

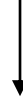
GURBET KORRMAS

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA AXIN1 VE
GALEKTİN-3 GEN VARYANTLARININ İNCELENMESİ
VE GALEKTİN-3 SERUM DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ**

GURBET KORKMAZ

**DANIŞMAN
PROF. DR. İLHAN YAYLIM**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Gurbet KORKMAZ tarafından hazırlanan "Kolorektal Kanserli Hastalarda Axin1 ve Galektin-3 Gen Varyantlarının İncelenmesi ve Galektin-3 Serum Düzeyinin Belirlenmesi" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

15 / 11 / 2013

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. İlhan YAYLIM	DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
2.Prof. Dr. Bedia AĞAÇHAN	DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
3.Doç Dr. Arzu ERGEN	DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
4.Doç Dr. Ş.Ümit ZEYBEK	DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
5.Doç Dr. Elif İLKAY ARMUTAK	Veterinerlik Fak. Histoloji Anabilim Dalı	

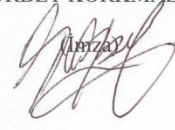
BEYAN

iii

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

GURBET KORKMAZ



İTHAF

‘Aileme’ ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı kurucusu, emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen ve benden desteğini, iyi niyetini hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım'a, başta Doç. Dr. Arzu Ergen ve tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve çalışanlarına,

Tezim için gerekli hastaların seçimi, örneklerin sağlanması ile klinik değerlendirmelerindeki destek ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Soykan Arıkan ve Doç. Dr. Esra Kaytan Sağlam'a,

Tezimin yapımı ve yazımı sırasındaki yardımları ve destekleri için çok değerli arkadaşlarım, PhD. Özlem Timirci Kahraman, Msc. Saime Turan'a, M.Bio Nazlı Ezgi Özkan'a, Bio. Hande Karagedik'e, Bio. Ezgi Nurdan Yenilmez'e, M.Bio. Servet Tunoğlu'na, Msc. M. Fatih Seyhan'a, Msc. Sevgin Değirmencioğlu'na, Sedat Karadeniz'e ve sevgili stajyerlerimiz Cenk Aksu ve Elife Özdemir'e

Attığım her adımda destek ve sevgileriyle yanımda olan, varlıklarıyla hayatıma en değerli anlamları katan, canım anneme, babama, ablama ve abilerime yürekten teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 28753

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolorektal Kanser	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	5
2.1.2. Kolorektal Kanser Risk Faktörleri	6
2.1.2.1. Yaş.....	6
2.1.2.2. Beslenme ve Diyet	6
2.1.2.3. Sigara:	6
2.1.2.4. İrk	7
2.1.2.5. Alkol.....	7
2.1.2.6. Aile Hikayesi.....	7
2.1.2.7. Fiziksel aktivite ve obezite	7
2.1.2.8. İnflamasyonlu Bağırsak Hastalıkları	8
2.1.2.9. Kalıtsal Faktörler:.....	8
2.1.3. Kolorektal Kanserin Moleküler Mekanizması	9
2.1.3.1. Kromozomal İnstabilite.....	10
2.1.3.2. Mikrosatellit İnstabilite	10
2.1.3.3. CpG Adacık Metilatör Fenotipi (MP)	12
2.1.4. Wnt sinyal yolağı	12
2.1.4.1. Axin yapısı, karsinogenezdeki rolü ve Wnt sinyal yolağı.....	14

2.1.4.2. Galektin yapısı, karsinogenezdeki rolü ve Wnt sinyal yolağı.....	17
2.1.4.2.1. Galektin-3.....	19
2.1.4.2.2. Tümör gelişimi ve ilerlemesinde Galektin-3.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı.....	24
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	24
3.3. Kullanılan Gereçler.....	25
3.4. Çözeltiler.....	25
3.4.1. Dna İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	25
3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer).....	25
3.4.1.2. 0.5 M Disodyumetilendiaminteraasetat (EDTA) (pH 8.0).....	25
3.4.1.3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl).....	25
3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL).....	25
3.4.1.5. 1 M Tris Tamponu (Stok).....	26
3.4.1.6. 9.5 M Amonyum Asetat.....	26
3.4.1.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS).....	26
3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml).....	26
3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.....	26
3.4.2.1. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X).....	26
3.4.2.2. Etidyum Bromür (10 mg/ml).....	26
3.4.2.3. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE).....	26
3.5. Kullanılan Yöntemler.....	27
3.5.1. Periferik Kandan Dna İzolasyonu.....	27
3.5.1.1. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini.....	27
3.5.2. Axin1 Gen Polimorfizminin Allel Spesifik Pzr (Aspzr) İle Tespit Edilmesi	28
3.5.2.1. Axin1 rs214250 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri.....	28
3.5.3. Galektin-3 Gen Polimorfizmlerinin Tespit Edilmesi.....	28
3.5.3.1. Galektin-3 rs4644 ve rs4652 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri.....	28
3.5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PZR)'da Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PZR'ın Hazırlanışı.....	29
3.5.4.1. PZR Karışımının Hazırlanışı.....	29

3.5.5. PZR Şartları.....	30
3.5.6. Agaroz Jel Elektroferezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler Ve Gereçler.....	31
3.5.6.1. Galektin-3 PZR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi:	31
3.5.6.2. PZR Ürünlerinin Kontrolü:	32
3.5.7. Galektin-3 Gen Polimorfizmlerinde Enzim Kesimi.....	32
3.5.7.1. Galektin-3 rs4644 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler	32
3.5.7.2. Galektin-3 rs4652 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler	32
3.5.8. Axin1 rs214250 ve Galektin-3 rs4644, rs4652 Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü.....	33
3.5.8.1. Axin1 rs214250 Gen Polimorfiziminin Değerlendirilmesi.....	33
3.5.8.2. Galektin-3 rs4644 Gen Polimorfiziminin Değerlendirilmesi.....	34
3.5.8.3. Galektin-3 rs4652 Gen Polimorfiziminin Değerlendirilmesi.....	34
3.5.9. Serum Galektin-3 Düzeyinin ELISA Yöntemi ile Tayini	35
4. BULGULAR.....	37
KONTROL	37
5. TARTIŞMA	45
KAYNAKLAR	55
HAM VERİLER	75
FORMLAR	76
ETİK KURUL KARARI	82
PATENT HAKKI İZİNİ	85
TELİF HAKKI İZİNİ.....	86
ÖZGEÇMİŞ	87

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1: TNM Sınıflandırması (American Joint Committee on Cancer) (20)	4
Tablo 2-2: Tümör, Nod, Metastaz değerlendirmesi (18)	4
Tablo 3-1: Axin1 için PZR karışımının hazırlanması.....	29
Tablo 3-2: Galektin-3 için PZR karışımının hazırlanması.....	29
Tablo 3-3: Axin1 rs214250 Gen Polimorfizmi PZR Koşulları.....	30
Tablo 3-4: Galektin-3, rs4644 ve rs4652 Gen Polimorfizmleri PZR Koşulları.....	30
Tablo 4-1: Çalışma gruplarına ait veriler.....	37
Tablo 4-2: Kolorektal kanserli hastalarda Axin rs214250, Gal3 rs4644 ve Gal3 rs4652 gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımları	38
Tablo 4-3: Hasta grubunda Axin 1, Galektin-3 4644, Galektin-3 4652 Genotiplerinin Klinik ve Patolojik Parametrelere Göre Dağılımı.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Türkiye’de cinsiyete göre (sırasıyla; erkek ve kadın) kanser türlerinin insidans ve mortaliteleri,100.000 kişi başına oran (27).....	5
Şekil 2-2: KRK adeno-karsinoma sekansı (60)	10
Şekil 2-3: Kolorektal kanserde MSI ve CIN yolakları (72).....	11
Şekil 2-4: Kolorektal kanserde MSI ve CIN yolaklarının karşılaştırılması (73)	12
Şekil 2-5: Kolorektal kanserde Wnt yolağı (104).....	14
Şekil 2-6: Axin aracılığıyla düzenlenen üç farklı sinyal yolağı (105).....	15
Şekil 2-7: Axin ile ilişkili Wnt sinyal yolağı komponentleri (118)	16
Şekil 2-8: Galektin aile üyeleri ve Galektin-glikan kafes oluşumu (128)	18
Şekil 2-9: Galektin-3- β -katenin etkileşimi ve Wnt sinyal yolağı (9).....	23
Şekil 3-1: Axin1 rs214250 Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü	33
Şekil 3-2: Galektin-3 rs4644 Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü	34
Şekil 3-3: Galektin-3 rs4652 Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü	35

