

EGE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA

PROJE KESİN RAPORU

EGE UNIVERSITY SCIENTIFIC

RESEARCH PROJECT REPORT

PROJE NO: 2003 TIP-011
AKCİĞER KANSERİNDE TELOMERAZ
VE ANJİJENİK FAKTÖRLERİN
TANISAL VE PROGNOSTİK DEĞERİ

PROJE YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Ülkü BAYINDIR

Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

Medical School Department of Pulmonary Medicine

Bornova-İzmir

2010

ÖNSÖZ

Akciğer kanseri yeni tanı yöntemleri ve tedavi yaklaşımlarına rağmen prognozu kötü olan kanserlerin başında gelmektedir. Tanı aşamasında evreleme için yapılması gereken tetkikler önemli bir ekonomik yük getirmekte ve ayrıca zaman kaybına neden olmaktadır. Bu dönemde uzak organ metastazı açısından tarama yapılması gereken hastaların önceden belirlenebilmesi için birçok biyobelirteç üzerinde araştırmalar yapılmış, ancak henüz yüz güldürücü bir sonuç alınamamıştır. Küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalar için çok önemli başka bir sorun da özellikle cerrahi şansı olmayan hastalarda uygulanacak olan kemoterapilere yanıtın ve prognozun önceden tahmin edilememesidir. Küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda genellikle kemoterapiyle çok başarılı sonuçlar alınmamaktadır. Başarı şansının düşük olduğu kadar çok ciddi yan etkileri ve aynı zamanda oldukça yüksek ekonomik yükü de olan kemoterapiye yanıt verebilecek hastaları önceden belirleyebilecek yöntem ve biyobelirteçler de yakın gelecekte onkoloji alanında çığır açacaktır. Bu nedenle tedavi yanıtı ve prognozun öngörülmesinde yararlı olabilecek yöntemler üzerinde ciddi araştırmalar yapılmaktadır.

Onkolojinin değişik alanlarında prognoz, tedavi yanıtı ve metastazların önceden belirlenebilmesi için telomeraz, hTERT, hTR mRNA, VEGF ve b-FGF ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır, ancak akciğer kanseriyle ilgili olarak özellikle BAL sıvısında çalışmalar sınırlı sayıdadır. Buradan yola çıkarak gerçekleştirdiğimiz projemizde elde ettiğimiz sonuçlar akciğer kanserli hastalarda uzak organ metastazının, tedavi yanıtının, prognozun ve sağkalımın önceden tahmin edebilmesi adına önemlidir.

Hasta sayımızın kısıtlı olması nedeniyle kesin bir yorum yapmak güç olsa da sonuçlarımızın geniş hasta gruplarında yapılacak randomize çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyim.

Prof. Dr. Ülkü BAYINDIR

İÇİNDEKİLER

ÇİZELGE DİZİNİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	10
4. BULGULAR.....	15
5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	20
6. KAYNAKLAR.....	26

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1. Akciğer kanserinde saptanan temel moleküler belirteçler (Sayfa 4)

Çizelge 2. Akciğer kanserinde moleküler belirteçlerin görülme sıklığındaki temel farklılıklar (Sayfa 5)

Çizelge 3. Akciğer kanseri tanısı almış 18 olguya ait klinikopatolojik veriler (Sayfa 17)

Çizelge 4. Akciğer kanseri tanısı almış 18 olguya ait analiz sonuçları (Sayfa 18)

Çizelge 5. Akciğer kanseri tanısı almış 18 olgunun laboratuvar verileri (Sayfa 19)

Çizelge 6. Korelasyon analiz sonuçları (Sayfa 19)

Akciğer Kanserinde Telomeraz ve Anjiojenik Faktörlerin Tanısal ve Prognostik Değeri

ÖZET

Bu çalışmada akciğer kanserinde bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında hTERT ve hTR mRNA ekspresyonlarının kanser prognozu ve tedavi yanıtı yönünden bir değer taşıyıp taşımadığının ve serum örneklerinde VEGF ve b-FGF düzeylerinin metastazı belirlemedeki yararlılığının araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmaya akciğer kanserli 18 olgu (15 erkek, 3 kadın) alındı. Tüm olguların yaş ortancası 59 (40-76) yıl olarak saptandı. BAL örneklerinde gerçekleştirilen hTERT mRNA ekspresyon analizinde tüm hastalar negatif, hTR mRNA ekspresyon analizinde ise 8 hasta pozitif, kalan 10 hasta negatif olarak bulunmuştur. Tüm olgularda serum VEGF-A düzey ortancası 685.69 (58.26-2488) pg/ml, serum b-FGF düzey ortancası 8.25 (3-16.73) pg/ml olarak bulundu. Olgular tedavi öncesi alınan BAL örneklerinde hTR mRNA negatif ya da pozitifliğine göre gruplandırılıp, kategorik veriler karşılaştırıldığında, metastaz varlığında ($P=0.03$) ve tedavi yanıtında ($P=0.015$) anlamlı bir fark izlendi. Metastazı olmayanların %83'ü hTR mRNA negatif, metastaz açısından 1a grubunda olanların %63'ü hTR mRNA negatif iken, 1b grubunda yani toraks dışı organ metastazı olanların hepsi hTR mRNA pozitif olarak saptandı. Tedaviye kısmi ya da tam yanıt verenlerin %89'u hTR mRNA için negatif bulunurken, progresyon gösterenlerin %78'i hTR mRNA için pozitif idi. Ayrıca BAL hTR mRNA açısından negatif sonucun, sağ kalım üzerinde olumlu etkisi olduğu görüldü ($P=0.013$).

Serum VEGF-A ve b-FGF düzeyleri için yapılan yaşam analizi her iki parametrenin sağ kalım süresine etkisi olmadığını göstermiştir.

Akciğer kanserinde BAL hTR mRNA'nın uzak organ metastazının gösterilmesi, tedavi yanıtı ve prognozun belirlenmesinde yararlı olabileceği, serum VEGF-A ve b-FGF'nin ise uzak organ metastazı ve prognozun belirlenmesinde katkısının olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, telomeraz, VEGF, b-FGF, BAL

Diagnostic and Prognostic Value of Telomerase and Angiogenic Factors in Lung Cancer

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate whether hTERT and hTR mRNA expressions in bronchoalveolar lavage (BAL) have an importance in the prognosis of lung cancer and in response to the treatment, and the efficacy of VEGF and b-FGF levels in serum samples for the detection of metastasis.

Eighteen patients with lung cancer (15 males and 3 females) were included in the study. The mean age of the patients was 59 (40-76). All patients were negative in hTERT mRNA expression analysis performed in BAL samples, whereas eight patients were positive and 10 patients were negative in hTR mRNA expression analysis performed in BAL samples. The mean value of serum VEGF-A levels was 685.69 (58.26-2488) pg/ml, and the mean value of serum b-FGF was 8.25 (3-16.73) pg/ml. Patients were categorized in terms of positive or negative values of hTR mRNA in BAL samples. When the categorical data were compared, there was a significant difference in the presence of metastasis ($P=0.03$) and response to the treatment ($P=0.015$). Of the patients without metastasis, 83% were hTR mRNA positive. 63% of those who were in group 1a regarding metastasis were hTR mRNA negative. Those who were in group 1b, that is who developed metastasis except for the thorax, all had positive hTR mRNA. 78% of those who either partially or completely responded to the treatment were hTR mRNA positive. It was also observed that negative BAL hTR mRNA results had a positive effect on survival ($P=0.013$).

Survival analysis performed on serum VEGF-A and b-FGF levels revealed that neither parameter had an effect on survival time.

It was concluded that BAL hTR mRNA can be a useful parameter in detecting distant organ metastasis, and determining the treatment response or prognosis whereas VEGF-A and b-FGF do not contribute to the determination of distant organ metastasis and prognosis.

Keywords: Lung cancer, telomerase, VEGF, b-FGF, BAL

1. Giriş

Tanısal tekniklerdeki ve tedavi yaklaşımlarındaki gelişmelere rağmen, akciğer kanseri tüm dünyada gözlenen en ölümcül kanser tipidir. Akciğer kanseri hastalarının prognozu genellikle kötüdür ve 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %15 kadardır (1). Akciğer kanseri heterojen bir hastalık olduğu ve ileri evrelerinde tedavisi çok güç olduğu için, erken tanının yanı sıra tedavi öncesi sağ kalım için öngörü yaptırabilme özelliği olan prognostik biyolojik belirteçlerin tanımlanması son derece önemlidir. Prognostik faktör, hasta veya tümöre ait, uygulanacak tedavi göz önüne alınmaksızın hastada daha iyi bir sonuç alınacağını gösteren bir özellik olarak tanımlanmaktadır (2). Günümüzde kullanılmakta olan yaş, evre ve performans durumu gibi geleneksel prognostik belirteçler değerli olmaya devam edecektir. Ancak yeni belirteçlerin keşfi özellikle tedavi seçeneklerinin ve tedaviye yanıt verebilecek hastaların belirlenmesinde rol oynayabilir.

Son yıllarda moleküler tekniklerdeki gelişmelerin ışığında, normal dokuda nadiren eksprese olan ancak akciğer kanserinde ekspresyonu artan telomeraz, prognostik bir biyobelirteç adayı olarak gündemde olan bir yapıdır (3). Telomeraz, her bir DNA replikasyon döngüsünde meydana gelen kaybı kompanse etmek için kromozomal DNA'nın uçlarındaki telomerlere heksamerik TTAGGG nükleotid tekrarlarını ekleyen ribonukleoprotein yapıda bir enzimdir. Katalitik protein komponenti (hTERT; human Telomerase Reverse Transcriptase) (4, 5) ve protein-ilişkili RNA (hTR; human telomerase-associated RNA) (6) komponenti içerir. Normal somatik hücrelerin aksine, birçok kanser hücresinde telomerazın aktive olduğu ve bu aktivasyonun hücreleri ölümsüzleştirdiği bilinmektedir. hTERT mRNA ekspresyon düzenlenmesinin, telomeraz aktivasyonuna yol açarak kanser hücresinin ölümsüzlük özelliğine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (7). Telomerazın, primer insan kanserlerinin %85-90'ında tespit edilmiş olması, telomerazın tümörlerde yeniden aktive olduğunu ve telomeraz aktivitesinin tümör oluşumu sürecinde rol oynadığını göstermektedir (8).

