar oluşturarak bu proteinlerin ifade edilmelerini etkileyebilir (110).

Apopitosis ile ilgili birçok onkogenin NO tarafından düzenlenmesi incelenmiştir. Hücrelerin NO donörlerine maruz kalması NO tarafından hücre DNA'sının hasar görmesine cevaben p53 tümör süpresör geninin ekspresyonunun artışı ile sonuçlanır. p53 geninin ekspresyonunun artışı iNOS'un azalmış ekspresyonu ile ilişkilidir ki bu durum NO tarafından oluşturulan genotoksisitenin p53 tümör süpresör gen tarafından kritik kontrolünü desteklemektedir (103). Her iki NOS formu (yapısal ve indüklenebilir) tümör hücrelerinde vardır. İnsan meme tümörlerinde (111), jinekolojik kanserlerde (112), santral sinir sistemi tümörlerinde (113), kolon kanserlerinde (114), baş ve boyun kanserlerinde (115) her iki izoform tespit edilmiştir.

Tüm bu veriler tümör büyümesi ve gelişmesinde NO'nun kritik bir role sahip olduğunu göstermektedir. NO hem tümör büyümesinde hem de tümör baskılanmasında etkileri olan bir molekül olarak gözükmektedir. Sonuçta NO'nun kanserdeki rolü çok yönlüdür.

Bizim çalışmamızda 100 akciğer kanserli hasta ile 100 kontrol grubu ele alındı. Hasta grubunda kontrol grubuna oranla NO seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. NO seviyeleri hasta grubunda yüksek olarak bulundu. Obara H ve ark. (116) Mycoplasma hyorhinitis ile enfekte insanlarda görülen mide kanseri üzerine yapılan çalışmada NO seviyelerini anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Nam KT ve ark. (117) iNOS'un Helicobacter pylori ilişkili karsinogenezde rolünü araştırmışlardır. Sonuç olarak Helicobacter ilişkili kanser oluşumuna iNOS'un katkıda bulunduğu sonucuna varmışlardır ve kanser oluşturulan farelerde NO seviyelerini yüksek olarak bulmuşlardır.

Biz NO ile kanser ilişkisinde ki bu karmaşık ilişkilerin aydınlatılmasında eNOS'un gen düzeyindeki ifadelendirilmesinin bir katkısı olabilir mi düşüncesinden yola çıkarak çalışmamızda 100 akciğer kanserli hasta ile 100 kontrol grubunda eNOS T-786C promoter gen bölgesinde ki TT, TC, CC polimorfizmleri ile eNOS G894T ekson 7 gen bölgesinde ki GG, GT, TT polimorfizmlerini araştırdık. eNOS T-786C promoter gen bölgesinde akciğer kanserli hastalarda TT dağılımı %42 iken kontrol grubunda bu oran %53 olarak bulundu. TC dağılımı akciğer kanserlilerde %47 iken kontrol grubunda %39 ve CC dağılımı akciğer kanserlilerde %11 iken kontrol grubunda %8 olarak tespit edildi. eNOS T-786C promoter gen bölgesinde akciğer kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında polimorfizmler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. eNOS G894T ekson 7 gen bölgesinde ise akciğer kanserli hastalarda GG dağılımı %56 iken kontrol grubunda bu oran %60 bulundu. GT dağılımı akciğer kanserlilerde %34 iken kontrol grubunda %31 ve TT dağılımı akciğer kanserlilerde %10 iken kontrol grubunda %9 olarak tespit edildi. eNOS G894T ekson 7 gen bölgesinde akciğer kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında polimorfizmler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Yaptığımız literatür taramasında akciğer kanserinde eNOS gen polimorfizmi çok az sayıda çalışılmış olup bunlardan K.T.Cheon ve ark.(118) akciğer kanserinde eNOS ve Anjiotensin dönüştürücü enzim gen polimorfizmlerini çalışarak sonuçta eNOS gen polimorfizmi açısından kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulmuşlardır. Fakat bu çalışmanın istatistiği incelendiği zaman, “kontrol grubu ile astmatik hastalar karşılaştırıldığı zaman” diye bir ibare kullanılmaktadır. Ayrıca genin hangi bölgesine baktıkları ve nerede polimorfik yapı olduğu makalede belirtilmemiştir. Bu nedenlerle bu çalışma her ne kadar akciğer kanserli hastalar ile