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KRK: Kolorektal Kanser

APC: Adenomatöz Polipozis Koli

GSK-3 β : Glikojen Sentez Kinaz 3-Beta

PP2A: Protein Fosfotaz 2

Gal-3: Galektin-3

IBH: İnflamasyonlu Bağırsak Hastalığı

FAP: Ailesel Adenomatöz Polip

HNPCC: Kalıtsal Polipozis olmayan Kolorektal Kanser

MMR: Miss-match Repair (Tamir Genleri)

CIN: Kromozomal instabilite

MP: CpG Adacık Metilatör Fenotipi

MSI: Mikrosatellit Instabilite

DIX: Axin-bağlayıcı Domen

RGS: G-Protein sinyal regülatörleri

CRD: Karbonhidrat Tanıma Bölgeleri

AP-1: Aktivatör protein 1

MUC2: İntestinal Müsin 2

TCR: T Hücre Reseptörü

ÖZET

Korkmaz G. (2013) Kolorektal kanserli hastalarda Axin1 ve Galektin-3 gen varyantlarının incelenmesi ve Galektin-3 serum düzeyinin belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans. İstanbul.

Kolorektal kanser en sık görülen üçüncü kanser türü olup tüm kanser vakalarının %9,7'lik kısmını oluşturur. Kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır.

Kolorektal kanser oluşumunda çeşitli çevresel ve genetik faktörler önemli yer tutmaktadır. Axin tümör süpresör geni, önemli biyolojik sinyal yollarında pleiotropik etkiye sahiptir. Axin geninin en önemli fonksiyonlarından biri Wnt yolağının negatif düzenleyicisi olmasıdır. Wnt sinyal yolağındaki değişikliklerin farklı tümörlerin patogeneze katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Mutasyon analizleri sonucunda Axin geni üzerinde, kolorektal kanserde etkili olan sekans varyantları da rapor edilmesi, Axin geninin kolorektal kanser patogenezinde etkili olduğunu işaret etmektedir.

Kanser gelişiminde etkili olduğu bilinen bir diğer molekül, β -galaktozid bağlayan protein ailesinden galektin-3 proteindir. Gal-3, hücre büyümesi, farklılaşması, apoptoz ve malignan transformasyon gibi birçok biyolojik etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalarda, prostat kanseri, kolon kanseri, meme kanseri, gastrik kanser ve akciğer kanserinde gal-3 gen varyantlarının önemli etkiye sahip oldukları gösterilmiştir. Anti-apoptotik gal-3 molekülünün sitoplazmik düzeyinin artması sonucu, neoplastik hücreler metastatik potansiyel kazanmaktadır.

Çalışmamızda, hasta ve kontrol grupları arasında Galektin-3 rs4644(p=0.0260) ve Galektin-3 rs4652 (p=0.0390) genotip dağılımındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hasta grubunda Galaktin-3 rs4644 genotipi ile münöz komponent taşımak arasında anlamlı bağlantı belirlenmiştir (p=0.026). Axin1 polimorfizmi ile tümör büyüklüğü arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (p=0.022). Kombine genotip analizi sonuçlarına göre; hasta grubunda gal-3 4652-Axin1 AACC (p=0.004) düşük; gal-3 rs4644-Axin1 CCCT (p=0,044) ve CCAACT üçlü kombine genotipi (p=0,022) ise yüksek frekansta gözlenmiştir. Hastalarda Galaktin-3 serum düzeyleri (5.9 ± 0.69 ng/ml) kontrol grubuna göre (0.79 ± 0.01 ng/ml) daha yüksek oranda tespit edilmiş olup istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlılık bulunmuştur.(p<0.001). Bu sonuçlar, Axin1 ve Galektin-3 varyasyonlarının, kolorektal kanser gelişimi ve prognozu üzerinde rol oynayabileceğini belirtmektedir.

Anahtar Kelimeler : Kolorektal Kanser, Axin1, Galektin-3, WNT

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 28753

ABSTRACT

Korkmaz G. (2013) Investigation of Axin 1 and Galectin-3 gene variants and detection of Galectin-3 serum levels in Colorectal Cancer Patients İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine. Master Thesis. İstanbul

Colorectal cancer is the third most frequent cancer with 9,7 % incidence world wide and the second most mortal cancer after lung cancer. Environmental and genetic factors are known to be related with colorectal cancer progression. .

Axin is a tumor suppressor gene which has pleiotropic effect on a number of biological signaling pathways. One of the most important functions of the Axin gene is its down-regulatory effect on Wnt pathway.

Axin down-regulates the function of oncogenic β -catenin with its relation to APC, casein kinase, GSK-3 β and PP2A proteins in Wnt pathway. These changes in the Wnt pathway are reported to be relevant with pathogenesis of various tumors. Mutation analysis reported a number of sequence variants of Axin gene which are related to colorectal cancer pathogenesis.

Galectin-3 (gal-3) protein, which belongs to β -galactosidase family, is another molecule that is known to be related with cancer progression. Cell growth, differentiation and malignant transformation are among the biological effects of the gal-3. Gal-3 gene variants are reported to be related with prostate, breast, gastric and colorectal cancers. It is known that increased cytoplasmic levels of the anti-apoptotic gal-3 enhance the metastatic potential in neoplastic cells.

In our study, significant differences were detected between Galectin-3 rs4644 ($p=0.0260$) and Galectin-3 rs4652 ($p=0.0390$) genotype distributions in cases and controls. Within the patients, Galectin-3 rs4644 genotype and presence of mucinous component was significantly related. ($p=0.026$). Significant difference was detected between Axin1 genotypes and the tumor grade. ($p=0.022$). According to combined genotype analysis; Gal3 4652-Axin1 AACC genotype combination was low in patients ($p=0.004$) while both gal-3 rs4644-Axin1 CCCT ($p=0,044$) dual and CCAACT ($p=0,022$) triple genotype combinations were in high frequencies in patients.

Within the patient group, Galectin-3 serum levels ($5.9\pm 0.69\text{ng/ml}$) were significantly elevated when compared to controls ($0.79\pm 0.01\text{ng/ml}$) ($p<0.001$).

These results indicate the potential role of Axin1 and Galectin-3 gene variants on colorectal cancer formation and progression.

Key Words: Colorectal cancer, Axin1, Galectin-3, WNT

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 28753

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanseri en sık görülen üçüncü kanser türü olup tüm kanser vakalarının %9,7'lik kısmını oluşturur (1). Kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (2). Kolorektal kanser insidansı ve ölüm oranı kadın ve erkeklerde benzerdir. İstatistiksel verilere göre Amerika Birleşik Devletlerinde erkeklerde prostat ve akciğer kanserinden, kadınlarda meme ve akciğer kanserinden sonra her iki cinste de 3. sıradadır (3).