Sürekli replikasyon tümörün fiziksel olarak büyümesine neden olmaktadır. Tümör dokusu salgıladığı büyüme faktörleri ile endotel hücrelerini uyararak anjiyogeneze yol açar. Böylece primer tümörün yeterli oksijen ve besin desteğine ulaşarak büyümesine ve

göç eden tümör hücrelerinin sistemik dolaşıma katılarak uzak metastaz yapmasına olanak sağlanır (9). Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (b-FGF) anjiyogeneizde önemli rollere sahip iki anjiyojenik faktördür. Her iki faktörün de damar oluşumu, tümör büyümesi, invazyonu ve metastazı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada akciğer kanseri ön tanısı ile başvuran olgulardan alınan bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında hTERT ve hTR mRNA ekspresyonlarının kanser prognozu ve tedavi yanıtı yönünden bir değer taşıyıp taşımadığının ve serum örneklerinde VEGF ve b-FGF düzeylerinin metastazı belirlemedeki yararlılığının araştırılması hedeflenmiştir.

2. Literatür Özeti

Akciğer kanseri, tüm dünyada yılda yaklaşık 1.2 milyon yeni vaka ile özellikle gelişmiş ülkelerde kanserden ölümlerin başlıca nedenidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2001-2005 yılları arasındaki kanser verilerine göre akciğer kanseri insidansı erkeklerde 87.3/100.000, kadınlarda ise 55.4/100.000 olarak belirlenmiştir. 2009 yılı için yeni tanı alan kanser olgularının içinde akciğer kanseri görülme sıklığı erkeklerde %15 (prostat kanserinden sonra ikinci sırada), kadınlarda ise % 14'tür (meme kanserinden sonra ikinci sırada). Akciğer kanseri her iki cins için de birinci sıradaki ölüm nedeni olarak izlenmektedir (10).

Türk Toraks Derneği Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu tarafından 2005 yılında "Türkiye'nin Akciğer Kanseri Haritası" adıyla başlatılan, 7 bölge ve 9 ilde yapılan insidans çalışmasında ülke genelinde insidans erkek ve kadınlarda sırasıyla Ege bölgesinde 57.3/100.000, 6.2/100.000, Akdeniz bölgesinde 25.8/100.000, 3.4/100.000, Güneydoğu Anadolu bölgesinde ise 13.7/100.000, 2.1/100.000 olarak saptanmıştır (11).

Bölgemizde İzmir ölçeğinde yapılan insidans çalışmasında 2001 yılında ilk defa topluma dayalı gerçek kanser insidans verileri yayınlanmıştır. İzmir Kanser İzlem Denetim Merkezi'nin 1993-1994 yılları verilerine göre akciğer kanseri tüm kanserler içinde erkeklerde %38.6'lık oranla en büyük bölümü oluşturmaktadır. Kadınlarda ise %5.2'lik oranla 7. sıradadır. İzmir il sınırında yaşayan olgular baz alınarak hesaplanan yaşa-standardize insidans, erkeklerde 61.6/100.000, kadınlarda 5.1/100.000'dir (12).

Histopatolojik olarak incelendiğinde tüm akciğer kanserli olguların yaklaşık %80'i skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom veya büyük hücreli karsinomdan oluşan küçük hücreli dışı akciğer kanseridir (KHDAK). Kalan olgular ise küçük hücreli akciğer kanserini (KHAK) oluşturmaktadır (13, 14). Farklı coğrafik yerleşimlerde histopatolojik alt tip görülme sıklığı değişebilmektedir. Örneğin ABD ve Japonya'da en sık adenokanser saptanırken, Asya ülkelerinde skuamöz hücreli kanser en sık görülen histopatolojik tiptir (15, 16, 17). Ülkemizde ise, Asya ülkelerine benzer şekilde en sık skuamöz hücreli kanser (yaklaşık % 45) görülmekte ve bunu sırasıyla küçük hücreli kanser (yaklaşık % 20) ve adenokanser izlemektedir. Büyük hücreli kanser % 2 oranıyla en az görülen kanser tipidir (18).

Akciğer kanseri gelişiminde asbest, radon, mesleki ve çevresel maruziyet ve genetik faktörler gibi çok çeşitli faktörler rol oynar. Dünyada sigara içme alışkanlığındaki artışa paralel olarak, akciğer kanseri sıklığı giderek artmıştır (15). Akciğer kanserli olguların yaklaşık %87'si sigara kullanımı ile ilişkilidir. Erkeklerdeki riskin %80'i, kadınlardaki riskin ise %45'ini oluşturan sigara kullanımı, akciğer kanseri gelişimindeki en belirgin risk faktörüdür. Akciğer kanseri gelişimi için sigara içenlerdeki göreceli risk, sigara içmeyenlere göre 24 kat daha fazladır ve pasif içicilik de akciğer kanseri gelişimini arttırmaktadır (19). Sigara, histolojik alt tiplerin insidansını da farklı oranlarda etkilemektedir. Skuamoz hücreli karsinom ve KHAK, kadınlarda daha sık olarak görülen adenokarsinoma göre tütün kullanımı ile daha fazla ilişkilidir (20, 21). Birçok akciğer kanseri olgusu sigara kullanımı ile ilişkili olmasına rağmen, ağır içicilerin sadece küçük bir kısmında akciğer kanseri gelişmektedir. Bu fenomen, genetik faktörlerin bireysel yatkınlığı etkilemesini ileri süren görüşler ile bağlantılıdır (22).

Tütünde bulunan maddeler prokarsinojen veya karsinojen olarak davranarak DNA'ya bağlanıp, mutasyona yol açıp, karsinogenezi uyarabilir (23, 24). Yapılan çeşitli çalışmalar sigara ve akciğer kanseri ile ilişkili moleküler değişiklikler arasındaki bağlantıyı göstermiştir (25, 26, 27, 28, 29). Bu temel moleküler değişiklikler ve onların KHDAK ve KHAK'de izlenen görülme sıklığı çizelge 1 ve 2'de özetlenmiştir (19).

Çizelge 1. Akciğer kanserinde saptanan temel moleküler belirteçler.

Tümör baskılayıcı genler	p53, Rb, p16, p21
Proto-onkogenler	K- <i>ras</i> , c- <i>myc</i> , c-erB-1 ve 2, HGF, HER-2
Telomeraz	hTERT
Hipermetilasyon ve büyüme faktörleri	GRP/BN, TGF-b, FDGF, PTHrP, IGF-1 ve 2
Apopitozis ve anjiogenez	Bcl-2, VEGF
Gen amplifikasyonu	HER-2

Çizelge 2. Akciğer kanserinde moleküler belirteçlerin görülme sıklığındaki temel farklılıklar.

Moleküler Belirteç	KHDAK (%)	KHAK (%)
p53	40-60	40-70
Rb	30	~100
p16	10-40	<1
K-ras	15-20	<1
c-myc	10	80-90
Bcl-2	12-25	75-80
c-erB-2	25	<5
FHIT	40	80
Telomeraz	80-85	~100
GRP/BN	Nadir	20-60

Akciğer kanserli hastalar tipik olarak hastalığın ilerleyen evresinde tanı aldığından, gelişmiş ülkelerde beş yıllık sağkalım oranı %15, gelişmekte olan ülkelerde ise %5 veya daha azdır. Akciğer kanserinin sağkalım oranlarının düşük olmasının nedenleri arasında hastalığın erken tanısı, taranması ve yayılımının öngörülmesi ile ilgili etkin araçların eksikliği ve metastatik hastalığı tedavi etmenin zorluğu yer almaktadır. Bu hastalığın oluşturduğu yükün azaltılabilmesi, tarama ve erken tanı için yeni stratejilere ihtiyaç vardır. Son yıllarda proteomik ve genomik alanlardaki gelişmelerle akciğerin kanser ve preneoplastik lezyonlarında ekspresyonu artan ya da azalan birçok gen ve protein tanımlanmıştır. Akciğer kanserinde erken tanı ve prognozun öngörülmesinde yararlı olabileceği düşünülen biyobelirteçlerden biri de normal dokuda nadiren eksprese olan ancak kanserli dokuda saptanabilen telomerazdır (3).

Kanserin en önemli özelliklerinden biri de proto-onkogenlerin, tümör supresör genlerin ve hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki veya sinyal-transdüksiyon yolları, diferansiyasyon ve apoptozis ile ilişkili spesifik genlerdeki genetik mutasyonlar gibi değişik etkenler sonucu meydana gelen kontrol edilemeyen büyümedir. Kontrol edilemeyen büyüme ile ilişkili olarak birçok kanser hücresi, somatik hücreden farklı olarak, uzamış veya sonsuz replikasyon kapasitesine sahiptir. Ökaryotik kromozomların uçlarında bulunan DNA-protein yapısındaki telomerlerin bu olayda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Telomerler, kromozom uçlarını

ekzonukleolitik yıkımdan, uçuca füzyondan ve düzensiz rekombinasyondan koruyan yapılardır. Omurgalılarda telomerler, spesifik proteinlerle bağlı TTAGGG dizi tekrarlarından oluşur. Somatik hücrelerde ökaryotik polimerazların kromozom uçlarını tam olarak replike edememesinden dolayı, telomerler her bir DNA replikasyonunda 50-200 baz çifti kadar kısalır. Telomerler kritik bir noktaya kadar kısaldıktan sonra, kromozom uçlarını etkin bir şekilde koruyamaz ve hücrede hasarlı DNA cevabını aktifleyerek hücre siklusunu durdurur. Bu olay “yaşlanma için mitotik saat” olarak adlandırılır (30, 31).

