

PROSTAT KANSERLİ ve BENİNG PROSTAT HİPERPLAZİLİ HASTALARDA PLAZMA VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ, OKSİDATİF STRES VE NİTRİK OKSİT İLİŞKİSİ

Dilara SEÇKİN¹ Rahmi ONUR² Nevin İLHAN¹ Aslan ARDIÇOĞLU² Necip İLHAN¹

¹Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 14.10.2005 Kabul Tarihi: 29.12.2005

ÖZET

Bu çalışmada, benign prostat hiperplazili (BPH) ve prostat kanserli (PCa) hastalarda plazma vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) düzeyi ve VEGF'nin oksidatif stres ve nitrik oksit (NO) ile olan ilişkisi değerlendirilmiştir. BPH ve prostat kanseri saptanan toplam 64 hastadan venöz kan alınarak plazma VEGF, MDA ve NO düzeyleri ölçüldü. PCa'lı hastalardaki plazma VEGF seviyeleri, BPH'lı hastalardakine göre anlamlı derecede yüksekti. ($61,98 \pm 14,62$ pg/ml ile $38,63 \pm 12,74$ pg/ml, $p < 0,05$). PCa'lı hastalarda artmış plazma malondialdehit (MDA) ve artmış nitrik oksit (NO) seviyeleri tespit edildi. Sonuçlarımız, malign prostat hastalığının patogeneğinde birkaç faktörün rol oynayabileceğini ve anjiyogenik stimulus, oksidatif stres ve NO ekspresyonu arasında sıkı bir ilişkiyi ortaya koymuştur. İnsan prostat kanseri etyopatogeneğinde ve tedavisinde anjiyogenez ve antioksidan stratejiler ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Malondialdehit, Nitrik Oksit, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü.

ABSTRACT

The Relationship Between Plasma Vascular Endothelial Growth Factor, Oxidative Stress and Nitric Oxide in Patients With Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia

In the present study, the role of plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) and its association with oxidative stress and nitric oxide (NO) was evaluated in patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostatic carcinoma (PCa). The plasma VEGF levels in patients with prostatic carcinoma were significantly higher than in patients with BPH ($61,98 \pm 14,62$ pg/ml vs $38,63 \pm 12,74$ pg/ml, $p < 0,05$). Increased VEGF levels was detected concomitantly with increased plasma malondialdehyde (MDA) and NO levels in patients with PCa. Our results demonstrated the close relation between the angiogenic stimuli, oxidative stress and NO expression, which may be several of the contributing factors in the pathogenesis and disease status of malignant prostate. We believe that our data support further study of antiangiogenesis and antioxidant strategies for the treatment of human prostate cancer.

Key Words: Malondialdehyde, Nitric Oxide, Vascular Endothelial Growth Factor.

GİRİŞ

Prostat kanseri (PCa), çok sık tanı konulan ve batılı ülkelerde erkek popülasyonda kanserle ilişkili başta gelen ölüm sebeplerinin ikincisi olarak bildirilmiştir (1). Prostat spesifik antijen (PSA) PCa'da en önemli ve yaygın şekilde kullanılan tümör markırı olmasına rağmen, PSA'nın benign veya malign prostat tümörlerini doğru şekilde ayırt edebilmek için sensitivite ve spesifiteye ihtiyacı vardır (2).

PCa rekürrenslerinin tespitinde veya değişik tanılarda diğer biyokimyasal markırların kullanımı için giderek artan kanıtlar vardır (2, 3). Yakın zamanda, büyüme faktörlerinin üretimindeki ve onların reseptörlerinin ekspresyonundaki anormalliklerin PCa'yı da içeren birçok solid tümörün patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (4, 5). VEGF potent bir anjiyogenik faktördür. Değişik çalışmalarla, PCa'da mezenkimal epitelyal

etkileşimlerin, tümör proliferasyonunda kritik bir rol oynayan VEGF tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (6). Solid tümörlerin karsinogenezi-sinde VEGF'nin rolünü değerlendiren çalışmalar, VEGF'nin direk anjiyogenik etkilere sahip olmakla beraber, aynı zamanda NO ve serbest oksijen radikalleri gibi diğer potansiyel endojen faktörlerle kompleks ilişkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur (7). Bir tümörün oksijenasyon durumunun, tümör agresifliği veya metastazı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir ve artmış seviyede reaktif oksijen türevleri ile oluşturulan bir çevrede, kanser hücrelerinin anjiyogenik proteinler sekrete ederek hipoksiye adapte olduğu gösterilmiştir (8, 9). Ayrıca endotelial hücreler için selektif olarak mitojenik olduğu bilinen VEGF'nin artışı, hem in vivo hem de in vitro olarak endotelial hücreler tarafından NO üretimini stimüle eder (7, 8).