Kolorektal kanserinin görülme sıklığı, dünyanın farklı toplumlarına göre değişmektedir (4). Kolorektal kanserine yakalanma oranının gelişmiş ülkelerde daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Batı Avrupa Avustralya ve Kuzey Amerika'da kolorektal kanser insidansı ve ölüm oranı yüksek iken Asya ve Afrika'da çok daha düşüktür (5).

Kolorektal kanserin değiştirilebilir risk faktörleri arasında sigara kullanımı, fiziksel hareketsizlik, fazla kilolu olma ve obezite, yağlı besin, kırmızı ve işlenmiş et tüketimi ve aşırı alkol tüketimi yer almaktadır (1,5,6). Çeşitli genetik faktörler de kolorektal kanser gelişiminde önemli yer tutmaktadır. Axin tümör süpresör geni, önemli biyolojik sinyal yollarında plieotropik etkiye sahiptir. Axin geninin en önemli fonksiyonlarından biri Wnt yolağının negatif düzenleyicisi olmasıdır(7). Axin, Wnt yolağında APC, kazein kinaz, GSK-3 β ve PP2A proteinleri ile ilişkili olarak onkogenik β -katenin geninin fonksiyonunu downregüle etmektedir. Wnt sinyal yolağındaki değişikliklerin medullablastomalar, adenokarsinomlar, hepatoselüler karsinomlar, hepatoblastomalar ve nöroektodermal tümörlerin patogeneze katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Bunlara ek olarak, yapılan mutasyon analizleri sonucunda Axin geni üzerinde, kolon kanserinde etkili olan sekans varyantları da rapor edilmiştir. Bu da, Axin geninin kolorektal kanser patogenezinde etkili olduğunu işaret etmektedir(8).

Kanser gelişiminde etkili olduğu bilinen bir diğer molekül, β -galaktozid bağlayan protein ailesinden galektin-3 proteindir. Gal-3, hücre büyümesi, farklılaşması, apoptoz ve malignan transformasyon gibi birçok biyolojik etkiye sahiptir(9). Yapılan çalışmalarda, prostat kanseri, kolon kanseri, meme kanseri, gastrik kanser ve akciğer kanserinde gal-3 gen varyantlarının önemli etkiye sahip oldukları gösterilmiştir. Kolon kanserinde, gal-3 seviyesindeki artışın neoplastik progresyonla ilişkili olduğu bilinmektedir. Anti-apoptotik gal-3 molekülünün sitoplazmik düzeyinin artması sonucu, neoplastik hücreler metastatik potansiyel kazanmaktadır(10).

Kanserde risk belirleme parametrelerinden biri olabileceği düşünülen gen polimorfizm çalışmaları, pek çok yaygın kanser türlerinde ve birçok gen üzerinde yürütülmektedir. Çalışmamızda, Axin1 ve Galektin-3 gen varyantlarının ve Galektin-3 serum düzeyinin kolorektal kanserli hastalarda incelenecek ve kolorektal kanserlerine ait risk durumlarının, Axin1 ve Galektin-3 genotiplerinin klinik ve prognostik parametrelerle ilişkileri değerlendirilmeye çalışılacaktır. Çalışmamızın kolorektal kanserleri etyopatogenezinde Axin1 ve Galektin-3'ün önemini araştırarak çalışmalara ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanserler, kanserle ilgili mortalite ve morbiditenin en önemli sebeplerindendir. Her yıl dünyada yaklaşık bir milyon yeni kolorektal kanser (KRK) vakası görülmektedir ve bu sayı tüm kanser vakalarının %9.5'ini oluşturmaktadır. Dünyadaki kanser vakaları incelendiğinde KRK 3. sırada yer alırken, kanserden ölüm nedenlerinde ikinci sırada yer almaktadır (11).

Kolorektal kanser gelişiminde genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır (12). Genetik değişiklikler üreme hücrelerinde meydana gelirse kalıtsal olarak geçen kanserler, somatik hücrelerde oluşursa sporadik kanserler olarak ifade edilir. Kalıtsal kolorektal kanserlere örnek olarak Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanserler (HNPCC) verilebilir (13,14). Kolorektal kanserlerin çoğu sporadiktir (15) ve büyük çoğunluğu (%95) adenokarsinomlar olup, ayrıca skuamöz hücreli karsinom, karsinoid tümörler, adenoskuamöz ve indiferansiye karsinomun yanı sıra sarkom ve lenfomalar gibi nonepitelyal tümörler de görülmektedir (16,17).

KRK insidansı genellikle birlikte rapor edilmesine rağmen, %72 kolon kanseri ve %28 rektum kanseri olarak ayrılabilir (18). KRK sınıflandırılması, cerrahi sonrası patolojik evre tanımlanması ile yapılmaktadır (19).

Bu sayede, hastalığın yayılım derecesi, tedavinin planlanması ve prognoz açısından tahminde bulunabilmek mümkün olmaktadır. KRK için günümüzde en sık kullanılan evreleme sistemi, TNM olarak bilinen AJCC (American Joint Committee on Cancer) sınıflandırmasıdır. Ancak, Dukes ve Astler-Coller gibi sınıflandırma sistemleri de kullanılmaktadır (18).

Tablo 2-1: TNM Sınıflandırması (American Joint Committee on Cancer) (20)

Evre	T	N	M
Evre 0	T _{is}	N0	M0
Evre 1	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Evre 2	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
Evre 3	T1,T2	N1 veya N2	M0
	T3,T4	N1 veya N2	M0
Evre 4	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Tablo 2-2: Tümör, Nod, Metastaz değerlendirilmesi (18)

T: Primer Tümör	
T_x	Primer tümör değerlendirilemiyor.
T₀	Primer tümör yok
T_{is}	Karsinoma in situ
T₁	Tümör submukozaya yayılmış
T₂	Tümör 'muskularis propria' ya yayılmış
T₃	Tümör muskularis propria içinden subserozaya/nonperitoneal periferik/perirektal dokulara yayılmış
T₄	Tümör diğer organlara ya da viseral peritona yayılmış
N: Bölgesel Lenf Nodları	
N_x	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N₀	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N₁	1-3 bölgesel lenf nodunda metastaz
N₂	4 veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz
N₃	Ana arter kökünde lenf nodu tutulumu
M: Uzak Metastaz	
M_x	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
M₀	Uzak metastaz yok
M₁	Uzak metastaz var