Somatik hücrelerin aksine tümör hücrelerinin, germ hücrelerinin ve kök hücrelerinin, telomer uzunluğunu sabit tutabilecek bir proliferasyon kapasitesi vardır (30). Sabit telomer uzunluğunun sağlanması, kromozom uçlarının telomerik DNA kaybını kompanze eden bir enzim olan telomerazın aktivasyonu ile ilişkilidir (32).

Telomeraz, her bir DNA replikasyon döngüsünde meydana gelen kaybı kompanze etmek için kromozomal DNA'nın uçlarındaki telomerlere hegzamerik TTAGGG nükleotid tekrarlarını ekleyen nukleoprotein yapıda bir enzimdir. Telomeraz, katalitik protein komponenti (hTERT; human Telomerase Reverse Transcriptase) (4, 5) ve protein-ilişkili RNA (hTR; human telomerase-associated RNA) içeren büyük bir DNA polimeraz ribonukleoprotein kompleksidir (6). Telomerik DNA sentezi için intrinsek RNA komponentini kalıp olarak kullanan bir revers transkriptaz olarak davranır. Telomeraz aktivitesi için her iki alt ünite de gerekli olmakla birlikte, enzimin katalitik aktivitesi TERT komponentinde bulunduğu için, hTERT mRNA ekspresyon düzenlenmesinin telomeraz aktivasyonunun en önemli basamağı olduğu düşünülmektedir (7).

Normal insan hücrelerinin çoğu telomeraz aktivitesini saptanabilir miktarlarda eksprese etmez. Yapılan çalışmalarda üreme sistemi hücrelerinin yüksek, hematopoetik, cilt ve gastrointestinal hücrelerin çok düşük düzeyde telomeraz eksprese ettiği izlenmiştir (33, 34, 35, 36, 37).

Değişik primer insan kanserlerinde yapılan çalışmalar, telomerazın yaklaşık %87 oranında eksprese edildiğini göstermiştir (38). Kanser hücrelerinde telomerazın yeniden aktivasyonu, hücrelerin sonsuz replikasyon kapasitesi kazanmasına, başka bir deyişle hücrelölümsüzlüğe yol açar. Ölümsüz hale gelen hücreler (neredeyse tüm akciğer

kanser hücreleri de dahil), telomeraz eksprese ettiği için sonsuza kadar prolifer olmaya devam eder (39, 40, 41).

Kanserli akciğer dokularında yapılan çalışmalarda, telomeraz aktivasyonunun moleküler düzeyde göstergesi olan hTERT mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (42, 43). Ancak daha kolay elde edilebilen örnekler olan serum ve bronkoalveolar lavaj sıvısında yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmada, yukarıdaki bilgiler ışığında BAL hTERT ve hTR mRNA ekspresyonunun akciğer kanserinde prognostik değerinin ortaya konması hedeflenmiştir.

Kanser hücrelerinin sonsuz replikasyon yetisi, kendilerine koşulsuz olarak oksijen ve besin desteği sağlanmasını zorunlu kılar. Bu noktada kanser dokusu bir takım büyüme faktörleri sağlayarak varolan damar yatağında yeni kan damarlarının oluşumunu uyarır. Anjiyogenez, var olan damar yapısından yeni kan damarlarının oluşumudur ve fizyolojik şartlar altında, yara iyileşmesi ve kadın üreme organlarında olduğu gibi çok sıkı kontrol edilen bir süreçtir (44). Bu kontrolün temeli anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler arasındaki dengenin korunması esasına dayanır. Bu süreç insan tümörlerinin gelişimi ve büyümesi için kritik rol oynarken, metastaz oluşumu için de ön koşuldur. Tümör hücrelerinden salınan proanjiyojenik faktörler ve/veya host faktörleri ile uyarılan endotelial hücreler prolifer olarak, yeni kan damarlarını oluşturur. Tümör hücreleri birden çok fonksiyona sahip değişik büyüme faktörlerini üretebilirler. Fazladan oksijen ve besin ihtiyacı olan malign hücreler yaklaşık 2mm³ büyüklüğe eriştiklerinde (60-200 tümör hücresi anjiyogenezi başlatmak için yeterlidir) anjiyojenik kayma gerçekleşir (45, 46). Neovaskülarizasyon primer tümörün büyümesine ve göç eden tümör hücrelerinin sistemik dolaşıma katılarak uzak metastaz yapmasına olanak sağlar (9).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (b-FGF) dolaşımda bulununan ve anjiyogenez yapabilme yetisine sahip iki anjiyojenik faktördür. Her iki faktörün de damar oluşumu, tümör büyümesi, invazyonu ve metastazı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

VEGF 46 kDa'luk aktif bir glikoproteindir. Bazik ve heparin bağlayıcı özelliğinin yanı sıra homodimerik bir yapı gösterir (47). 1971'de Folkman'nın ortaya attığı devrimsel nitelikteki anjiyogenez hipotezinden bu yana (48) VEGF'in işleyiş ve fonksiyonları hakkında bir çok bilgi edinilmiştir. Geçen yıllar içinde VEGF gen ailesinin farklı üyeleri tanımlanmıştır: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-

E ve plasental büyüme faktörü (PLGF) (49). Ailenin üzerinde en çok çalışılmış üyesi VEGF olarak da adlandırılan VEGF-A'dır.

Tüm izoformlar aynı genden köken alır ve izoformların biyolojik aktiviteleri, özgül reseptörleri ile etkileşimlerine bağlıdır. Tirozin kinaz reseptör ailesinden olduğu belirlenmiş 3 farklı reseptör mevcuttur: VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1 (KDR) ve VEGFR-3 (Flt-4) (47). VEGF endotelial hücelere özgü bir mitojen ve vasküler permeabilite faktörü olup, anjiyogenez ve protein ile suya karşı vasküler geçirgenliğin düzenlenmesinde en güçlü mediyatörlerden birisidir (50). Vasküler geçirgenlik sözü konusu olduğunda histaminden 50.000 kat daha etkin olduğu bilinmektedir (51). VEGF gen ekspresyonunun büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer ekstrasellüler moleküller gibi birden fazla faktör tarafından düzenlendiği bilinmektedir (52). Ancak temel düzenleyicinin hipoksi olduğu kabul edilmektedir (53).

VEGF düzeyleri değişik biyolojik sıvılarda ve akciğer parenkiminde ölçülmüştür. En sık kullanılan örnekler; kan (serum/plazma), bronkoalveolar lavaj sıvısı, balgam, bronş epitel hüceleri ve alveolar makrofajlardır (47). VEGF'nin lökosit, trombosit gibi kan hüceleri ile dolaşımında taşındığı ve serumdaki kaynağının bu hücelere olduğu öne sürülmektedir (54).

Serum VEGF değerleri değişik histolojik özellikteki kanserlerde (55, 56) olduğu gibi akciğer kanserli hastalarda da kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur (57, 58). Kanser hüceleri tarafından üretilen VEGF'in tümör büyümesi ve gelişimine anjiyogenez, lenfanjiyogenez ve lenf nodu metastazını hızlandırarak katkıda bulunduğu öne sürülmektedir (59).

Fibroblast büyüme faktörü 2 olarak da adlandırılan b-FGF'nin, anjiyogenez ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. İlgili gen 4. kromozomun kısa kolunda yer alır. Beş farklı izoformu vardır ve her biri bulunduğu dokuya, dokunun gelişim evresine veya hücrel stres durumuna göre özgün bir şekilde eksprese olur (60, 61).

b-FGF, endotelial hücelere için mitojen ve invivo anjiyogenez için güçlü bir uyarıcıdır (62, 63). Kollagen içinde kapillere benzer yapıların oluşmasından sorumludur. Bu sitokinin tümör anjiyogenezindeki rolü, immun nötralizan antikorlar kullanılarak tümör gelişiminin durdurulduğu bir fare çalışmasında in vivo olarak gösterilmiştir (64). b-FGF, VEGF sekresyonunu uyarır ve her ikisinin etkisi hem in vitro

hem de in vivo koşullarda sinerjik olmaktadır. b-FGF anjiyogenez dışında, mezodermal ve n6ro-ektodermal h6crelerde h6cre ayrımlaşması ve proliferasyonu ile de yakından ilişkilidir (44).

Serum b-FGF d6zeyinin kaynağının ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Ancak yapılan 7alışmalar, periferik kandaki megakorayositler, trombositler, monositler, T h6creleri, makrofajlar ve gran6lositlerin FGF sentezleme kapasitesi olduğunu g6stermiştir (65, 66, 67, 68, 69).

Bu 7alışmada, akciğer kanseri 6n tanısı ile başvuran olgulardan alınan BAL sıvısında hTERT ve hTR mRNA ekspresyonlarının kanser prognozu ve tedavi yanıtı y6n6nden bir değer taşıyıp taşımadığının ve serum 6rneklerinde VEGF ve b-FGF d6zeylerinin metastazı ve prognozu belirlemedeki yararlılığının araştırılması hedeflenmiştir.

3. Materyal ve Yöntem

3.1. Çalışma Grubu:

Olgular, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliğine ardışık olarak başvuran, daha önce tanı almamış ve tedavi görmemiş olgular arasından seçildi. Bu çalışmaya yaşları 40-76 arasında değişen toplam 18 olgu (3 Kadın, 15 Erkek) dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- 1- Radyolojik olarak akciğer kanseri düşünülmesi
- 2- 18 yaşından büyük olması
- 3- Hastanın bronkoskopik incelemeyi kabul etmesi ve hasta olur formunu okuyup imzalayacak bilişsel fonksiyonlara sahip olması

Çalışma dışı bırakılma kriterleri:

- 1- Daha önce histopatolojik tanı için herhangi bir girişim yapılmış olması
- 2- Daha önce herhangi bir antikanser tedavi almış olması
- 3- Tam kan sayımında trombosit sayısının <100.000 olması
- 4- Akciğer kanseri dışında başka bir kanser tanısının bulunması

Her hasta için çalışmaya alınma ve çalışma dışında bırakılma ölçütleri değerlendirildi. Çalışma öncesi bronş karsinomu ön tanısıyla toraks ve üst batın bilgisayarlı tomografi sonucu evre IV olarak değerlendirilen ve diğer sistemlere ait metastaz semptom veya bulgusu olmayan hastalara daha ileri evreleme yapılmamıştır. Başlangıç değerlendirmesinde evre IV olmayan hastaların klinik evrelemeleri, kemik sintigrafisi, kraniyal MR ile veya PET-CT ile tamamlanmıştır. Tüm hastalarda tam kan sayımı, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri yapılmıştır. Bronkoskopik inceleme sırasında endobronşiyal lezyon görülenlerde forseps biyopsisi, endobronşiyal lezyonu olmayanlarda ise tümörün olduğu segmentten bronkoskopik fırçalama ve aspirasyon işlemleri yapılarak histopatolojik tanıları konmuştur.