Kanser gibi birçok hastalıkta lipid peroksidasyonunun rol oynadığı bilinmektedir. Lipid peroksidasyonunun ikinci bir ürünü olan malondialdehid (MDA) doku reaksiyon zincir hızının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (10). Lipid hidroperoksitler doğrudan DNA zincirini kırabilir ve lipid peroksil ve alkoksil radikalleri DNA'da oksidasyona sebep olabilir. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (11)

Potent bir anjiyogenik faktörün rolünü araştırmak ve onun artmış oksidatif stres ve NO ile olan ilişkisini belirlemek için, histopatolojik olarak tanı konulmuş ancak tedavi edilmemiş BPH ve PCa'lı hastalarda VEGF, MDA ve NO (nitrit+nitrat) seviyelerini karşılaştırdık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Alt üriner sistem şikayetleri nedeniyle Fırat Tıp Merkezi Üroloji Kliniği'ne başvuran 75 erkek hasta çalışmaya dahil edildi. Tüm hastalar detaylı bir anamnez ve dijital rektal muayeneyi içeren fizik muayene ile değerlendirildi. Rutin biyokimyasal ve PSA incelemeleri tüm hastalarda yapılırken, gerekli olgularda transrektal inceleme ve/veya biyopsi uygulandı. Alt üriner sistem şikayetleri için herhangi bir tedavi uygulanan (daha önceki anti-androjen veya radyasyon terapisi, medikal veya cerrahi tedaviler gibi), üriner sistem enfeksiyonu olan, yakın dönemde akut üriner retansiyon gelişmiş, kronik prostatit ve/veya akut inflamasyon öyküsü olan, serebrovasküler hastalığı, diabetes mellitusu, tiroid hastalığı, renal yetmezliği veya karaciğer hastalığı olan toplam 11 hasta çalışmadan çıkarıldı.

BPH (n: 38) ve PCa'lı (n: 26) hastalardan venöz kan (10 ml) alınarak, K₂EDTA içeren tüplerde saklandı. Kan örnekleri 10 dakika süreyle 8000 g devirde Hettich Universal/K2S (Almanya) marka santrifüj cihazı kullanılarak santrifüj edildi, plazması ayrıldıktan sonra analiz yapılncaya kadar - 20 °C'de donduruldu. VEGF, MDA ve NO'nin plazma seviyeleri tüm bireylerde ölçüldü. Serum VEGF seviyesi üretici protokolüne göre uygun ticari ELISA kiti (R & D sistemleri, Minnesota, MN, USA) kullanılarak belirlendi. MDA düzeyi Ohkawa ve arkadaşlarının (12) modifiye ettiği yöntemle göre saptanmıştır. Plazma NO seviyeleri ise Griess reaksiyonu kullanılarak ölçüldü (13).

Veriler SPSS 11,5 istatistik paketi kullanılarak değerlendirildi.

BULGULAR

PCa'lı hastalarda yaş ortalaması 72,09 ± 7,56 (53-84 arası) iken, BPH'lı hastalarda yaş ortalaması 69,59 ± 7,62 (55-80 arası) idi (p=0,34). Prostat

volümünün TRUS ile ölçümü PCa'lı ve BPH'lılarda sırasıyla 70,81 ± 26,73 cm³ ve 62,48 ± 20,40 cm³ olarak belirlendi. PCa'lı ve BPH'lı hastalar arasında prostat volümü açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p=0,27). Anormal dijital rektal muayenesi olan hastalara TRUS eşliğinde prostat biyopsisi uygulandı. 26 olguda prostat biyopsisi adenokarsinom için pozitif. 38 hastada ise BPH saptandı.

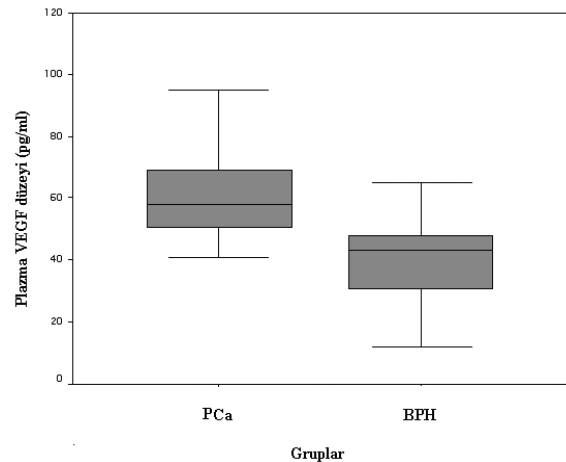
Hastalara ait Prostat Spesifik Antijen (PSA) ve serbest PSA (f-PSA) düzeyleri Tablo 1'de verilmiştir. Prostat kanserli hastalarda PSA düzeyi BPH'lı hasta grubuna göre daha yüksek olup bu istatistiksel olarak anlamlıdır. Ancak, her ne kadar f-PSA düzeyi BPH'lı hastalarda PCa'lı hastalara göre daha yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır.