kontrol grubu arasında eNOS gen polimorfizmi açısından bir fark olduğunu gösterebilir. Kanaatimizce fazla dikkate değer bir çalışma değildir. Fujita S ve ark. (119) platinum temelinde ikili kemoterapi almış olan ilerlemiş KHDAK hastalarında eNOS intron 4 VNTR gen bölgesindeki polimorfizme bakmışlar ve sonuçta bu gen bölgesindeki polimorfizmin hastalığın ilerlemesi ve hayatta kalış süresi ile ilgili olabileceğini söylemişlerdir. Kyoung-Mu Lee ve ark. (120) prostat kanserinde eNOS gen polimorfizmini çalışmışlardır. NOS-2 ve NOS-3 enzimlerinin değişik gen bölgelerinde ki polimorfizmler açısından yaptıkları çalışma da prostat kanserlilerde eNOS geninin çeşitli bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu bulmuşlar ve bununla tümör agresifliği ile ilişkili olduğunu söylemişlerdir.

Tecder Ünal ve ark. (121) mide kanserinde eNOS gen polimorfizmini çalışmışlar ve sonuç olarak eNOS G894T polimorfizmi ile mide kanseri arasında herhangi bir ilişki bulamazken, T-786C polimorfizmi açısından mide kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında önemli derecede fark bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmada CC polimorfizminin mide kanseri ile belirgin derecede ilişkili olduğunu söylemişlerdir.

Lei Yao ve ark. (122) insanlarda meme kanserinde eNOS T-786C polimorfizmi açısından yaptıkları meta-analizde eNOS geni promoter bölgesindeki T'den C'ye olan değişimle azalmış serum nitrit/ nitrat oranları ve azalmış endotelial NO üretiminin ilişkili olabileceğini söylemişlerdir. Bu açıdan eNOS T-786C polimorfizminin azalmış meme kanseri riskiyle ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Sugita ve ark.(123) depresyon hastalarında eNOS T-786C polimorfizmine bakmışlar ve TC polimorfizmi olanlarda NO seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı

yüksek bulmuşlardır. eNOS G894T bölgesindeki polimorfizmlere baktıklarında GT polimorfizmi gösterenlerin NO seviyelerinde bir fark bulamamışlardır. Ayrıca -786T>C ve G894T bölgelerindeki polimorfizmler açısından yaptıkları araştırmada bu polimorfizmler ile depresyon arasında bir ilişki bulamamışlardır.

Nakayama ve ark.(124) eNOS geninin flanking bölgesinde 3 mutasyon bulunduğunu ve bunlardan özellikle T-786C polimorfizminin transkripsiyonel aktiviteyi önemli derecede azalttığını söylemişlerdir. Yaptıkları çalışmada 174 koroner spazmlı hastada eNOS T-786C polimorfizmlerinden CC polimorfizmi bulunduranların NO seviyelerinin düşük olduğunu söylemişlerdir.

Sharma ve ark.(125) preeklampsili hastalarda eNOS gen G894T polimorfizmleri açısından yaptıkları araştırmada hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulmuşlardır. Aynı zamanda hasta ve kontrol grubunda NO seviyelerine bakmışlar ve TT genotipindeki kişilerde NO seviyelerini düşük olarak ölçmüşlerdir.

Wang ve ark.(126) yaptıkları çalışmada eNOS T-786C polimorfizminin eNOS ilişkili fenotipik değişimle tutarsız bir ilişki içinde olduğunu söylemişlerdir. T allelini taşıyan bireylerde transkripsiyon etkinliğinin C allelini taşıyanlara göre düşük olduğunu söylemişlerdir. Ayrıca sigara içiminin T allelini taşıyan bireylerde transkripsiyon etkinliğini belirgin derecede arttırdığını C allelini taşıyan bireylerde ise azalttığını söylemişlerdir.