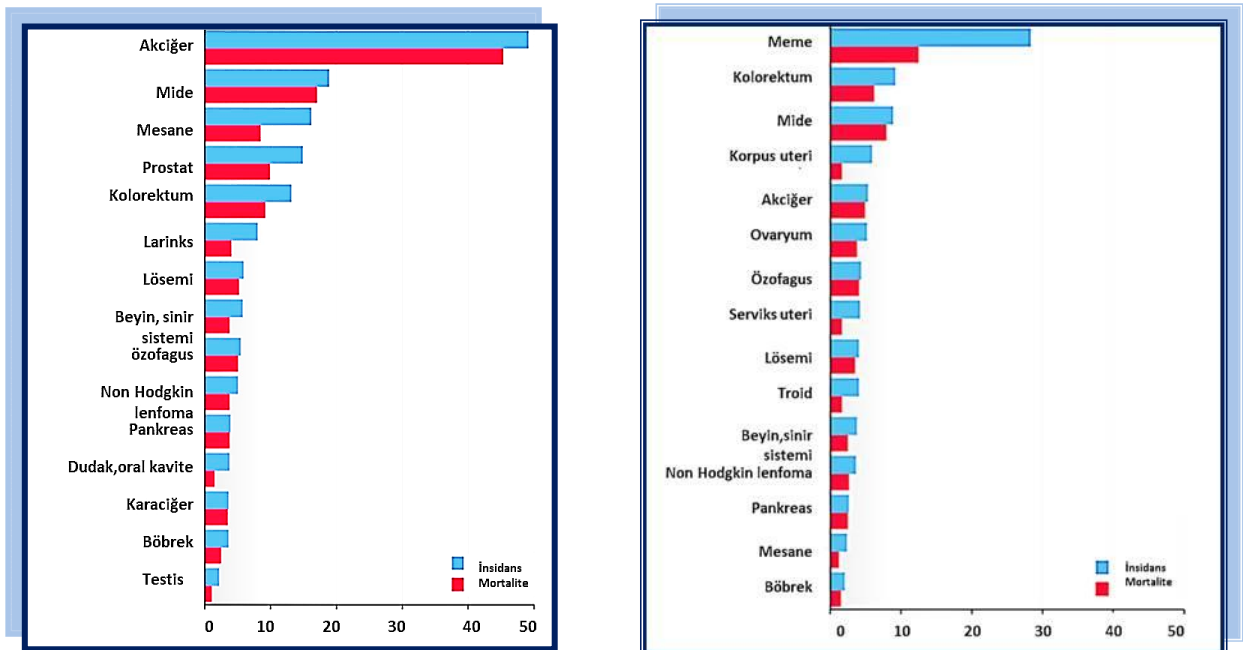
2.1.1. Epidemiyoloji

Kolorektal kanser gelişmiş ülkelerde, gelişmekte olan ülkelere nazaran daha sık görülmektedir (15,21,22).

2008 yılında 1.2 milyon yeni kanser vakası ve 608.700 ölüm rapor edilmiştir (23). 2008 globocan tahminlerine göre, 12.7 milyon kanser vakasının %56 sı ve 7.6 milyon kansere bağlı ölümlerin %64 ü ekonomik olarak gelişmekte olan ülkelerde meydana gelmektedir. Prostat, kolorektal, kadın meme ve akciğer kanseri oranları gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere göre çok daha yüksektir.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, KRK görülme oranının ülkeler arasında büyük ölçüde değiştiğini göstermektedir (24). Görülme sıklığı en fazla Avustralya, Yeni Zelanda, Avrupa ve Kuzey Amerika'da iken en az Afrika ve Güney-Orta Asya'dadır. (25).

Türkiye'de ise elde edilen istatistiki sonuçlar, kanserli hasta verilerinin yetersizliği ve çalışmaların azlığı nedeniyle, KRK sıklığı ve yaygınlığı konusunda sağlıklı bilgi edinmeyi engellemektedir (26). Türkiye'de her iki cinsiyet için kolorektal kanser vakası tüm kanser vakalarının %7,6'sını oluşturarak 4. sırada, kansere bağlı ölümlerin ise %7,4'ünü oluşturarak 3. sırada yer almaktadır. Cinsiyete göre kolorektal kanser erkeklerde 5. sırada ve kadınlarda da 2. sırada yer almaktadır (27).



Şekil 2-1: Türkiye'de cinsiyete göre (sırasıyla; erkek ve kadın) kanser türlerinin insidans ve mortaliteleri, 100.000 kişi başına oran (27)

2.1.2. Kolorektal Kanser Risk Faktörleri

2.1.2.1.Yaş

Yaşın ilerlemesi ile kolorektal kanseri gelişime riski arasında doğru orantı vardır. Kolorektal kanser olgularının %90'ından fazlası 50 yaş ve üstü bireylerde görülmektedir ve 65-85 yaşları arasındaki bireylerde risk 50 yaş altındaki bireylere göre 6 kat daha fazladır. Ayrıca, genç bireylerde kolorektal kanser görülme oranı da giderek artmaktadır. KRK, Amerika Birleşik Devletler'inde 20-49 yaşları arasındaki kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen 10 kanserden biridir (28-30).

2.1.2.2.Beslenme ve Diyet

Tüm kolorektal kanser vakalarının yüzde 45'inde beslenme değişiklikleri, fiziksel aktivite alışkanlıkları ve kilo kontrolü ile yüksek riskli populasyon oluşumunun önlenilebilir olduğu tahmin edilmektedir (31). World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (WCRF/AICR) yayınlanan son raporlara göre, lifli diyetlerin kolorektal kansere karşı koruyucu olduğu, kırmızı ve işlenmiş et ve alkolün (özellikle erkeklerde) hastalık riskini arttırdığı bildirilmiştir(32). Günde 80 gram ya da daha fazla işlenmiş et (sosis, jambon gibi) tüketimi, günde 10 gram ya da daha az tüketenler ile karşılaştırıldığında rektal kanser oluşumunu %62 arttırdığı(33), ve işlenmiş etlerin uzun süreli ve yüksek alımının distal kolon kanseri riskini %50 arttırdığı belirlenmiştir (34).

2.1.2.3.Sigara:

Uzun süreli sigara kullanımının (30-40 yıl) kolorektal kanser ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Genç yaşta sigaraya başlama ve yüksek oranda, uzun süreli kullanımı olan kişilerin kolon kanseri için en büyük riski taşıdıkları giderek belirgin hale gelmiştir(35-37). Tütün kullanımının kolorektal kanser üzerinde oluşturduğu populasyon riski, erkeklerde %21 kadınlarda ise %12 olmuştur. Tütün dumanının heterosiklik aminler, nitrozaminler ve polisiklik hidrokarbonlar gibi kanserojenleri içerdiği de bilinmektedir.

2.1.2.4. Irk

Kanser insidansı ve ölüm oranları, ırksal ve etnik gruplara göre değişiklik göstermektedir. 2004-2008 verilerine göre Afrika kökenli Amerikalılarda kolorektal kanser insidansı ve ölüm oranları Amerika'daki diğer tüm gruplara göre yüksektir(25). Kolorektal kanser Doğu Avrupa Yahudilerinde sık görülmekle birlikte bu grubun %6'sında bu riski %18-%30 artıran I1307K APC (Adenomatöz Polipozis Koli) mutasyonu mevcuttur (38-42).

2.1.2.5. Alkol

Alkol tüketiminin kolorektum dahil çeşitli sindirim sistemi organlarında görülen kanser riski ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Alkolün kendisi karsinojen olmamasına rağmen tümör destekleyici olarak işlev görebilir (43). Önemli bir alkol metaboliti olan asetaldehit karsinojen olabileceği gibi sigara ile etkileşime girerek DNA da spesifik mutasyonlara neden olabilmektedir (44,45). Bunun yanında alkolün çözücü etkisinin olması diğer karsinojenlerin mukoza hücrelerine geçişini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Ayrıca alkol; lipid peroksidasyonu, prostaglandinler ve serbest O₂ radikali üretimine etki edebilir (45,28).

2.1.2.6. Aile Hikayesi

Eğer bu kansere yakalanmış akrabaları (ebeveyn, kardeşler veya çocuklar) olan bireyler varsa, o bireyinde bu kansere yakalanma riski artmış olabilir. Bu, özellikle ailedeki birey kansere genç yaşlarda yakalanmışsa daha fazla geçerli olabilmektedir (46). Bu risk artışının nedenleri açık olmasa da büyük olasılıkla kalıtılan genler, paylaşılan çevresel faktörler veya bunların bir kombinasyonunun etkili olduğu düşünülmektedir (28).