Plazma VEGF düzeyleri prostatik kanserli hastalarda BPH'lı hastalara göre anlamlı derecede yüksek saptandı. (61,98 ± 14,62 pg/ml ve 38,63 ± 12,74 pg/ml; p< 0,05) (Şekil 1). Her iki grup, plazma NO düzeyleri açısından karşılaştırıldığında PCa'lı hastalarda benzer bir artış saptandı (p< 0,05) (Şekil 2). PCa'lı hasta grubu ve BPH'lı hasta grubu oksidatif stres açısından karşılaştırıldıklarında, PCa'lı hastalarda plazma MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (6,18 ± 1,30 nmol/mL ile 4,78 ± 0,68 nmol/mL, p< 0,05) (Şekil-3). PCa'lı hastalarda VEGF, NO ve MDA'nın artmış düzeyleri tespit edilmiştir.

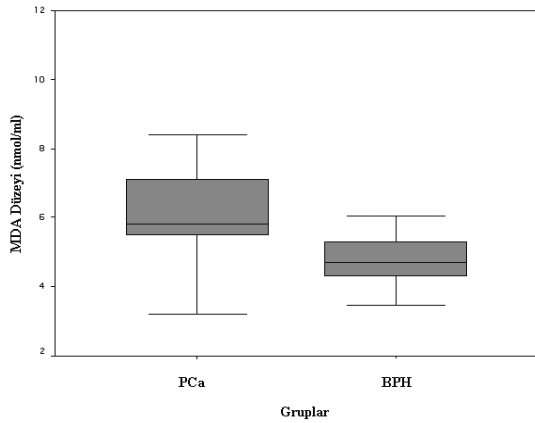
Tablo 1. BPH ve PCa'lı hastaların PSA ve f-PSA düzeyleri

	BPH	PCa	P değeri
PSA (ng/mL)	9.17+13.33	38.00+41.31	<0.05
f-PSA (ng/mL)	1.81+1.96	5.69+7.43	AD

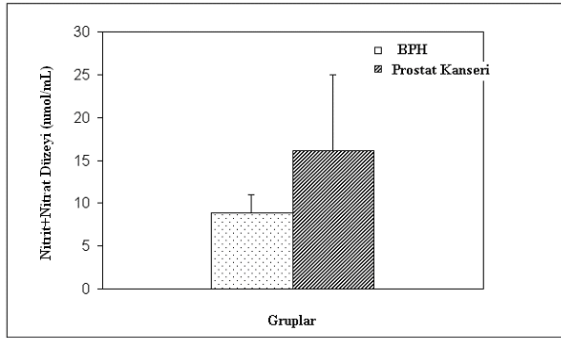
AD;Anlamlı değil



Şekil 1. Prostat kanserli (PCa) ve BPH'lı hastalarda ortalama VEGF düzeyleri



Şekil 2. Prostat kanserli (PCa) ve BPH'lı hastalarda plazma ortalama malondialdehit düzeylerinin karşılaştırılması



Şekil 3. BPH'lı ve prostat kanserli hastalarda Nitrik oksit düzeyleri

TARTIŞMA

Büyüyen bir tümörde yer alan yeni bir mikrovasküler ağ gelişiminde anjiogenezin, hem lokal tümör büyümesinde hem de yayılmış tümörün son halinde major bir rol oynadığı gösterilmiştir (14). 2-3 mm³ üzerindeki solid tümör büyümesi anjiogeneze bağlıdır ve VEGF hem endotel hücre büyümesinin hem de permeabilitesinin potent bir indükleyicisidir (15). VEGF önemli bir anjiogenetik faktör olarak davranır ve VEGF'nin tümör neovaskülaritesinin promotörü olduğu gösterilmiştir (16, 17). Daha önce yapılan çalışmalarda hemanjioblastomalarda, göğüs ve kolon kanserlerinde ve over kanserlerindeki stromal hücrelerde VEGF'nin immünoaktivitesi tespit edilmiştir (18, 19). Ancak, insan prostat kanserinde VEGF'nin varlığı ve regülasyonu hakkında çok az bilgi vardır (14). Son zamanlarda immünohistokimyasal metodların kullanıldığı bazı çalışmalarda PCa örneklerinde normal prostat ve BPH örneklerine oranla mikrovasküler dansite artışı tespit edilmiştir (4, 20). Bunun aksine, Walsh ve