1992 yılında Vallance ve arkadaşları ADMA'yı ilk olarak insan plazma ve idrarında NO sentazın endojen inhibitörü olarak tanımlamışlardır (12). ADMA, plazmada doğal olarak bulunan bir aminoasittir. ADMA, arjininin translasyon sonrası modifikasyona uğramış halidir (13).

Yoshimatsu ve ark. (127) yaptıkları çalışmada toplam 118 kişiyi içeren mide, meme, hematopoyetik ve akciğer kanser vakalarında serum ADMA seviyelerini araştırmışlar (Bu kanser vakalarının 33 tanesi akciğer kanseri olmak üzere) ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır. ADMA düzeyini ELISA ile ölçmüşler. ADMA yüksekliğini aynı kanser tiplerinde PRMT1 ölçümü yaparak PRMT1'in aşırı ekspresyonuna bağlamışlardır. Fakat bu ekspresyon artışını ve kanserlerde ADMA düzeylerinin regülasyonunu açıklamak üzere daha başka çalışmalara ihtiyaç olduğunu söylemişlerdir. Szuba ve ark. (128) farklı tiplerdeki hematolojik malignitelilerde plazma ADMA düzeylerini araştırmışlar ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır.

Bizde çalışmamızda bu çalışmalara paralel olarak plazma ADMA düzeylerini akciğer kanserli hastalarda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulduk. Biz plazma ADMA düzeylerini HPLC yöntemi ile belirledik.

Ayrıca yaptığımız çalışmada 100 Akciğer kanserli hasta ve 100 kontrol grubunda eNOS T-786C ve G894T polimorfizmlerine ve her iki grubun plazma ADMA ve NO seviyelerine bakarak bunlar arasındaki ilişkiyi araştırdık. Sonuçta her iki grupta polimorfizmler ile NO seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık ama yukarıdaki gen bölgeleri açısından sırasıyla CC ve TT polimorfizmindeki hasta ve sağlıklı grupta ADMA seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulduk. Bu tablo CC genotipindeki bireylerde eNOS gen ekspresyonunun NO seviyelerini arttıracak bir şekilde etkilendiğini ve bu durumda eNOS'un endojen inhibitörü olan plazma ADMA seviyelerini arttırdığı söylenebilir. Bu veriler ışığında eNOS T-786C ve G894T polimorfizmleri açısından sırasıyla CC ve TT genotipindeki bireylerin plazma ADMA düzeylerinin yüksek oluşu plazma NO

seviyesiyle her ne kadar bağımlı olsada başka nedenlerinde bu yükseklikte pay sahibi olabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca çalışmamızda KHAK'da NO seviyeleri KHDAK ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok iken ADMA seviyeleri açısından KHAK'da ADMA seviyeleri KHDAK'dan istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Polimorfizmler açısından KHAK ile KHDAK değerlendirildiğinde G894T polimorfizmleri bakımından her iki grupta istatistiksel bir fark yok idi. Fakat T-786C polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. CC genotipi KHAK'da KHDAK'ya göre yüksek idi. Bu veriler ışığında KHAK'da CC genotipinin daha fazla olarak izlenmesi bu genotipi taşıyan bireylerin akciğer kanseri hastası olmaları halinde KHAK olma ihtimalinin daha yüksek olacağını düşündürmektedir. Bize göre bunun altında yatan patofizyolojik mekanizma ve bu durumun ADMA ile olan ilişkisi çok daha geniş hasta gruplarında çalışılarak ileri düzeyde araştırılmalıdır.