Örneklerin alınması, saklanması ve hazırlanması:

BAL örneklerinin alınması:

Tanı amacıyla bronkoskopi uygulanacak olan hastalara (tümörü sağda olanlarda orta lobdan, tümörü solda olanlarda linguladan) lidokain lokal anestezisi ve midazolam premedikasyonu altında Olympus BF-1T180 marka fiberoptik video bronkoskop ile 20 cc'lik porsiyonlar halinde toplam 120 cc serum fizyolojik ile bronkoalveolar lavaj (BAL) yapıldı. Elde edilen BAL sıvısı cam tüplere alınıp, RNA yıkılımını önlemek için soğuk zincir kuralına uygun olarak yarım saat içinde laboratuvara ulaştırıldı. Örnekler hTERT ve hTR mRNA ekspresyon analiz gününe kadar -80°C'de saklandı.

Kan örneklerinin alınması:

Olgulardan bronkoskopi ile eş zamanlı Amerikan Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Kılavuzunda yer alan kan alma tekniğine uygun olarak, VEGF, b-FGF ve laktat dehidrogenaz (LDH) ölçümü için antikoagülsüz, tam kan sayımı için K₃EDTA'lı periferik venöz kan örnekleri alındı. Tüm örnekler alındıktan sonra yarım saat içinde Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Bilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı.. Antikoagülsüz örnek tüpleri, 1000g'de 15 dakika santrifuj edilerek, alikotlandıktan sonra VEGF ve b-FGF analiz gününe kadar -80°C'de saklandı.

3.2. Araç-Gereç:

Derin dondurucu	: Sanyo Ultra Low (-80°C)
Santrifüj	: Nüve NF 800 ve Eppendorf Centrifuge 5415 R
pH metre	: PHM92 LABpH Meter, Copenhagen
LightCycler Kapillerler	: Roche Diagnostics
LightCycler Cihazı	: Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
RNAaz DNAaz free pipet ucu	: Greiner bio-one
RNAaz DNAaz free 1.5ml vial	: Eppendorf
Vortex	: MS1 Minishaker, IKA-Works Inc.
Otomatik pipet	: Eppendorf Research
Vakumlu kan tüpü	: Vacutest Kima srl, Italy

3.3. Kitler ve Reaktifler:

RNA izolasyonunda kullanılan kit:

- High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

hTERT ve hTR m RNA Ekspresyon Analizinde Kullanılan Kitler:

- LightCycler Telo TAGGGG hTERT Kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- LightCycler Telo TAGGGG hTR Kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

VEGF-A Analizinde Kullanılan Kit:

- Human VEGF-A ELISA Kiti (BMS277/2 / BMS277/2TEN) Bender MedSystems GmbH Campus Vienna Biocenter 2 A.1030 Vienna, Austria, Europe.

b-FGF Analizinde Kullanılan Kit:

- Human FGF basic immunassay kiti- Qantikine DFB50, R&D Systems Inc. Minneapolis, United States of America.

3.4. Yöntemler:

RNA İzolasyon Yöntemi:

BAL örneklerinden total RNA izolasyonu, High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanılarak üreticinin talimatına uygun olarak gerçekleştirildi. Örneklerle eklenen lizis-binding tampon ile hücre lizisi ve RNAaz inaktivasyonu eş zamanlı olarak gerçekleştirildi. Daha sonra örnek içindeki nükleik asitler cam fiberlere tutturuldu. Genomik DNA bulaşımı engellemek için DNAaz ile muamele edilip, yıkama tamponları ile proteinler ve tuzlar uzaklaştırıldı. Elüsyon tamponu kullanılarak RNA geri elde edildi.

Telomeraz-Genleri hTERT ve hTR Ekspresyon Analizi:

Telomeraz komponentleri olan hTERT ve hTR analizleri, LightCycler cihazında one-step RT-PCR ile Telo TAGGGG hTERT ve Telo TAGGGG hTR kitleri kullanılarak yapıldı. Telomerazı (hTERT) kodlayan mRNA ve telomeraz-ilişkili RNA (hTR) revers transkripsiyona uğradıktan sonra, oluşan cDNA fragmanı spesifik

primerlerle amplifiye edildi. Oluşan amplifikasyon ürünleri, spesifik hibridizasyon problemleri kullanılarak yaydıkları fluoresans değeri ile saptandı.

Aşağıdaki RT-PCR protokolü kullanıldı:

- 60°C’de 10 dakika revers transkripsiyon
- 95°C’de 30 saniye denaturasyon
- Amplifikasyon
- 40°C’de 1 dakika soğuma

VEGF-A Analizi:

-80°C’de saklanan serum örnekleri oda sıcaklığında çözüldükten sonra, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi ile VEGF-A ölçümleri gerçekleştirildi. VEGF-A’ya spesifik bir poliklonal antikor ile kaplı mikropalakalara, 7 farklı konsantrasyondaki standart ve örnekler eklendi. Enkübyasyon basamağı sonrasında, bağlanmayan biyolojik materyal, yıkama basamağı ile uzaklaştırıldı. Ortama eklenen biotin kaplı anti-human VEGF-A antikoruna, VEGF-A-antikor kompleksine bağlandı. Enkübyasyon basamağı sonrasında, bağlanmayan biotin kaplı anti-human VEGF-A antikoruna yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırıldı. Ortama streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) eklendi. Enkübyasyon ve yıkama basamaklarından sonra ortama substrat çözeltisi eklendi. Asid ilavesi ile tepkime sonlandırıldı. Örnek ya da standarttaki human VEGF-A miktarı ile orantılı oluşan renkli ürünün absorbansı 450 nm’de ölçüldü. 7 farklı düzeydeki human VEGF-A standardı ile bir standard eğrisi çizdirilerek, örneklerdeki VEGF-A konsantrasyonları pg/ml olarak hesaplandı. Yöntemin analitik olarak alt saptama düzeyi 7.9 pg/ml, ölçümler arası değişkenlik katsayısı %6.2 idi.

b-FGF Analizi:

-80°C’de saklanan serum örnekleri oda sıcaklığında çözüldükten sonra, ELISA yöntemi (kantitatif sandwich enzim immünassay) ile b-FGF ölçümleri gerçekleştirildi. b-FGF’ye spesifik bir monoklonal antikor ile kaplı mikropalakalara 7 farklı konsantrasyondaki standart ve örnekler eklendi. Enkübyasyon basamağı sonrasında bağlanmayan biyolojik materyal, yıkama basamağı ile uzaklaştırıldı. Ortama HRP enzimi ile konjuge olmuş anti-FGF bazik antikorları eklendi. Enkübyasyon ve yıkama

işlemleri sonrasında ortama substrat çözeltisi eklendi. Asid ilavesi ile tepkime sonlandırıldı. Örnek ya da standarttaki b-FGF miktarı ile orantılı oluşan renkli ürünün absorbanı 450 nm'de ölçüldü. 7 farklı düzeydeki rekombinant human FGF bazik standardı ile bir standard eğrisi çizdirilerek, örneklerdeki b-FGF konsantrasyonları pg/ml olarak hesaplandı. Yöntemin analitik olarak alt saptama düzeyi 3 pg/ml, ölçümler arası değişkenlik katsayısı % 9.1 idi.

3.5. İstatistiksel Analiz:

Numerik değişkenlerde merkez ölçütü olarak ortanca, dağılım ölçütü olarak en düşük ve en yüksek değer (minimum-maksimum) kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ki-kare tabloları, diğerlerinde parametrik olmayan (Kruskal Wallis, Mann Whitney-U) testler seçildi. Değişkenler arası korelasyon analizi için Spearman korelasyon testi uygulandı. Yaşam analizi için Kaplan-Meier analizi seçildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi. Tüm uygulamalar, SPSS (Statistical Packages for Social Sciences) 13.0 programı ile gerçekleştirildi.

4. Bulgular

Bu çalışmaya yaşları 40-76 arasında değişen toplam 18 olgu (3 Kadın, 15 Erkek) dahil edildi. Tüm olgular ele alındığında yaş ortancası 59 (40-76) yıl olarak izlendi. Erkek olguların yaş ortancası 70.5 yıl iken, kadın olguların yaş ortancası 48 yıl idi. Dünya Sağlık Örgütü'nün akciğer kanseri sınıflamasına göre 3 olgu KHAK ve 15 olgu KHDAK olarak histopatolojik tanı aldı. Olgulardaki tümör çapları 3-7 cm (KHAK'de ortalama 4.3 cm, KHDAK ortalama 4.1 cm) arasında değişmekteydi.

Yedi hastada başka ek bir hastalık saptanmazken, kalan 11 hastada kronik obstruktif akciğer hastalığı, hipertansiyon, kolelitiazis ve romatoid artrit öyküsü alındı. Dört olguda plörezi saptandı. Olguların 3'ünde hiç sigara öyküsü yoktu. Diğer olgularda sigara içimi ortancası 45 (10-80) paket yılı olarak hesaplandı. Onbir olgu kemoterapi ve/veya radyoterapi tedavisi gördü, iki hastaya cerrahi tedavi uygulandı. Tedavi yanıtları incelendiğinde cerrahi tedavi alanlarda tam yanıt, 7 olguda kısmi yanıt, kalan 9 hastada ise progresyon izlendi. Dokuz aylık izlem süresi sonunda 8 hasta exitus olarak rapor edildi. Hastalara ait klinikopatolojik veriler çizelge 3'te özetlenmiştir.