arkadaşları ile Jones ve arkadaşları, serum VEGF seviyelerinin benign ile malign prostatik hastalığı birbirinden ayırt etmede kullanılamayacağını bildirmişlerdir (2). Ancak başka bir çalışmada, ortalama 20 veya 25 malign epitelyal hücre hücre içeren prostat tümörlerinde VEGF ekspresyonu gösterilmişken, BPH alanlarında VEGF ekspresyonu ya gösterilememiş ya da çok az oranda tespit edilmiştir (14). Bu çalışmada, BPH'lı ve PCa'lı hastalarda plazma VEGF seviyelerinin ölçülmüş ve PCa'lı grupta anlamlı derecede artmış plazma VEGF seviyeleri tespit edilmiştir. ($p < 0.05$). İmmünohistokimyasal tekniklerin kullanıldığı çalışmaların çoğunda, BPH ve normal doku karşılaştırıldığında; PCa örneklerinde mikrovasküler dansitede artış olduğu, ayrıca vasküler dansitenin PCa'lı hastalarda patolojik evrenin bağımsız bir belirleyicisi olduğu gösterildiğinden, PCa'lı hastalarda artmış VEGF oranlarının olması şartırtıcı olmaz (20, 21).

Solid tümör gelişimi süresince, büyüyen lezyonlar besinleri ve uzaklaştırılan metabolik atıkları difüzyon yoluyla içeri almaya yetecek kadar küçükken, inisiyal hücreler avasküler bir ortamda klonal büyümeye uğrarlar. Ancak difüzyon lezyonun belirli bir boyutun üzerinde ($\cong 2\text{mm}$) büyümeye devam etmesini desteklemeye yeterli olmaz. Avasküler lezyonun progresyonu için neovaskülarite oluşturmak amacıyla anjiogenik aktiviteyi değiştirmek zorundadırlar (22). Bundan dolayı, VEGF ve hipoksi gibi bazı anjiogenik stimuluslar hastalığın progresi süresince destek vermek zorundadır (22). Daha önceden hipoksinin tümör agresivitesi veya metastazda bir rolü olduğu gösterilmiştir (23). Benzer şekilde hipoksi ve artmış VEGF ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon da bulunmuştur (24). Son zamanlarda, Cvetkovic ve arkadaşları insan PCa'sında anjiogenezin markırı VEGF'nin artmış ekspresyonu ile artmış hipoksi derecesi arasında anlamlı bir ilişkiyi ortaya koymuşlardır (8). Bizim çalışmamızda da, PCa'lı hastalarda VEGF artışı ile birlikte lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın da anlamlı şekilde arttığı gösterildi. Jiang ve arkadaşları doğal olarak görülen polifenolik antioksidan silymarinin anjiogenik sitokin sekresyonunu inhibe etmedeki rolünü değerlendirmişlerdir ve silymarinin kanseri önleyici kimyasal etkiye ve kritik bir destek sağlayabilecek antianjiogenik bir potansiyele sahip olduğunu göstermişlerdir (22). Bu etkinin, kanser epitelyal hücrelerinden primer bir anjiogenik sitokin olan VEGF'nin sekresyonunun direk inhibe edilmesi yolu ile olduğu öne sürülmüştür (22) Çalışmamızda, artmış plazma MDA seviyeleri ile gösterilen artmış oksidatif stres ve artmış plazma VEGF düzeyleri ile kanser arasındaki ilişki gösterilmiştir. Bu sonuç, kontrolsüz hücre proliferasyonunun bir sonucu

olarak görülen kanser epitelyal hipoksisinin VEGF ekspresyonunun potent bir in vivo indükleyicisi olduğuna dair daha önceki gözlemleri desteklemektedir (25, 26).

Nitrik oksit, kanserli olgularda kompleks bir role sahip bir moleküldür. NO'nun DNA'yı hasarlayarak hastalığın başlangıcı ile ilişkili olduğu ve ayrıca immün hücrelerin tümörisidal aktivitesi için NO'nun gerekli olduğu gösterilmiştir (7, 27). VEGF'nin in vitro ve in vivo olarak endotelial hücrelerden NO üretimini stimüle ettiği daha önceden gösterilmiştir (7). NO ise sonradan vasküler permeabilite ve anjiogenezi artırır (27). PCa'lı hastalarda BPH'lı hastalara oranla artmış VEGF seviyeleri ile ilişkili olan anlamlı derecede yüksek seviyede plazma NO düzeyleri tespit ettik.