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu demografik özellikleri açısından incelendiği zaman hasta grubunun ve kontrol grubunun yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Sigara içiciliği açısından hasta grubu lehine istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Akciğer kanseri etiolojisinde bariz olarak suçlanan sigaranın hasta grubunda içiciliğinin yüksek olarak bulunması beklediğimiz bir sonuçtu.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda 100 Akciğer kanserli hasta ile 100 kontrol grubunda eNOS T-786C promoter gen bölgesinde ki TT, TC, CC polimorfizmleri ile eNOS G894T ekson 7 gen bölgesinde ki GG, GT, TT polimorfizmlerini araştırdık. Akciğer kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında bu polimorfizmler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Akciğer kanserli hastalarda plazma ADMA ve NO seviyeleri kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu.

eNOS T-786C ve G894T polimorfizmleri açısından sırasıyla CC ve TT genotipindeki hasta ve kontrol grubundaki bireylerin Plazma ADMA seviyeleri diğer polimorfik gruplardan belirgin olarak yüksek bulundu.

Ayrıca çalışmamızda KHAK'da NO seviyeleri KHDAK ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok iken ADMA seviyeleri açısından KHAK'da ADMA seviyeleri KHDAK'dan istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Polimorfizmler açısından değerlendirildiğinde G894T polimorfizmi açısından her iki grupta istatistiksel bir fark yoktu. Fakat T-786C polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. CC genotipi KHAK'da KHDAK'ya göre daha fazlaydı.

Sonuç olarak, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşiminin sonucunda kompleks bir şekilde meydana gelen akciğer kanseri hastalığında daha fazla genetik çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır. Akciğer kanseri olan hastalarda eNOS T-786C ve G894T polimorfizmleri ve plazma ADMA seviyeleri çok daha geniş hasta ve kontrol gruplarında başka parametrelerde eklenerek çalışılıp açıklanamayan bu karanlık ilişkiler

açıklığa kavuşturulabilir. Böylece bu çalışmalar ışığında akciğer kanserinin hem etiolojisine hem de gelişiminin aydınlatılmasına önemli katkılar sağlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Organization The World Healthly. The World Health Organization's Fight Against Cancer: Strategies That Prevent CaC. 2008(çevrimiçi); <http://www.who.int/cancer/publicat/WHOCancerBrochure2007.FINALweb.pdf>.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA-Cancer J Clin.* 2011; 61: 69-90.
3. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer I.* 1999; 91: 1194-210.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA-Cancer J Clin.* 2005; 55: 74-108.
5. Marin J, Rodriguez-Martinez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Therapeut.* 1997; 75: 111-34.
6. Gensert JM, Ratan RR. The metabolic coupling of arginine metabolism to nitric oxide generation by astrocytes. *Antioxid Redox Sign.* 2006; 8: 919-28.
7. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncology.* 2001; 2: 149-56.
8. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science.* 1991; 254: 1001-3.
9. Wink DA, Kim S, Miles A, Jourdeuil D, Grisham MB. Methods for distinguishing nitrosative and oxidative chemistry of reactive nitrogen oxide species derived from nitric oxide. *Curr Protoc Toxicol.* 2001; Chapter 10: Unit 10.8.
10. Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, Finazzi-Agro A. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature.* 1997; 31: 432-3.
11. Jaiswal M, LaRusso NF, Shapiro RA, Billiar TR, Gores GJ. Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes. *Gastroenterol.* 2001; 120: 190-9.
12. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992; 339: 572-5.
13. Calver A, Collier J, Leone A, Moncada S, Vallance P. Effect of local intra-arterial asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the forearm arteriolar bed of healthy volunteers. *J Hum Hypertens.* 1993; 7:193-4.