Olgulardan alınan BAL örneklerinde gerçekleştirilen hTERT mRNA ekspresyon analiz sonuçları incelendiğinde tüm hastalar negatif, hTR mRNA ekspresyon analiz sonuçları incelendiğinde ise 8 hasta pozitif, kalan 10 hasta negatif olarak bulunmuştur. Tüm olgular ele alındığında serum VEGF-A düzey ortancası 685.69 (58.26-2488) pg/ml, serum b-FBF düzey ortancası 8.25 (3-16.73) pg/ml olarak bulundu. Hastalara ait analiz sonuçları çizelge 4 ve 5'te özetlenmiştir.

Olgular tedavi öncesi alınan BAL örneklerinde hTR mRNA negatif ya da pozitifliğine göre gruplandırılıp, kategorik veriler karşılaştırıldığında, metastaz varlığında ($P=0.03$) ve tedavi yanıtında ($P=0.015$) anlamlı bir fark izlendi. Metastaz olmayanların %83'ü hTR mRNA negatif, metastaz açısından 1a grubunda olanların %63'ü hTR mRNA negatif iken, 1b grubunda yani toraks dışı organ metastazı olanların hepsi hTR mRNA pozitif olarak saptandı. Tedaviye kısmi ya da tam yanıt verenlerin %89'u hTR mRNA için negatif bulunurken, progresyon gösterenlerin %78'i hTR

mRNA için pozitif idi. Ayrıca BAL hTR mRNA açısından negatif sonucun, sağ kalım üzerinde olumlu etkisi olduğu görüldü ($P=0.013$).

BAL hTR mRNA negatif olan olguların, pozitif olanlara kıyasla, serum VEGF-A, b-FGF düzeyi ve LDH enzim aktivitesi ortanca değerleri daha düşüktü ancak bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi. Metastazı olan olgular olmayanlar ile karşılaştırıldığında, serum LDH enzim aktivite ortancası, metastatik hastalarda anlamlı olarak daha yüksek (sırasıyla 797 U/L ve 341 U/L, $p =0.04$) saptandı. Spearman korelasyon analiz sonuçlarına göre serum VEGF-A düzeyleri ve LDH enzim aktivitesi ile sigara paket yılı arasında pozitif, serum LDH enzim aktivitesi ile progresyona kadar geçen süre ve sağ kalım arasında pozitif, trombosit sayısı ile sigara paket yılı arasında yine pozitif ilişki bulunmuştur (çizelge 6). Serum VEGF-A ve b-FGF düzeyleri için yapılan yaşam analizi her iki parametrenin sağ kalım süresine etkisi olmadığını göstermiştir.

Çizelge 3. Akciğer kanseri tanısı almış 18 olguya ait klinikopatolojik veriler.

No	Yaş	Cinsiyet	Sigara-Paket yılı	Tanı	T	N	M	Evre	Tedavi yanıtı	Progresyona kadar geçen süre (hafta)	Sağkalım (hafta)
2	65	E	45	KHAK	2a	2	0	3A	kısmi	yok	32
4	72	E	60	KHAK	2a	3	1b	4	progresyon	8	12 (ex)
14	58	E	50	KHAK	4	3	1b	4	progresyon	8	14 (ex)
7	57	E	yok	KHDAK (adenokarsinom)	4	3	0	3B	kısmi	12	26
13	60	E	40	KHDAK (adenokarsinom)	4	3	1a	4	progresyon	3	7 (ex)
8	74	E	45	KHDAK (skuamöz hücreli kanser)	4	2	1a	4	progresyon	2	3 (ex)
9	54	E	57	KHDAK (skuamöz hücreli kanser)	4	2	1b	4	progresyon	6	14 (ex)
15	63	E	30	KHDAK (skuamöz hücreli kanser)	2a	1	0	2B	tam yanıt	yok	20
16	56	K	yok	KHDAK (skuamöz hücreli kanser)	4	0	1a	4	kısmi	18	34
18	66	E	34	KHDAK (skuamöz hücreli kanser)	3	2	1a	4	kısmi	18	30
5	53	E	45	KHDAK (Pleomorfik karsinom)	1b	0	0	1b	tam yanıt	yok	32
1	65	E	40	KHDAK	2a	2	1a	4	progresyon	4	18
3	43	E	46	KHDAK	3	2	1b	4	progresyon	6	8
6	51	E	20	KHDAK	3	2	1a	4	kısmi	14	22 (ex)
10	68	E	10	KHDAK	4	3	0	3B	kısmi	14	28 (ex)
11	76	E	80	KHDAK	3	2	1a	4	kısmi	16	32
12	40	K	yok	KHDAK	4	2	0	3B	progresyon	18	29
17	48	K	10	KHDAK	3	2	1a	4	progresyon	4	28(ex)

Çizelge 4. Akciğer kanseri tanısı almış 18 olguya ait analiz sonuçları.

Hasta no	Tanı	BAL hTERT mRNA	BAL hTR mRNA	VEGF-A pg/ml	b-FGF pg/ml
2	KHAK	negatif	pozitif	502.08	11.84
4	KHAK	negatif	pozitif	1340.28	3
14	KHAK	negatif	pozitif	875.52	10.82
7	KHDAK (adenokarsinom)	negatif	negatif	58.26	8
13	KHDAK (adenokarsinom)	negatif	pozitif	370.54	11.84
8	KHDAK (skuamöz hücreli kanser)	negatif	pozitif	657.68	15.51
9	KHDAK (skuamöz hücreli kanser)	negatif	pozitif	908.72	8
15	KHDAK (skuamöz hücreli kanser)	negatif	negatif	299.1	15.51
16	KHDAK (skuamöz hücreli kanser)	negatif	negatif	59.36	14.9
18	KHDAK (skuamöz hücreli kanser)	negatif	negatif	1659.72	6.5
5	KHDAK (Pleomorfik karsinom)	negatif	negatif	1314.82	7
1	KHDAK	negatif	pozitif	713.7	3
3	KHDAK	negatif	pozitif	1990.74	16.73
6	KHDAK	negatif	negatif	545.64	8.5
10	KHDAK	negatif	negatif	125	10.61
11	KHDAK	negatif	negatif	1025.46	6
12	KHDAK	negatif	negatif	2488	3
17	KHDAK	negatif	negatif	250	6.5
KHAK: Küçük hücreli akciğer kanseri					
KHDAK: Küçük hücre dışı akciğer kanseri					
BAL: Bronkoalveolar lavaj					
hTERT: İnsan telomeraz revers transkriptaz					
hTR: İnsan telomeraz ilişkili RNA					
VEGF-A: Vasküler endotelial büyüme faktörü					
b-FGF: Bazik fibroblast büyüme faktörü					

Çizelge 5. Akciğer kanseri tanısı almış 18 olgunun laboratuvar verileri.

n = 18	Ortanca	Minimum-maksimum
VEGF (pg / ml)	685	58-2488
b-FGF (pg / ml)	8.25	3-16.73
LDH (U/L)	622	321-5471
Lökosit ($10^3 / \text{mm}^3$)	8.7	6.3-18.2
Trombosit ($10^3 / \text{mm}^3$)	246	138-876

Çizelge 6. Korelasyon analiz sonuçları.

	rho	p
VEGF-sigara paket yılı	0.532	0.023
LDH-sigara paket yılı	0.568	0.034
LDH- Progresyona kadar geçen süre	- 0.581	0.04
LDH-sağ kalm	-.0.722	0.004
Trombosit-sigara paket yılı	0.582	0.047

5. Tartışma, Sonuç ve Öneriler

Telomeraz kromozomal telomer uzunluğunun devamlılığını sağlayan bir ribonukleoproteindir. Telomeraz malign olmayan somatik hücrelerde aktif değilken, insanlarda izlenen bir çok kanserde aktiflenmektedir. Telomeraz aktivitesi konvansiyonel sitoloji ile birlikte kullanıldığında kolay elde edilebilen vücut sıvılarında ölçülebilen bir kanser belirteçidir.

Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP), dokularda telomeraz aktivitesinin belirlenmesinde sık kullanılan bir yöntemdir. Polimeraz zincir reaksiyonu-temeline dayanan TRAP metodu kullanılarak birçok neoplastik lezyonda telomeraz aktivitesi tespit edilmiştir (70, 71). Bu yöntemle KHAK'lilerin neredeyse tamamında, KHDAK'lilerin ise %80-85'inde telomeraz aktivitesi yüksek saptanmıştır (72, 73).

Hiyama ve ark.nın primer akciğer kanserli dokularda ve nonkanseroz dokularda telomeraz aktivitesini TRAP yöntemi ile incelediği bir çalışmada, telomeraz aktivitesi KHAK'li dokularda ve metastatik lezyonlarda yüksek olarak saptanırken, KHDAK'li dokularda ise daha düşük düzeylerde tespit edilmiştir. Bu durum KHDAK'lerinin primer olarak mortal kanser hücresi içerirken, KHAK'nin immortal kanser hücreleri içerdiği yorumuna yol açmıştır (39).

Xinarianos ve ark.nın şüpheli akciğer kanserli olguların bronşiyal lavaj örneklerinde TRAP yöntemi ile telomeraz aktivitesini ölçerek yaptığı bir çalışmada, telomeraz aktivitesinin akciğer kanserli olguların tanısında spesifik moleküler bir belirteç ve sitolojiye yardımcı tanısal bir yöntem olduğu belirlenmiştir (73).