2.1.2.7. Fiziksel aktivite ve obezite

Yapılan kohort ve olgu-kontrol çalışmalarının çoğunda fiziksel aktivite ile kolon kanseri riski arasında ters ilişki bulunmuştur (47-49). Sonuçlar düzenli fiziksel aktivite ve sağlıklı beslenmenin kolorektal kanser riskini azalttığı yönündedir. Hayatları boyunca düzenli aktivite gösteren bireyler en düşük riske sahiptir (32,50).

Bununla birlikte düşük fiziksel aktivite ve kolorektal kanser riski arasındaki biyolojik mekanizma tam olarak aydınlatılmamıştır (51). Uzun vadede düzenli yapılan fiziksel aktiviteler metabolizma hızını arttırırken, kan basıncını ve insulin direncini azaltır (52).

Obezite kadın ve erkeklerde riski arttıran bir faktör gibi görülmekte, erkeklerde bu faktörün daha etkin bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca kilo ile ilişkili olduğu düşünülen Tip-2 diyabetin de kolorektal kanser açısından risk oluşturduğu ileri sürülmektedir (46).

2.1.2.8. İnflamasyonlu Bağırsak Hastalıkları

Inflamatuvar bağırsak hastalığı olan kolorektal kanserli bireylerin ölüm oranı sporadik kolorektal kanserli hastalardan daha yüksektir (53).

İnflamasyonlu bağırsak hastalıklarının en önemli ikisi olan ülserativ kolit ve Crohn hastalığı kolon ve rektum mukozalarının iltihaplanması olarak tanımlanır. Bu durum bireyin kolon kanserine yakalanma riskini 4-20 kat artırır (54). İnflamasyon kolorektal kanser gelişiminde önemli bir risk faktörü olmakla birlikte yıllık görülen tüm kolorektal kanserlerinin %2sinin daha azından sorumludur. IBH tanısı konulduktan 8-10 yıl sonra KKK riski artmaya başlar (53). Ancak bu yatkınlığı açıklayan genetik bir temel tanımlanmamıştır (29).

2.1.2.9. Kalıtsal Faktörler:

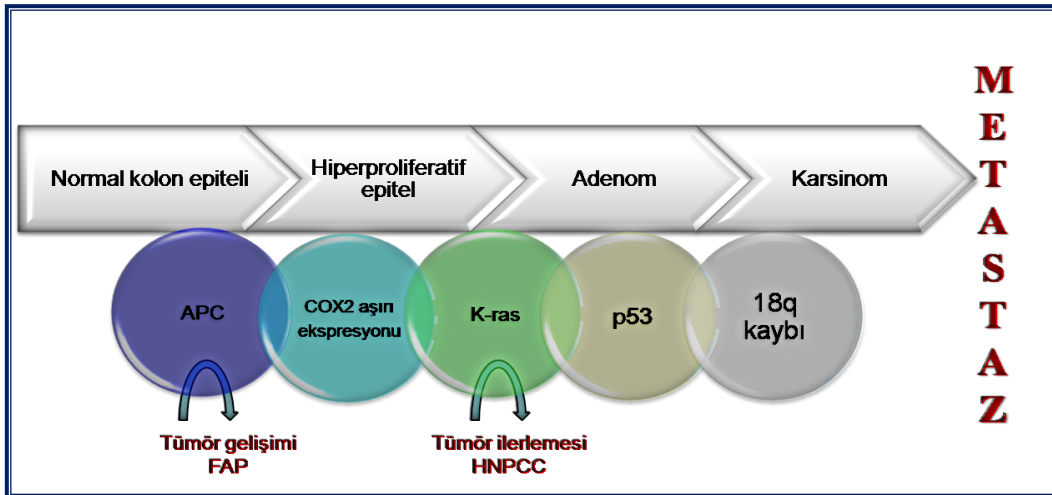
Kolorektal kanserler ile bağlantılı kalıtsal olan en yaygın iki sendrom ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanserdir (HNPCC). HNPCC; polipozis zemininden gelişen kolorektal kanserlerdir. Sporadik vakalara oranla daha genç yaşlarda görülürler. Familial Adenomatöz Polipozis (FAP) kolonda 100'ün üzerinde adenomatöz polip bulunması ya da FAP ailesi bireylerinden birinde herhangi bir sayıda adenom saptanması ile tanı konulan bir hastalıktır. Sorumlu olan genetik defektin 5.kromozom üzerinde q 21 lokusunda bulunmakta olan APC geni olduğu bilinmektedir. HNPCC ise, polipozis sendromları ile ilişkisiz olup Lynch sendromu olarak adlandırılmışlardır ve özellikle otozomal dominant bir kalıtım modeli göstermesi, kolorektal kanser gelişme yaşının erken olması, kanserlerin çoğunlukla sağ tarafta yerleşik olması ile karakterizedir (46).

HNPCC ye yol açan tüm mutasyonlar içinde en sık görülenler DNA tamir genlerinden MLH1 ve MSH2 deki mutasyonlardır (55,56).

HNPCC ilişkili mutasyonları taşıyan bireyler yaşam boyu %80 risk taşımaktadırlar (57). MLH1 ve MSH2 genlerindeki mutasyonlar diğer kanser türleri için de riski artırmaktadır (31).

2.1.3. Kolorektal Kanserin Moleküler Mekanizması

Genel bir bakış açısıyla, tümör gelişimi hücrelerin içerdiği genomik metaryal üzerindeki kümülatif değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Normal bağırsak mukoza hücreleri çeşitli kök hücrelerden köken alan poliklonal hücreler iken KRK hücreleri monoklonaldır (58). KRK gelişimi, kolonik kript lezyonlarından adenomlar ve kanser oluşumunu içeren belirli evreleri kapsamaktadır. Bu adeno-karsinoma sekansı, hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki dengeyi etkileyen tümör süpresör genler ve onkogenlerdeki multiple mutasyonların birikimi ile karakterizedir. İki tipi vardır: DNA sekansı değişikliği ve epigenetik değişiklikler. Sekans değişiklikleri, kromozomal delesyonları içermektedir. Örneğin, hücre döngüsünün baskılanmasıyla ilişkili genlerdeki (tümör süpresör genler) kayıplar, çeşitli proteinlerin aktivasyon ve inaktivasyonlarında görev alan genler üzerindeki mutasyonlar, belirli genlerin aşırı ekspresyonuna neden olacak gen amplifikasyonları ve hatta tam kromozom kaybı olarak görülmektedir. Bunun yanısıra, epigenetik değişiklikler gen susturulmasını içermektedir, promotor bölgedeki CpG adacıkları hipermetilasyonu sonucu gen anlatımı durdurulmuştur (59).



Şekil 2-2: KRK adeno-karsinoma sekansı (60)

KRK sınıflandırması, çeşitli yollardan (tümör yeri, patoloji) yapılmakla beraber son zamanlarda moleküler profillerine bağlı olarak belirli fenotiplere ayrılmıştır. Bunlar; kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilite (MSI) ve CpG adacık metilatör fenotipi(MP) dir.