14. Şahin D. Referans Patoloji. İstanbul: Tıp Kitabevi, 2009: 121- 159
15. Cooper GM, Hausman RE. The cell: A molecular Approach, Sakızlı M, Atabey N, Hücre: moleküler yaklaşım (3. baskı). İzmir, İzmir Tıp Kitabevi; 2006; 631- 668
16. Cotran SR, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989; 239- 306.
17. Anderson WAD, Kissane JM. Pathology, Kazancıgil A. Anderson patoloji (7. baskı). Ankara, Güven Yayıncılık San. ve Tic. A.Ş.; 1982.
18. Yenerman M. Genel Patoloji, İstanbul: İstanbul Tıp Fakültesi, Yayın no:118, İstanbul, 1980.
19. Ataergin A. Kanser tedavisinde anjiogenez inhibitörlerinin yeri. Türkiye klinikleri J Med Sci. 1999; 19: 100- 105
20. Walter JB, Israel MS. General Pathology. Edinburg and London: Churchill Livingstone Longman, 4th Edition: 1974; 305- 375.
21. Cooper GM, Hausman RE. The Cell: A Molecular Approach, Third edition, 2006, pp. 719- 765
22. Ekmekçi A. Gen, Genetik değişim ve hastalıklar. Ankara: Gazi Kitabevi Tic.Ltd.Şti, 2006.
23. Berbec H. Antioncogenes-Tumor supression genes. Postepy High med Dosw. 1997; 51: 269-84
24. Erensayın C. Genetik. Ankara: Nobel Yayım Dağıtım, 2000.
25. Passarge E. Renkli Genetik Atlası. İstanbul: Yüce Yayıncılık ve Nobel Tıp Kitabevi, 2000.
26. Başaran N. Tıbbi Genetik. Bursa: Günes ve Nobel Kitabevi, 1999.
27. Spiro SG, Porter JC. Lung cancer--where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. Am J Resp Crit Care. 2002; 166: 1166-96.
28. Kligerman S, White C. Epidemiology of lung cancer in women: risk factors, survival, and screening. AJR Am J Roentgenol. 2010; 196: 287-95.
29. Kiyohara C, Ohno Y. Sex differences in lung cancer susceptibility: a review. Gender Med. 2010; 7: 381-401.

30. Kligerman S, White C. Epidemiology of lung cancer in women: risk factors, survival, and screening. *Am J Roentgenol.* 2011; 196: 287-95.
31. Ries LAG MD, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, E.J. F, Clegg L, Horner MJ., Howlader N EM, Reichman M, Edwards BKe. SEER Cancer Statistics Review. 2007 (çevrimiçi): http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/.
32. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *Ca Cancer J Clin.* 2005; 55: 74-108.
33. TCS Bakanlığı. Kanser istatistik 2005. 2005; (çevrimiçi): www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-7179/eski2yeni.html.
34. TCS Bakanlığı. 2002-2003; (çevrimiçi): www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-7179/eski2yeni.html.
35. Radzikowska E, Roszkowski K, Glaz P. Lung cancer in patients under 50 years old. *Lung Cancer.* 2001; 33: 203-11.
36. Haugen A. Molecular biology in the diagnosis of lung cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2005; 125: 3283-5.
37. Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncology.* 2005; 23: 3175-85.
38. Köktürk N, Kırıçoğlu C. Sigara ve akciğer kanseri. *Solunum Dergisi.* Ankara: Nobel Yayım Dağıtım, 2003;5 :139-145
39. Janerich DT, Thompson WD, Varela LR, Greenwald P, Chorost S, Tucci C, et al. Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household. *N England J Med.* 1990; 323: 632-6.
40. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest.* 2007; 132: 29-55.
41. Catelinois O, Rogel A, Laurier D, Billon S, Hemon D, Verger P, et al. Lung cancer attributable to indoor radon exposure in france: impact of the risk models and uncertainty analysis. *Environ Health Persp.* 2006; 114: 1361-6.
42. Cortez BA, Machado-Santelli GM. Chrysotile effects on human lung cell carcinoma in culture: 3-D reconstruction and DNA quantification by image analysis. *BMC cancer.* 2008; 8: 181.
43. Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann Oncol.* 2007; 18: 431-46.
44. Türk Toraks Dergisi. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavi Rehberi. 2006;7:1-35.