Yakın zamanda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, NO en az iki mekanizma ile tümör gelişimi ile ilgili olabilir. Bunlardan ilki, anjiogenezin stimülasyonu,

diğeri ise DNA üzerinde serbest radikallerin direk aktivasyonu ile artmış mutagenesidir. (28). Ek olarak, tümör hücrelerinden NO salınımı, NO'in antiproliferatif etkisi aracılığı ile tümör indüklü immüsupresyonda rol almasından kaynaklanabilir (29). Sonuç olarak NO artışı, hem postat karsinomasının bir sonucu olabileceği gibi aynı zamanda prostat karsinomunun da nedeni olarak gösterilebilir.

Bizim sonuçlarımız BPH'lı hastalara kıyasla PCa'lı hastalarda plazma VEGF seviyelerinin anlamlı derecede yüksek bulunduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca anjiogenik stimulus, oksidatif stres ve NO ekspresyonu arasındaki sıkı ilişkinin, malign prostat hastalığının patogenezi ve hastalığın durumu hakkında etkili bazı faktörlerden olabileceği gösterilmiştir. Verilerimizin, insan prostat kanserinde anti-anjiogenezis ve antioksidan stratejiler ile ilgili tedavileri desteklediğine inanmaktayız.

KAYNAKLAR

1. Jackson MW, Bentel JM, Tilley WD. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1997; 157: 2323-2328.
2. Walsh K, Sherwood RA, Dew TK, et al. Angiogenic peptides in prostatic disease. *BJU Int* 1999; 84: 1081-1083.
3. Jones A, Fujiyama C, Turner K, et al. Elevated serum vascular endothelial growth factor in patients with hormone-escaped prostate cancer. *BJU Int* 2000; 85: 276-280.
4. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, et al. Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology* 1998; 51: 161-167.
5. Rodeck U, Herlyn M. Growth factors in melanoma. *Cancer Met Rev* 1991; 10: 89-101.
6. Cunha GR. Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. *Cancer* 1994; 74: 1030-1044.
7. Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998; 19: 711-721.
8. Cvetkovic D, Movsas B, Dicker AP, et al. Increased hypoxia correlates with increased expression of the angiogenesis marker vascular endothelial growth factor in human prostate cancer. *Urology* 57: 821-825, 2001.
9. Yang W, de Bono DP. A new role for vascular endothelial growth factor, and fibroblast growth factors: increasing endothelial resistance to oxidative stress. *FEBS Lett* 1997; 403: 139-142.
10. Ueda K, Kobayashi S, Morita J, Komano T. Site-specific DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Biochim Biophys Acta* 1985; 824, 341-348.
11. Oakley GG, Devanaboyina U, Robertson LW, Gupta RC. Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. *Chem Res Toxicol* 1996; 9, 1285-1292.
12. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979; 95: 351-358.
13. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-1443.
14. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: In situ and in vitro expression of VEGF by human prostate cancer cells. *J Urol* 1997; 157: 2329-2333.
15. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
16. Dvorak HF, Brown LF, Detmer M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Amer J Pathol* 1995; 146: 1029-1039.
17. Plate KH, Breier G, Weich HA, et al. Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; 359: 845-848.

18. Shiraishi A, Ishiwata T, Shoji T, et al. Expression of PCNA, basic fibroblast growth factor, FGF-receptor and vascular endothelial growth factor in adenomas and carcinomas of human colon. *Acta Histochem Cytochem* 1995; 28: 21-25.
19. Witzigmann Voos S, Breier G, Risau W, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res* 1995; 55: 1358-1364.
20. Bigler SA, Deering RE, Brawer MK. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Human Pathol* 1993; 24: 220-226.
21. Weidner N. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 401-409.
22. Jiang C, Agarwal R, Lu J. Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, Silymarin: inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 371-378.
23. Hockel M, Schlenger K, Aral B, et al. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996; 56: 4509-15.
24. Shima DT, Deutsch U, D'Amore PA. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett* 1995; 370: 203-208.
25. Damert A, Ikeda E, Risau W. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J* 1997; 15: 419-423.
26. Fortsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-4613.
27. Das UN. A radical approach to cancer. *Med Sci Monit* 2002; 8: 79-92.
28. Wamvakas S, Schmidt HHHW. Just say NO to cancer? *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 406-407.
29. Lejeune P, Lagadec P, Onier N, Pinard D, Ohshima H, Jeannin J-F. Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. *J Immunol* 1994; 152: 5077-83.