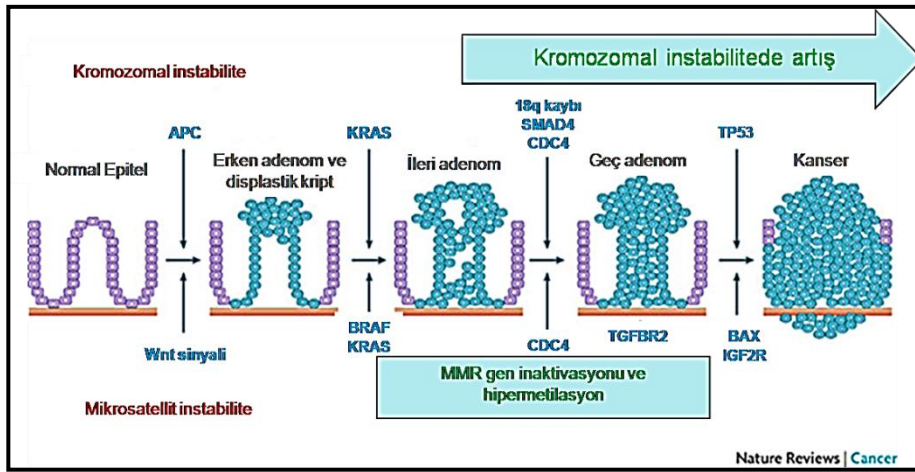
2.1.3.1. Kromozomal İnstabilite

Kromozomal instabiliteye sahip tümörler sıklıkla kromozom kazancı ya da kaybı gibi karyotipik değişiklikler sergilemektedir (59,61). Allel kayıpları, birden fazla lokusun dahil olduğu(5q, 8p, 17 p, and 18q) allelik dengesizliklerle sonuçlanmaktadır. Anöploidi bu tür tümörlerin karakteristik özelliğidir (59,62,63). Bu yolu başlatan faktörün, APC geni gibi tümör baskılayıcı bir genin kaybı olduğu iddia edilmektedir. 5q, 17p, 18q ve allel kaybı APC, DCC/SMAD4 ve TP53 inaktivasyonunu kolaylaştırırken,18q allel kaybı aynı zamanda evre II ve III KRK'ler için kötü prognoz belirteçidir (64-67).

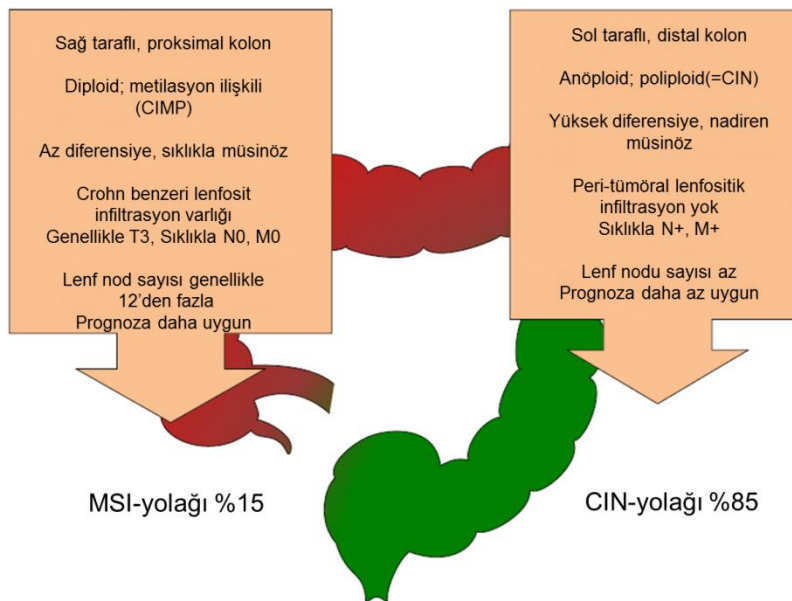
2.1.3.2. Mikrosatellit İnstabilite

MSI, kolorektal kanserlerin %6-15'inde meydana gelir ve DNA yanlış-eşleşme tamir genlerinde inaktivasyona neden olur (68). MSI, normal DNA'ya karşı tümör DNA sekansındaki nükleotit tekrarlarının oluşturduğu kısa uzunluk değişiklikleri olarak bilinir(59,69). MSI, birçok gen (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) tarafından kontrol altında tutulan DNA replikasyonu boyunca meydana gelen eşleşme hatalarının düzeltildiği DNA mismatch onarım sistemi üzerindeki bozulmaların yansımasıdır. Genom boyunca yayılan kümülatif mikrosatellit bozuklukları sistemin değişmesine yol açar(59,70). DNA onarım (RAD50, MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, BLM, PMS2),

apoptoz (APAF1, BAX, BCL10, Kaspaz-5), sinyal iletimi (TGF β RII, ACTRII, IGFIIR, WISP-3), hücre döngüsü (PTEN, RIZ) ve transkripsiyon faktörleri (TCF-4) genlerinin mikrosatellit instabilite ile tekrar kodları oluşturması, KRK mutasyonu oluşumuna neden olmaktadır (18,71).



Şekil 2-3: Kolorektal kanserde MSI ve CIN yolları (72)



Şekil 2-4: Kolorektal kanserde MSI ve CIN yolaklarının karşılaştırılması (73)

2.1.3.3. CpG Adacık Metilatör Fenotipi (MP)

CpG adacık metilatör fenotipi, CpG adacıklarındaki hipermetilasyon sonucu gen susturulması ile oluşur (18,74). CpG adacıkları, yüksek frekansta CG dinükleotitlerini içeren genlerin transkripsiyon başlangıç bölgelerinde proksimal olarak yerleşim gösteren nükleik asit bölgeleridir. Çoğu memeli geninde bu CpG bölgeleri normal olarak metile durumdadır ya da epigenetik mekanizmalar tarafından normal hücrel süreçlerde gen transkripsiyonu baskılanmaktadır.

Bununla birlikte, kanser hücrelerinde CpG adacıkları çeşitli tümör süpresör genler tarafından yoğun metile olduğundan transkripsiyon baskılanır. ‘‘Susturma’’ mekanizması ile, kanser hücrelerindeki tümör süpresör genlerin ekspresyonu azaltılabilir veya elimine edilebilir (18). Kolorektal karsinogenezde yer alan APC, MCC, MLH1, MGMT ve diğer bazı genlerin DNA hipermetilasyonu yoluyla susturuldukları keşfedilmiştir. CIMP-yüksek olan kolorektal kanserler tüm KRK’ların %15-20’sini oluşturur (75-77).

Ailesel adenomatöz poliplerde, beşinci kromozomun uzun kolunda(5q21) yer alan ve tümör süpresör gen olan APC’de germline bir mutasyon söz konusudur (78). APC, Wnt sinyal yolu, intrasellüler hücre adezyonu, iskelet stabilizasyonu, hücre döngüsü düzenlenmesi ve apoptozda önemli rol oynayan 312 kD’luk APC proteini kodlamaktadır. APC döngüsü mutasyonlarının, c-myc ve siklin D1 gibi onkogenlerin düzensiz transkripsiyonuna izin verdiği düşünülmektedir. Wnt sinyal yolağı kanser gelişiminde oldukça önemli mekanizmaları içermektedir (79).