45. Landi MT, Gao Y, Goldstein AM, Consonni D, Pesatori AC, Wacholder S, et al. Family history of cancer and nonmalignant lung diseases as risk factors for lung cancer. *Int J Cancer*. 2009; 125: 146-52.
46. Wei Q, Spitz MR. The role of DNA repair capacity in susceptibility to lung cancer: a review. *Cancer Metastasis Rew*. 1997; 16: 295-307.
47. Ganti AK, Loberiza FR, Kessinger A. Association of positive family history with survival of patients with lung cancer. *Lung Cancer-J Iaslc*. 2009; 63: 136-9.
48. Vineis P, Forastiere F, Hoek G, Lipsett M. Outdoor air pollution and lung cancer: Recent epidemiologic evidence. *Int J Cancer*. 2004; 111: 647-52.
49. Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis*. 2005; 26: 1846-55.
50. Çevikbaş U. Temel Patoloji kitabı: Akciğerler ve üst solunum yolları. İstanbul: Nobel&Yüce 6. Edisyon 2000.
51. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J*. 2001; 18: 1059-68.
52. Wistuba, II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol*. 2001; 28: 3-13.
53. Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P. The revised TNM staging system for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2009; 15: 4-9.
54. Akkoçlu, A. Akciğer kanserlerinde tanı, evreleme ve tedavi öncesi değerlendirme. Türk Toraks Derneği, 2006.
55. Fleischhacker M, Beinert T, Possinger K. Molecular genetic characteristics of lung cancer - useful as 'real' tumor markers? *Lung Cancer*. 1999; 25: 7-24.
56. Kayıhan, E. Özyardımcı, N. Akciğer kanserleri Tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık, 2006.
57. Law MR. Genetic predisposition to lung cancer. *Br J Cancer*. 1990; 61: 195-206.
58. Kılınç K, Kılınç A. Nitrik Oksit biyolojik fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Ankara: Palme Yayıncılık, 2003.
59. Morris SM, Billiar TR. New Insights into the Regulation of Inducible Nitric-Oxide Synthesis. *Am J Physiol*. 1994; 266: 829-39.
60. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*. 1989; 38: 1709-15.

61. Palmer RM, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 158: 348-52.
62. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med.* 1994; 120: 227-37.
63. Yallampalli C, Byam-Smith M, Nelson SO, Garfield RE. Steroid hormones modulate the production of nitric oxide and cGMP in the rat uterus. *Endocrinol.* 1994; 134: 1971-4.
64. Barbato JE, Tzeng E. Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg.* 2004; 40: 187-93.
65. Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trend Cell Biol.* 2001; 11: 66-75.
66. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation.* 1998; 97: 2494-8.
67. Luscher TF, Noll G. Is it all in the genes...? Nitric oxide synthase and coronary vasospasm. *Circulation.* 1999; 99: 2855-7.
68. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-6.
69. Huang J, Lin SC, Nadershahi A, Watts SW, Sarkar R. Role of redox signaling and poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase activation in vascular smooth muscle cell growth inhibition by nitric oxide and peroxynitrite. *J Vasc Surg.* 2008; 47: 599-607.
70. Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol.* 1994; 267: 1405-13.
71. Powell JT, Higman DJ. Smoking, Nitric-Oxide and the Endothelium - Reply. *Brit J Surg.* 1994; 81: 1699.
72. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene Structure, Polymorphism and Mapping of the Human Endothelial Nitric-Oxide Synthase Gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 198: 1027-33.
73. Andersen MR, Ulbjerg N, Stender S, Sandager P, Aalkjaer C. Maternal smoking and impaired endothelium-dependent nitric oxide-mediated relaxation of uterine small arteries in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 204: 106-14