Dikmen ve ark.nın akciğer kanseri ön tanısıyla başvuran hastaların bronşiyal lavaj örneklerinde telomeraz aktivitesinin tanısal önemini incelediği ve elde edilen sonuçları sitolojik inceleme ile kıyasladığı bir çalışmada, bronşiyal lavajda telomeraz aktivitesinin malignite tanısında yüksek duyarlılığa sahip bir belirteç olduğu ve akciğer kanseri tanısında sitolojik incelemeyi tamamlayıcı tanısal bir teknik olduğu sonucuna varılmıştır (74).

Ancak, TRAP analizi, fonksiyonel bir ribonükleoprotein gerektirdiğinden, ortamdaki protein aktivite inhibitörleri, proteazlar ve RNaz yöntemin dezavantajlarından olup, sensitiviteyi düşürebilmekte, dolayısıyla kantitasyonu zorlaştırmaktadır.

Real-time PCR, mRNA düzeylerinin tespitinde sıklıkla kullanılan, yeni enzim ve protokollerin geliştirilmesi ile ilerlemekte olan bir teknolojidir. Real-time PCR, küçük ve kısmen degrades olmuş RNA fragmanlarını saptayabilmektedir. RNA izolasyon etkinliği, RNA yıkımı veya RT inhibitörleri gibi analizi etkileyen parametreler için endojen kontrol içermektedir. Real-time PCR mRNA ekspresyonunu analiz etmek için northern blotting, *in situ* hibridizasyon ve konvensiyonel RT-PCR gibi yöntemlere kıyasla daha kullanışlı bir yöntemdir (75).

hTERT ekspresyonu ile telomeraz aktivitesi arasındaki ilişki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Telomeraz aktivitesi %85'den fazla insan tümöründe bulunduğu ve tümörojenik dokunun yaklaşık %85-95'i hTERT eksprese ettiği için, hTERT'in kanser tanısı için değerli bir belirteç olduğu düşünülmektedir (76). hTERT mRNA ekspresyonu birçok farklı tümör dokusunda incelenmiş ve semi-kantitatif yöntemlerle korele olduğu bulunmuştur. Ayrıca hTR mRNA ekspresyonu benign ve malign dokularda tespit edilmiş ancak telomeraz aktivitesi ile zayıf ilişkili bulunmuştur (5). Günümüzde çeşitli kanserlerde hTR'nin kullanımı ile ilgili olarak net bir sonuca varılamamıştır. Ancak bizim sonuçlarımızı incelediğimizde metastatik olguların tümünün hTR pozitif olduğu gözlenmiş, tedaviye yanıt açısından incelendiğinde ise progresyon gösteren olguların %78'inin hTR pozitif olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda uzak organ metastazı olan hastaların tamamında hTR mRNA'nın pozitif olması ve özellikle geniş hasta serilerinde bunun doğrulanması halinde gelecekte uzak organ metastazı taraması yapılması gereken hastaların belirlenmesi için hTR mRNA'nın biyobelirteç adayı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca yaşam analiz sonuçları incelendiğinde, BAL hTR mRNA negatifliğinin sağ kalım süresi üzerinde olumlu etkisi olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar bize BAL hTR mRNA ekspresyonunun akciğer kanseri için prognostik bir faktör olabileceğini düşündürmüştür.

Hara ve ark.nın KHDAK'de telomeraz aktivitesi ve hTERT mRNA ekspresyonunun klinikopatolojik önemini araştırdığı bir çalışmada, telomeraz aktivitesi ve hTERT mRNA ekspresyonunun lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu, telomeraz aktivitesinin tümör hücre diferansiyasyonu ve evrelendirmesi ile ilişkili olduğu ve hTERT pozitif

hastalarda hTERT negatif olanlara göre yaşam süresinin daha kısa olduğu saptanmıştır (42). Ancak Metzger ve ark.nın 2009 yılında yayınladığı, KHDAK'de hTERT mRNA ekspresyonunun ve telomeraz aktivitesinin prognostik belirteçler olup olmadığını araştırdığı çalışmada, telomeraz aktivitesinin sağkalım, evre ve histolojik tiple bir ilişkisine rastlanmazken, yüksek hTERT mRNA ekspresyonu gösteren olguların 5 yıllık sağkalım oranlarının daha iyi olduğu bulunmuştur (77).

Chen ve ark.nın telomeraz aktivitesi, hTR ve hTERT ekspresyonunun akciğer kanseri gelişimi ile ilişkisini inceledikleri bir çalışmada, akciğer kanser dokusunda telomeraz aktivitesi %79, hTR ekspresyonu %98.5 ve hTERT ekspresyonu %91.2 pozitif bulunmuştur. Komşu non-neoplastik dokuda ise telomeraz aktivitesine rastlanmazken, hTR ekspresyonu %91.2, hTERT ekspresyonu %10.2 pozitif saptanmıştır. hTERT ekspresyonu ile telomeraz aktivitesinin %88.9 uyum ile daha iyi ilişkili olduğu ve akciğer kanseri dokusundaki yüksek telomeraz aktivitesinin telomerazın tümör gelişiminde önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır. hTERT'e kıyasla hTR'nin, normal doku ve tümör dokusunda daha yüksek olarak eksprese oluşu, araştırmacılara yeterli miktarda hTR sentezinin kanser dokusunda telomerazın reaktivasyonu için bir ön koşul olabileceğini düşündürmüştür (43).

Miura ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, serum hTERT mRNA ekspresyonunun akciğer kanseri tanısında %89 sensitivite ve %72.7 spesifiteyle diğer tümör belirteçlerine göre daha üstün olduğu ve hTERT mRNA'nın EGFR mRNA ile kombine kullanıldığında pulmoner malignitelerin tanısında ve klinik evrenin belirlenmesinde iyi bir belirteç olduğu saptanmıştır (78). Pelosi ve ark.nın yaptıkları çalışmada ise KHDAK'li olguların bir kısmının plazmasında klinikopatolojik bulgulardan bağımsız olarak dolaşımda hTERT mRNA saptanmış ve bunun tanısal bir araç olabileceği sonucuna varılmıştır (79).

Fiberoptik bronkoskopi sırasında uygulanabilen bronkoalveolar lavaj asgari invaziv bir girişim olup, tanı ve alveolar düzeyde izlenen immunolojik, sitolojik, inflamatuvar ve infeksiyöz süreçler için önemli ipuçları veren bir tekniktir. 100 mL ve üstünde kullanılan hacimlerin yaklaşık bir milyon alveol hücresinden (akciğerin %1.5-3'ü) örnekleme yapabildiği kabul edilmektedir. BAL'ın hücresel ve sıvı komponentleri çeşitli akciğer hastalıklarında tanı koyma veya dışlama amacıyla rutin olarak kullanılmaktadır (80). BAL sıvısı doğrudan akciğer kaynaklı ve elde edilmesi doku

biyopsisi gibi yöntemlere göre daha kolay ve daha az invaziv olarak elde edilebilen bir materyal olduğu için bir çok hastalığın tanısı, tedavi yanıtının ve prognozunun belirlenmesi için kullanılmakta yada üzerinde çalışılmaktadır. Projemiz, bronkoskopi sırasında tümörün yerleşimi, tümör dokusuna ulaşılabilirlik gibi birçok faktörün önem kazandığı biyopsi işlemine göre, BAL örnekleminde çalışmanın daha uygulanabilir bir yöntem olduğu düşüncesinden yola çıkılarak tasarlanmıştır. Ancak çalışmamızda 18 olgunun tamamında BAL hTERT mRNA ekspresyon sonuçları negatif olarak bulunmuştur. Güncel literatür taraması yapıldığında bu konuda yapılan neredeyse tüm çalışmaların tümör dokusunda gerçekleştirildiği görülmüştür. BAL sıvısında yapılmış tek bir çalışmaya rastlanmış ve makalenin özetinde BAL'da hTERT gen ekspresyon düzeylerinin saptanmasının akciğer kanserli olguların erken ve ayırıcı tanısında faydalı olabileceği ifade edilmiştir. Ancak makale Çince olduğu için tamamına ulaşılamamıştır (81). BAL hTERT mRNA ekspresyon sonuçlarımız göz önüne alındığında, BAL sıvısının tümöral hücre popülasyonunu klinik uygulamaya etkili olacak şekilde yansıtmadığı görüşündeyiz. Olgu sayısı düşük olan projemiz bir ön çalışma olarak kabul edilip, bu görüşümüz daha geniş ve homojen hasta serilerinde yapılacak çalışmalarla doğrulanmalıdır.

Tanısal bir araç olarak kullanılmasının dışında telomerazı hedef alan ilaçların terapötik potansiyeli olduğu da bilinmektedir (38, 82).