2.1.4. Wnt sinyal yolağı

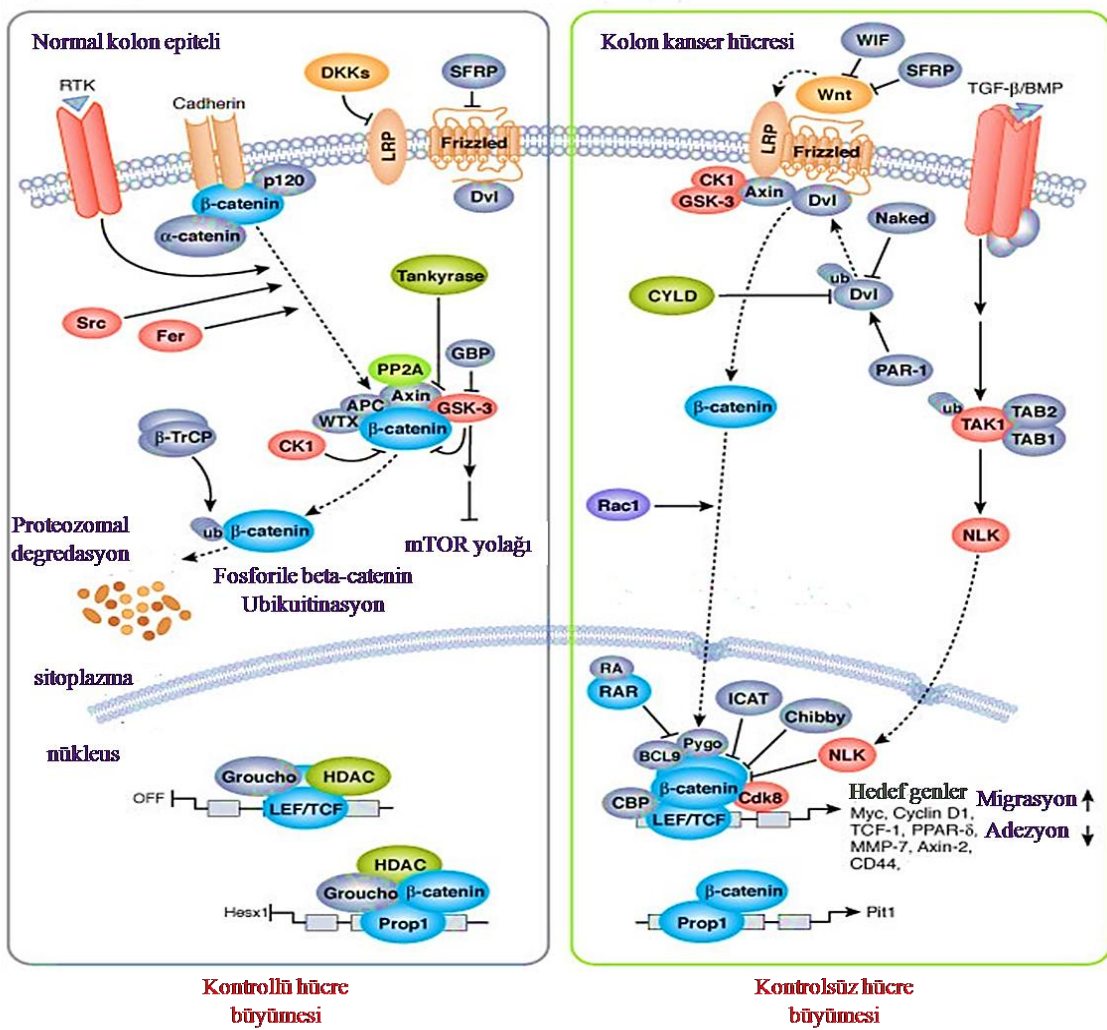
Kolorektal kanserlerde, Wnt yolağının önemli bir bileşeni olan adenomatöz polipozis koli (APC) genindeki mutasyonlar hakim olmaya devam etmektedir. Germline mutasyonlar, ailesel adenomatöz polipoz ve sporadik kolorektal tümörlerin en az üçte ikisine neden olarak tümörigenezi başlatmaktadır. Bu mutasyonlar hemen hemen her zaman APC proteininin C-terminal fonksiyonlarının (mikrotübül bağlama, hücre polaritesi, kromozom segresyonu) kaybına neden olur ve SAMP tekrarlarındaki delesyonlar β -katenin fosforilasyon kompleksi oluşumu ve Axin bağlanması için oldukça önemlidir. Kolorektal tümörlerin bir kısmında, Wnt aktivasyonu β -katenin in 3.

ekzonu içindeki fosforilasyon bölgelerinin mutasyonu sonucu oluşur ki bu protein stabilizasyonuna neden olur. Diğer tümörlerde, epigenetik transkripsiyonel susturmalar ya da frizzled-ilişkili protein salgılanmasındaki mutasyonlar Wnt seviyesini modüle etmektedir. AXIN1, AXIN2 ve TCF4 gibi Wnt komponentlerindeki mutasyonlar mikrosatellit kararsız bulunmuştur ancak bu değişimlerin fonksiyonel olup olmadığı açık değildir. Wnt yolunun terapötik modülasyonu kolorektal karsinom için cazip bir tedavi imkanı sağlayabilir (80).

Hücre sinyal glikoproteinlerinin büyük bir ailesinde oluşan Wnt faktörleri, Frizzled hücre-yüzey reseptörleri ile ilişkilidir. Frizzled proteinleri tarafından bu sinyal transdüksiyonunun nasıl yapıldığı henüz tam olarak açıklanamamaktadır (81). Frizzled proteinler, intraselüler Wnt ligand bağlayıcı proteinleri aktive eder (81,82). Axin ile ilişkisi olan dishevelled, GSK-3 β 'nin substratlarını fosforilleyerek aktivitesini engeller. (81,83-85). Glikojen sentaz kinaz 3 β ve substratları, Axin, β -katenin ve tümör süpresör Adenomatöz polipozis koli(APC) yi içeren sitoplazmik multiprotein kompleksi içinde yer almaktadır (81,86-89). Wnt sinyal yokluğunda, β -katenin kompleks içerisindeki GSK-3 β tarafından fosforile edilir. Daha sonra, ubiquitinasyon denilen ve β -TRCP aracılığıyla olduğu kabul edilen bir başka β -katenin modifikasyonu gerçekleştirilir. İkinci modifikasyon proteozom yolağı aracılığıyla β -katenin degradasyonunu hedeflemektedir (81,90,91). Wnt sinyal yolunun aktivasyonunu takiben, GSK-3 β inaktive edilir ve nonfosforile β -katenin kompleksten salınır. Fosforile olmamış β -katenin uzun süre degrade olmaz ve sitoplazma ve çekirdekte birikir (81,92,93). β -katenin nukleusta HMG-box proteinleri ailesinden T hücre/lenfosit enhancer faktör üyelerini bağlar (81,94). Bu proteinler DNA'ya bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmek için β -katenin e ihtiyaç duyar (81,92,93,94). Wnt sinyal yokluğunda, β -katenin nukleusta mevcut değildir. Bu dinlenme koşulları altında, TCF proteinleri hedef gen transkripsiyonunun baskılanmasında çeşitli molekülleri (CtBP, Grg) bağlı tutarak işlev görürler (81,95-99).

Wnt yolağının hedef genleri içerisinde siklin D1, c-myc, c-jun, TCF1, metalloproteinaz matrilisin ve PPAR δ olduğu rapor edilmiştir (81,100-103). Bunun yanı sıra, insan kanserlerinde, bu yolaktaki üç regülatör genin (APC, Axin ve β -

katenin) mutasyonlarının etkili olduğu bilinmektedir. Bu mutasyonların sonucu non-fosforile β -katenin birikimi, yapısal gen transkripsiyonu aktive eder ve böylece muhtemel karsinogenezi başlatır (81).