74. Graziewicz M, Wink DA, Laval F. Nitric oxide inhibits DNA ligase activity: potential mechanisms for NO mediated DNA damage. *Carcinogenesis*. 1996; 17: 2501-5.
75. Ulibarri JA, Mozdziak PE, Schultz E, Cook C, Best TM. Nitric oxide donors, sodium nitroprusside and S-nitroso-N-acetylpencillamine, stimulate myoblast proliferation in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1999; 35: 215-8.
76. Siendones E, Fouad D, Abou-Elella AM, Quintero A, Barrera P, Muntane J. Role of nitric oxide in D-galactosamine-induced cell death and its protection by PGE1 in cultured hepatocytes. *Nitric Oxide-Biol Ch*. 2003; 8: 133-43.
77. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ*. 2003; 10: 431-42.
78. Brune B, von Knethen A, Sandau KB. Transcription factors p53 and HIF-1alpha as targets of nitric oxide. *Cell Signal*. 2001; 13: 525-33.
79. Messmer UK, Brune B. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem J*. 1996; 319: 299-305.
80. Ho YS, Wang YJ, Lin JK. Induction of p53 and p21/WAF1/CIP1 expression by nitric oxide and their association with apoptosis in human cancer cells. *Mol Carcinogen*. 1996; 16: 20-31.
81. Forrester K, Ambs S, Lupold SE, Kapust RB, Spillare EA, Weinberg WC, et al. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 2442-7.
82. Callsen D, Brune B. Role of mitogen-activated protein kinases in S-nitrosoglutathione-induced macrophage apoptosis. *Biochemistry*. 1999; 38: 2279-86.
83. Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, Yin Z, Wu X, Jones SN, et al. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev*. 1998; 12: 2658-63.
84. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2002; 8: 62-7.
85. Kimura H, Weisz A, Ogura T, Hitomi Y, Kurashima Y, Hashimoto K, et al. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem*. 2001; 276: 2292-8.
86. Jadeski LC, Chakraborty C, Lala PK. Role of nitric oxide in tumour progression with special reference to a murine breast cancer model. *Can J Physiol Pharm*. 2002; 80: 125-35.
87. Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res*. 2002; 12: 311-20.

88. Masri F. Role of nitric oxide and its metabolites as potential markers in lung cancer. *Ann Thorac Med.* 2010; 5: 123-7.
89. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998; 32: 3-8.
90. McNamara DM, Bedi M, Holubkov R, Postava L, Ramani R, Janosko K, et al. Effect of the Asp(298) variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure - Response. *Circulation.* 2003; 108: 112-114.
91. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993; 268: 17478-88.
92. Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation.* 2004; 109: 1813-8.
93. Beltowski J, Kedra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep.* 2006;58: 159-78.
94. Teerlink T. ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med.* 2005; 10: S73-81.
95. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1023-30.
96. Drexler H. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol.* 1998; 82: 3-4.
97. Boger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) modulates endothelial function - therapeutic implications. *Vasc Med.* 2003; 8: 149-51.
98. Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 1999; 43: 542-8.
99. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric-Oxide Release Accounts for the Biological-Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature.* 1987; 327: 524-6.
100. Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl.* 2003; 4: 41-51.
101. Tomasian D, Keaney JF, Vita JA. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res.* 2000; 47: 426-35.
102. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87: 840-4.

103. Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis*. 1998; 19: 711-21.
104. Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, Laval F, Nims RW, Laval J, et al. Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr Top Cell Regul*. 1996; 34: 159-87.
105. Arroyo PL, Hatch-Pigott V, Mower HF, Cooney RV. Mutagenicity of nitric oxide and its inhibition by antioxidants. *Mutat Res*. 1992; 281: 193-202.
106. Juedes MJ, Wogan GN. Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutat Res*. 1996; 349: 51-61.
107. Wink DA, Nims RW, Darbyshire JF, Christodoulou D, Hanbauer I, Cox GW, et al. Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol*. 1994; 7: 519-25.
108. Routledge MN, Wink DA, Keefer LK, Dipple A. Mutations induced by saturated aqueous nitric oxide in the pSP189 supF gene in human Ad293 and E. coli MBM7070 cells. *Carcinogenesis*. 1993; 14: 1251-4.
109. Messmer UK, Ankarcrona M, Nicotera P, Brune B. p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *Febs Letters*. 1994; 355: 23-6.
110. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*. 1994; 263: 687-9.
111. Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Brit J Cancer*. 1995; 72: 41-4.
112. Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JE, Riveros-Moreno V, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res*. 1994; 54: 1352-4.
113. Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res*. 1995; 55: 727-30.
114. Cosan DT, Bayram B, Soyocak A, Basaran A, Gunes HV, Degirmenci I, Musmul A. Role of phenolic compounds in nitric oxide synthase activity in colon and breast adenocarcinoma. *Cancer Biother Radio*. 2010; 25: 577-80.
115. Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS, Weissler MC. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Otolaryng*. 1995; 113: 541-9.
116. Obara H, Harasawa R. Nitric Oxide Causes Anoikis through Attenuation of E-Cadherin and Activation of Caspase-3 in Human Gastric Carcinoma AZ-521 Cells Infected with Mycoplasma hyorhinis. *J Vet Med Sci*. 2010; 72: 869-74.

117. Nam KT, Oh SY, Ahn B, Kim YB, Jang DD, Yang KH, et al. Decreased *Helicobacter pylori* associated gastric carcinogenesis in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Gut*. 2004; 53: 1250-5.
118. Cheon KT, Choi KH, Lee HB, Park SK, Rhee YK, Lee YC. Gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase and angiotensin-converting enzyme in patients with lung cancer. *Lung*. 2000; 178: 351-60.
119. Fujita S, Masago K, Hatachi Y, Fukuhara A, Hata A, Kaji R, et al. Genetic polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene correlate with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. *BMC Med Genet*. 2010; 11: 167.
120. Lee KM, Kang D, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N, et al. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009; 30: 621-5.
121. Tecder Unal M, Karabulut HG, Gumus-Akay G, Dolen Y, Elhan A, Tukun A, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in gastric cancer. *Turk J Gastroenterol*. 2010; 21: 338-44.
122. Yao L, Fang F, Zhong Y, Yu L. The association between two polymorphisms of eNOS and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Tr*. 2010; 12: 223-7.
123. Ikenouchi-Sugita A, Yoshimura R, Kishi T, Umene-Nakano W, Hori H, Hayashi K, et al. Three polymorphisms of the eNOS gene and plasma levels of metabolites of nitric oxide in depressed Japanese patients: a preliminary report. *Hum Psychopharmacol*. 2011; 26: 531-4.
124. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786-> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999; 99: 2864-70.
125. Sharma D, Trivedi SS, Bhattacharjee J. Oxidative stress and eNOS (Glu298Asp) gene polymorphism in preeclampsia in Indian population. *Mol Cell Biochem*. 2011 ; 353: 189-93.
126. Wang R, Dudley D, Wang XL. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency - Modifiable by cigarette smoking. *Arterioscl Throm Vas*. 2002; 22: 1-4.
127. Yoshimatsu M, Toyokawa G, Hayami S, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, et al. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer*. 2011; 128: 562-73.

128. Szuba A, Chachaj A, Wrobel T, Dzietczenia J, Mazur G, Antonowicz-Juchniewicz J, et al. Asymmetric dimethylarginine in hematological malignancies: a preliminary study. *Leukemia Lymphoma*. 2008; 49: 2316-20.

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ
(eNOS) GEN POLİMORFİZMİ VE PLAZMA ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN
(ADMA) KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ**

Dr. Zafer BAYRAKTUTAN

Uzmanlık Eğitime Başlama Tarihi: 25.05.2007

Uzmanlık Eğitimi Bitirme Tarihi : 23.12.2011

Uzmanlık Sınavı Tarihi : 23.12.2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Ebubekir BAKAN

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Abdulkadir YILDIRIM

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Bedri SEVEN

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Ali ŞAHİN

Prof. Dr. Ebubekir BAKAN

Tıbbi Biyokimya AD Başkanı

Aralık-2011

ERZURUM