Anjiyogenez tümörün büyümesi ve metastazı için gerekli bir süreçtir. Tüm kanser olgularında anjiyogenez özellikle tümörün metastaz yapabilme gücünü kontrol etmektedir. Bu nedenle tanı almış kişilerde tedavi öncesi vücut sıvılarında bakılacak ve tedavi alan kişilerde sağ kalım ve/veya prognoz için öngörü yaptırabilme özelliği olan biyolojik belirteçlerin tanımlanması son derece önemlidir. VEGF ve b-FGF dolaşımında bulununan ve anjiyogenez yapabilme yetisine sahip iki anjiyojenik faktördür. VEGF'in tümör büyümesi ve metastazı açısından önemli etkileri göz önüne alındığında tümörün anjiyojenik potansiyeli ve biyolojik saldırganlığının göstergesi için bir belirteç olabileceğine dair veriler mevcuttur (83, 84, 85). Tümör anjiyogenezinde VEGF ekspresyonu ve sağ kalım arasındaki ilişki son on yıldır incelenmekteyse de çalışmalardan çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda VEGF mRNA ekspresyon ve protein düzeyinin akciğer kanserinde bağımsız prognostik belirteçler olduğu ileri sürülmektedir (86, 87, 88). Yüksek serum VEGF düzeyinin tümör yükü ve

prognoz ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır (89). Genel olarak yüksek VEGF izlenen hastalarda sağ kalım oranlarının düştüğü ileri sürülmektedir (90, 91, 92, 93). Çalışmamızda, serum VEGF-A düzeyleri için yapılan yaşam analizi bu ölçümün sağ kalım süresine etkisi olmadığını göstermiştir. Ancak sigara içme süresi ve VEGF düzeyleri arasında bulunan anlamlı pozitif ilişki, hipoksi düzeyinin etkili olduğunu hipotezini desteklemektedir. Konuyla ilgili değişik grupların yaptığı çalışmalar arasındaki farklı sonuçlar bu noktada klinik uygulamada kullanılacak verilerin değerini düşürmektedir. Bu bağlamda bir kaç noktaya değinilmesi gerekmektedir. Çalışmalarda VEGF düzeyinin saptanmasında değişik örnek tipleri kullanılmaktadır. En sık izlenen örnek tipi biyopsi sonucu elde edilen tümör dokusudur. Bu tip çalışmalarda genellikle VEGF ile prognoz açısından bağıntı kurulmaktadır, ancak kan örneği kullanılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında yanlılığın söz konusu olabileceğini düşünmekteyiz. Kan örnekleri ise plazma veya serum olarak iki farklı şekilde incelenebilir. Serum VEGF değerleri plazma değerlerinden yüksektir, çünkü pıhtılaşma sırasında ex vivo trombosit ve lökositlerden salınım gerçekleşir ve bu hücrelerde VEGF sentezi yapılabildiği bilinmektedir. Serum örneği kullanılan çalışmalarda da bu açıdan yanlılık meydana gelebilir (89, 94).

Elde edilen çalışmaların karşılaştırılabilirliği konusunda kafa karıştıran diğer bir nokta ise VEGF ölçümlerinde kullanılan yöntemlerdir. VEGF düzeyi ve tanımı için birden fazla laboratuvar yöntemi kullanılabilir. En eski ve belki de en yaygın kullanılan ve doku çalışmalarında tercih edilen immunohistokimyasal yöntemdir (95). Diğer iki yöntem ise ELISA ve RT-PCR olarak belirtilmektedir (90, 96). İmmunohistokimyasal yöntemlerde kullanılan antikörlerin idantik olmaması ve farklı eşik değer uygulamaları çalışmaların karşılaştırılabilirliğini güçleştirmektedir. Bu nedenle bu biyolojik belirteci değerlendirmek için iyi tanımlanmış, sonuç tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu standardize yöntem seçimi son derece önem kazanmaktadır. Son olarak VEGF düzeylerinin kanser dokusuna spesifik olmadığı, artmış veya azalmış VEGF düzeylerinin solunum sistemin akut respiratuvar sendrom, astım, kronik obstruktif akciğer hastalığı, obstruktif uyku apnesi ve idiyopatik pulmoner fibrozis gibi değişik hastalıklarında izlenebildiği akılda tutulmalıdır (97, 98, 99).

Yüksek b-FGF düzeyleri kanserli hastaların serum ve idrar örneklerinde incelenmiş ve kafa ve boyun tümörlerinde tümör büyüklüğü ile ilişkisi kanıtlanmıştır (100, 101,

102, 103, 104, 105, 106). Benzer ilişki akciğer kanseri için henüz ortaya konmamıştır, ancak temel sorun gerek analitik yöntemler gerekse örnek hazırlığı ile ilgili standardize koşulların oluşturulmamış olmasıdır.

Chei ve arkadaşları KHDAK'li hastalarda lökosit ve trombosit düzeyleri ve VEGF arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir (107), ancak bizim yapmış olduğumuz çalışmadaki hasta grubumuzda böyle bir ilişki saptamadık. Artmış LDH aktivitesinin KHAK'nde negatif prognostik değeri olduğu bildirilmiştir (108, 109). Benzer bir ilişki bizim çalışmamızda da LDH ve sağ kalım ile progresyona kadar geçen süre arasındaki korelasyonla saptanmıştır. Çalışmamızda trombosit sayısı ve sigara paket yılı arasında da korelasyon olduğu belirlenmiştir. Etki mekanizması kesin bilinmemekle birlikte sigara içenlerde trombosit sayısında ve agregasyon özelliğinde artış olduğu bilinmekte (110) ve sigaraya bağlı kardiyovasküler hastalık gelişiminde bunun etkili olduğu kabul edilmektedir.

Akciğer kanserinde BAL hTR mRNA'nın uzak organ metastazının gösterilmesi, tedavi yanıtı ve prognozun belirlenmesinde yararlı olabileceği, serum VEGF-A ve b-FGF'nin ise uzak organ metastazı ve prognozun belirlenmesinde katkısının olmadığı sonucuna varılmıştır, ancak gelecek vaad eden biyobelirteçlerin prospektif validasyonu dikkatlice planlanmış randomize klinik çalışmalarda standard protokoller kullanılarak ortaya konmalıdır.

6. Kaynaklar

1. Alberg A, Ford J, Samet J. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2007;132:29-55.
2. Coate LE, John T, Tsao M, Shepherd FA. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet (Oncology)* 2009;10:1001-10.
3. Bunn PA. Molecular biology and early diagnosis in lung cancer. *Lung Cancer* 2002;38:5-8.
4. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997 Aug 15;277(5328):955-9.
5. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):785-95.
6. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA et al. The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995 Sep 1;269(5228):1236-41.
7. Fernandez-Garcia I, Ortiz-de-Solorzano C, Montuenga LM. Telomeres and Telomerase in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2008;3(10):1085-88.
8. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* 1997; 33: 787-91.
9. Sandler AB, Johnson DH, Herbst RS: Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(12 Pt 2):4258-62.
10. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.
11. Uluslar arası Akciğer ve Plevra Maligniteleri Sempozyumu, İstanbul, 15-17 Kasım 2007
12. Fidaner C, Eser SY, Parkin DM. Incidence in Izmir in 1993-1994: first results from Izmir Cancer Registry. *Eur J Cancer* 2001;37:83-92.
13. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(1):10-30.

14. Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161: 1355-67.
15. Spiro SG, Porter JC: Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1166-96.
16. Skuladottir H, Olsen JH, Hirsch FR. Incidence of lung cancer in Denmark: historical and actual status. *Lung Cancer* 2000;27:107-118.
17. Cha Q, Chen Y, Du Y. The trends in histological types of lung cancer during 1980-1988, Guangzhou, China. *Lung Cancer* 1997;17:219-30.
18. Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung cancer in Turkey 1994-1998. *Respiration* 2002;69:207-10.
19. Ricardo Luiz De Menezes Duarte, Marcos Eduardo Machado Paschoal. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. *J Bras Pneumol*. 2005; 32(1):56-65.
20. De Stefani E, Boffetta P, Ronco AL, Brennan P, Correa P, Deneo-Pellegrini H, et al. Squamous and small cell carcinomas of the lung: similarities and differences concerning the role of tobacco smoking. *Lung Cancer* 2005;47(1):1-8.
21. Brownson RC, Chang JC, Davis JR. Gender and histologic type variations in smoking-related risk of lung cancer. *Epidemiology* 1992;3(1):61-4.
22. Dresler CM, Gritz ER. Smoking, smoking cessation and the oncologist. *Lung Cancer*. 2001;34(3):315-23.
23. Wei Q, Cheng L, Hong WK, Spitz MR. Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients. *Cancer Res* 1996;56(18):4103-7.
24. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. 1996;274(5293):1672-7.
25. Niklinski J, Niklinska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001;34 Suppl 2:53-8.
26. Sanchez-Cespedes M, Ahrendt SA, Piantadosi S, Rosell R, Monzo M, Wu L, et al. Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers. *Cancer Res*. 2001;61(4):1309-13.

27. Burke L, Flieder DB, Guinee DG, Brambilla E, Freedman AN, Bennett WP, et al. Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(1):232-41.
28. Steels E, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mascaux C, et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur Respir J*. 2001;18(4):705-19.
29. Shogi T, Tanaka F, Tanaka T, Yanagihara K, Otake Y, Hanaoka N, et al. Clinical significance of p21 expression in nonsmall-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(18):3865-71.
30. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990 May 31;345(6274):458-60.
31. Harley CB. Telomere loss: Mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat. Res*. 1991;256:271-82.
32. Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*. 1989;59(3):521-9.
33. Wright WE et al. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet*. 1996;18:173-9.
34. Broccoli D et al. Telomerase activity in normal and hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:9082-6.
35. Counter C.M. et al. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 1995;85:2315-20.
36. Taylor RS. et al. Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions. *J. Invest. Dermatol*. 1996;106:759-65.
37. Hiyama E. et al. Telomerase activity in human intestine. *Int. J. Oncol*. 1996;9:453-58.
38. Lichtsteiner SP, Lebkowski JS, Vasserot AP. Telomerase. A Target for Anticancer Therapy. *Ann NY Acad Sci* 1999;886:1-11.
39. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:895-902.

40. Albanell J, Lonardo F, Rusch V, et al. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1609–15.
41. Arinaga M, Shimizu S, Gotoh K, et al. Expression of human telomerase subunit genes in primary lung cancer and its clinical significance. *Ann Thorac Surg* 2000;70:401–6.
42. Hara H, Yamashita K, Shinada J, et al. Clinicopathologic significance of telomerase activity and hTERT mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;34:219–26.
43. Chen W, Xiong X, Zhou H, Zhou Q. Expression of telomerase activity, telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in lung cancer. *Chinese Medical Journal* 2002;115(2):290-2.
44. Brattström D, Bergqvist M, Hesselius P, Larsson A, Lamberg K, Wernlund J, Brodin O, Wagenius G. Elevated preoperative serum levels of angiogenic cytokines correlate to larger primary tumours and poorer survival in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2002 Jul;37(1):57-63.
45. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
46. Folkman J. What is the evidence that tumours are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
47. Papaioannou AI, Kostikas K, Kollia P, Gourgoulisanis KI. Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe? *Respir Res*. 2006;7(128): 1-13.
48. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182–6.
49. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669-76.
50. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000;11(6):617-24.
51. Zebrowski BK, Yano S, Liu W, Shaheen RM, Hicklin DJ, Putnam JB, Jr., Ellis LM. Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 1999;5(11):3364-8.

52. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999;13(1):9-22.
53. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-5.
54. Salven P, Orpana A, Joensuu H. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin. Cancer Res.* 1999;5:487–91.
55. Salven P, Orpana A, Alitalo K, Joensuu H. Serum VEGF is often elevated in disseminated cancer. *Clin. Cancer Res.* 1997;6:647–52.
56. Yamamoto Y and 12 others. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 1996;2:821–6.
57. Cressey R, Wattananupong O, Lertprasertsuke N, Vinitketkumnuen U. Alteration of protein expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) from soluble to cell-associated isoform during tumourigenesis. *BMC Cancer* 2005;5(128): 1-8.
58. Kishiro I, Kato S, Fuse D, Yoshida T, Machida S, Kaneko N. Clinical significance of vascular endothelial growth factor in patients with primary lung cancer. *Respirology* 2002;7(2):93-8.
59. Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer.* 2006;51(2):143-58.
60. Delrieu I. The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism. *FEBS Lett* 2000;468:6-10.
61. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L. Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *J Cell Physiol Suppl* 1987;5:15-26.
62. Friesel RE and Maciag T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB J.* 1995;9:919–25.
63. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G and Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr. Rev.* 1997;18:26–45.

64. Hori A, Sasada R, Matsutani E, Naito K, Sakura Y, Fujita T and Kozai Y. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* 1991;51:6180–4.
65. Brunner G, Nguyen H, Gabrilove J, Rifkin DB and Wilson EL. Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cells. *Blood* 1993;81:631–8.
66. Gu XF, Bikfalvi A, Chen YZ, Caen JP and Han ZC. Constitutive and selective expression of basic fibroblast growth factor in human leukaemia cell lines. *Eur. J. Haematol.* 1995;55:189–94.
67. Peoples GE, Blotnick S, Takahashi K, Freeman MR, Klagsbrun M and Eberlein TJ. T lymphocytes that infiltrate tumors and atherosclerotic plaques produce heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor: a potential pathologic role. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995;92: 6547–51.
68. Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberlein TJ and Klagsbrun M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4₊ and CD8₊ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994;91:2890–4.
69. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M et al. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995;92:4606–10.
70. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994 Dec 23;266(5193):2011-5.
71. Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol.* 1996 Jan;8(1):66-71.
72. Yashima K, Litzky LA, Kaiser L, et al. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:2373–7.

73. Xinarianos G, Scott FM, Liloglou T, et al. Evaluation of telomerase activity in bronchial lavage as a potential diagnostic marker for malignant lung disease. *Lung Cancer* 2000;28:37–42.
74. Dikmen E, Kara M, Dikmen G, Çakmak H and Dogan P. Detection of telomerase activity in bronchial lavage as an adjunct to cytological diagnosis in lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;23:194-9.
75. Takihana Y, Tsuchida T, Fukasawa M, Araki I, Tanabe N and Takeda M. Real-time quantitative analysis for human telomerase reverse transcriptase mRNA and human telomerase RNA component mRNA expressions as markers for clinicopathologic parameters in urinary bladder cancer. *International Journal of Urology* 2006;13:401–8.
76. Yoo J, Park SY, Kang SJ, Kim BK, Shim SI, Kang CS. Expression of telomerase activity, human telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase in gastric adenocarcinoma. *Mol. Pathol.* 2003; 16: 700–7.
77. Metzger R, Vallbohmer D, Müller-Tidow C, Higashi H, Bollschweiler E, et al. Increased human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA expression but not telomerase activity is related to survival in curatively resected non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2009;29(4):1157-62.
78. Miura N, Nakamura H, Sato R, Tsukamoto T, Harada T et al. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Sci* 2006;97:1366–73.
79. Pelosi G, Schianchi E, Dell’Orto P, Veronesi G, Spaggiari L et al. Detecting cell-free circulating hTERT mRNA in the plasma may identify a subset of nonsmall cell lung cancer patients. *Virchows Arch* 2006;448:7–15.
80. American Thoracic Society Statement: Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 2001;142:481–6.
81. Ma G, Gao JS, Tong M, Xiong JG, He YS, Rong TH. Detection of telomerase hTERT gene expression of exfoliated cell in broncho-alveolar lavage fluid. *Ai Zheng* 2002;21(5):533-5.
82. White LK, Wright WE, Shay JW. Telomerase inhibitors. *Trends Biotechnol* 2001;19:114–20.

83. Ilhan N, Deveci F: Functional significance of vascular endothelial growth factor and its receptor (receptor-1) in various lung cancer types. *Clin Biochem* 2004, 37(9):840-5.
84. Tanno S, Ohsaki Y, Nakanishi K, Toyoshima E, Kikuchi K: Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3. *Lung Cancer* 2004, 46(1):11-19
85. Ludovini V, Gregorc V, Pistola L, Mihaylova Z, Floriani I, Darwish S, Stracci F, Tofanetti FR, Ferraldeschi M, Di Carlo L et al: Vascular endothelial growth factor, p53, Rb, Bcl-2 expression and response to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004, 46(1):77-85.
86. Ohta Y, Endo Y, Tanaka M, et al. Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1411–6.
87. Fontanini G, Boldrini L, Chine S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1999; 79: 363–9.
88. Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, et al. Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997; 3:861–5.
89. Kaya A, Ciledag A, Gulbay BE, et al. The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir Med* 2004; 98: 632–6.
90. Shimanuki Y, Takahashi K, Cui R, Hori S, Takahashi F, Miyamoto H, Fukurchi Y: Role of serum vascular endothelial growth factor in the prediction of angiogenesis and prognosis for non-small cell lung cancer. *Lung* 2005, 183(1):29-42.
91. Agnantis NJ, Goussia AC, Batistatou A, Stefanou D: Tumor markers in cancer patients. an update of their prognostic significance. Part II. *In Vivo* 2004, 18(4):481-8.
92. Dudek AZ, Mahaseth H: Circulating angiogenic cytokines in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with treatment response and survival. *Cancer Invest* 2005; 23(3):193-200.

93. Laack E, Scheffler A, Burkholder I, Boeters I, Andritzky B, Schuch G, Gorn M, Vohwinkel G, Edler L, Fiedler W et al: Pretreatment vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) serum levels in patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2005; 50(1):51-8.
94. Matsuyama W, Hashiguchi T, Mizoguchi A, Iwami F, Kawabata M, Arimura K, Osame M: Serum levels of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer. *Chest* 2000; 118(4):948-51.
95. Kadota K, Huang CL, Liu D, et al. The clinical significance of lymphangiogenesis and angiogenesis in non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer* 2008;44:1057–67.
96. Takenaka K, Katakura H, Chen F, et al. The ratio of membranebound form Flt-1 mRNA to VEGF mRNA correlates with tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2007;246:34 – 40.
97. Thickett DR, Armstrong L, Christie SJ, Millar AB: Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(9):1601-5.
98. Feltis BN, Wignarajah D, Zheng L, Ward C, Reid D, Harding R, Walters EH: Increased vascular endothelial growth factor and receptors: relationship to angiogenesis in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(11):1201-7.
99. Tuder RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, Voelkel NF, Flores SC: Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29(1):88-97.
100. Cronauer, M. V., Hittmair, A., Eder, I. E., Hobisch, A., Culig, Z., Ramoner, R., Zhang, J., Bartsch, G., Reissigl, A., Radmayr, C., Thurnher, M., and Klocker, H. Basic fibroblast growth factor levels in cancer cells and in sera of patients suffering from proliferative disorders of the prostate. *Prostate* 1997; 31: 223–33.
101. Landriscina, M., Cassano, A., Ratto, C., Longo, R., Ippoliti, M., Palazzotti, B., Crucitti, F., and Barone, C. Quantitative analysis of basic

- fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 1998; 78: 765–70.
102. Chodak, G. W., Hospelhorn, V., Judge, S. M., Mayforth, R., Koeppen, H., and Sasse, J. Increased levels of fibroblast growth factor-like activity in urine from patients with bladder or kidney cancer. *Cancer Res* 1988; 48: 2083-8.
 103. Nguyen, M., Watanabe, H., Budson, A. E., Richie, J. P., Hayes, D. F., and Folkman, J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)* 1994; 86: 356–61.
 104. O'Brien, T. S., Smith, K., Cranston, D., Fuggle, S., Bicknell, R., and Harris, A. L. Urinary basic fibroblast growth factor in patients with bladder cancer and benign prostatic hypertrophy. *Br. J. Urol.* 1995; 76: 311–4.
 105. Ugurel, S., Rapp, G., Tilgen, W., and Reinhold, U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19: 577–83.
 106. Leunig, A., Tauber, S., Spaett, R., Grevers, G., and Leunig, M. Basic fibroblast growth factor in serum and urine of patients with head and neck cancer. *Oncol. Rep.* 1998; 5: 955–8.
 107. Choi JH, Kim HC, Lim HY, et al. Vascular endothelial growth factor in the serum of patients with non-small cell lung cancer: correlation with platelet and leukocyte counts. *Lung Cancer* 2001;33: 171–9.
 108. Lassen U, Osterlind K, Hansen M, Dombernowsky P, Bergman B, Hansen HH. Long-term survival in small-cell lung cancer: posttreatment characteristics in patients surviving 5 to 18+ years: an analysis of 1,714 consecutive patients. *J. Clin. Oncol* 1995;13(5):1215–20.
 109. Byhardt RW, Hartz A, Libnoch JA, Hansen R, Cox JD. Prognostic influence of TNM staging and LDH levels in small cell carcinoma of the lung (SCCL). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* 1986;12(5):771– 7.
 110. Nowak J, Murray JJ, Oates JA, et al. Biochemical evidence of a chronic abnormality in platelet and vascular function in healthy individuals who smoke cigarettes. *Circulation* 1987;76:6-14.