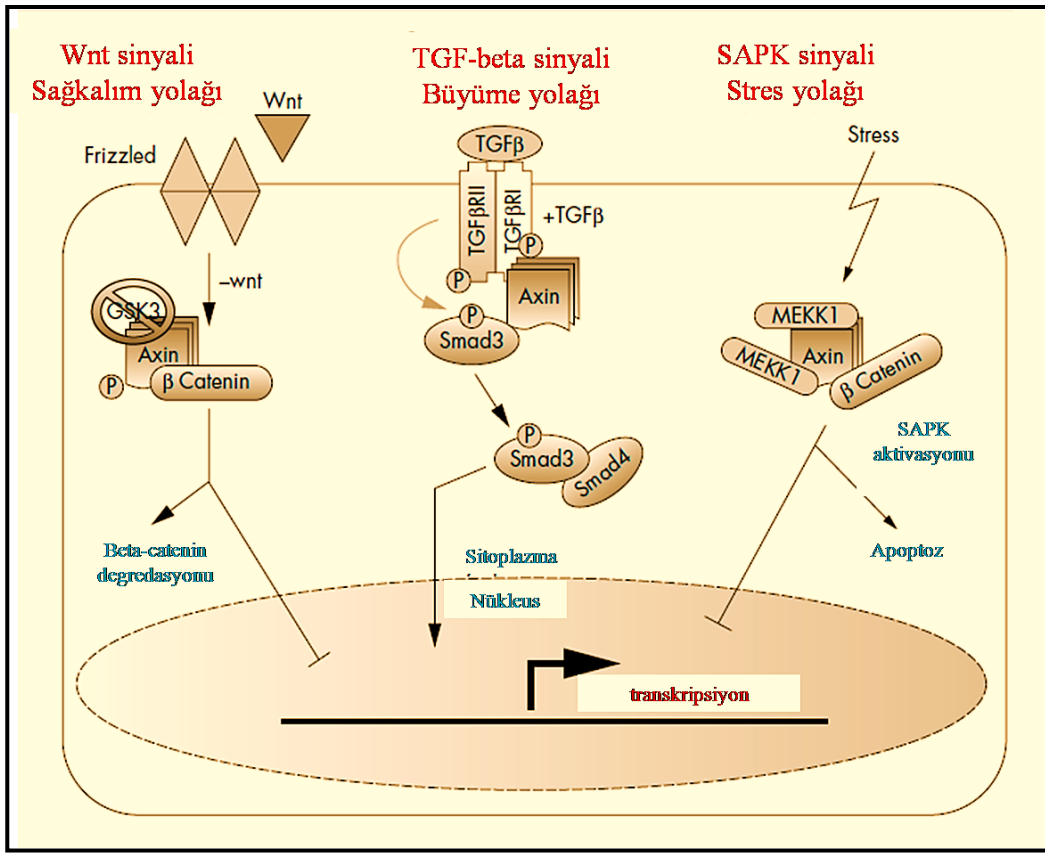


Şekil 2-5: Kolorektal kanserde Wnt yolağı (104)

2.1.4.1. Axin yapısı, karsinogenezdeki rolü ve Wnt sinyal yolağı

Axin bir multidomain protein olarak birçok proteinle etkileşim içerisindedir ve ana iskele protein olarak c-jun/SAPK, TGF-Beta ve Wnt sinyal yolları üzerinde

etkilidir. Farklı sinyal yollarında Axin in farklı domainleri etkilidir ve her bir domain farklı görevleri gerçekleştirir. Wnt ligandı yokluğunda, Axin proteozom kompleksi tarafından β -katenin degradasyonunu stimüle eder ve transkripsiyonel aktivite durur. TGF- β reseptör sinyali varlığında ise TGF reseptör I ve II aracılığıyla Axin ve Smad fosforilasyonu stimüle edilir. Aktive Smad'lar nukleusa transloke olur ve hedef genlerin transkripte olmasını sağlar. Son olarak, strese maruz kalan hücrelerde Axin mitojen aktive proteini bağlar ve stresle aktive olan protein kinaz (SAPK/Jun) aracılı apoptozu stimüle eder. (105).

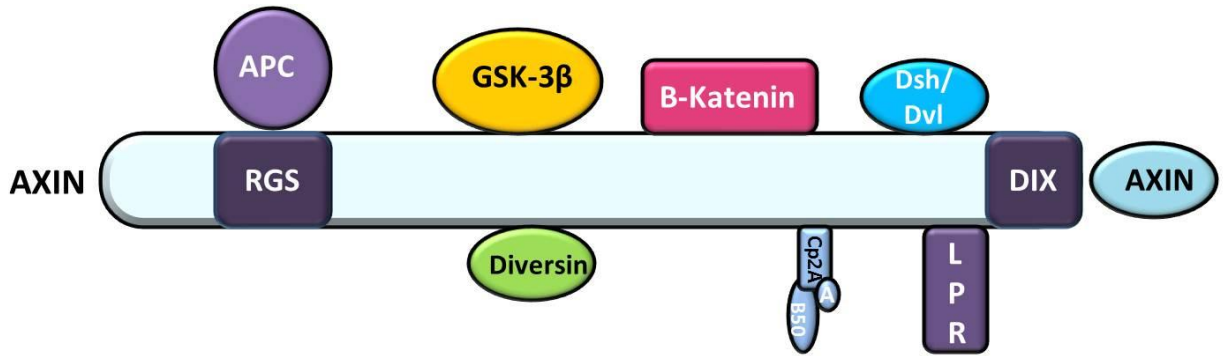


Şekil 2-6: Axin aracılığıyla düzenlenen üç farklı sinyal yolağı (105)

Axin1 (aynı zamanda sadece Axin olarak da adlandırılır) izoform a ve b'yi kodlar. Axin2'nin ise (axil ya da kondaktin olarak da adlandırılır) %45i nükleotit seviyesinde tanımlanmıştır ve fonksiyonel olarak benzer proteinleri kodlamaktadır. Axin1 ilk olarak fare fused lokus ürünü olarak tanımlanmıştır. Axin1'in insan homologue kromozom üzerinde 16p13.3 noktasında haritalanmıştır ve fare proteini ile %87 oranında benzerlik göstermektedir (106). Axin1 izoform a, 862 amino asit uzunluğunda

bir polipeptidi kodlarken, isoform b N-terminal domainde 36 aa eksik olarak bulunan ve ekzon 8 tarafından kodlanan Axin'in kısa formudur. Ekzon 8 tarafından kodlanan polipeptit, β -katenin-bağlayıcı, Dishevelled ve Axin-binding domain (DIX) arasında lokalizedir. Bu bölgenin, CKI fosforilasyon bölgesini hatta Axin'lerin birbirine bağlandığı Axin oligomerizasyon bölgesini içerdiği söylenmektedir. Bu Axin dimerizasyonunun hücrelerin istikrarı ve fonksiyonu için gerekli olduğu düşünülmektedir (107).

Axin homologu olan Axin2, β -katenin ile olan etkileşimi sayesinde tanımlanmıştır (107-110). Hatalı MMR sistemine sahip kolorektal kanserlerde Axin2 gen mutasyonları sonucu β -katenin konsantrasyonlarında artış olmaktadır (25). Axin1 ile benzer şekilde Axin2'de a ve b izoformlarını içermekte ve her iki Axinde APC, GSK-3 β ve β -katenin bağlayıcı bölgeye sahiptir (107,111). Yüksek oranda korunmuş iki Axin domaini vardır (112): N-terminal uçta APC bağlanma bölgesini içeren RGS domaini (87,113) ve DIX domain (114). Axin merkez bölgesinde GSK-3 β ve β -katenin bağlayıcı bölgeleri içerir. Aynı zamanda C-ucunda DIX aracılığıyla dishevelled (Dsh) bağlar. Dishevelled ile etkileşim, GSK-3 β tarafından Axin fosforilasyonunu inhibe eder (84). DIX domaini delesyonları, Axinin Wnt sinyal yolağındaki down-regulatör özelliğini ortadan kaldırmaktadır (81,115-117).



Şekil 2-7: Axin ile ilişkili Wnt sinyal yolağı komponentleri (118)

Axin/Axin2 mutasyonları ya da delesyonları birçok tümör tipinde gözlenmiştir. Kolorektal kanserde, Wnt sinyal sisteminin birçok bileşeni mutasyona uğramıştır. APC geni üzerindeki fonksiyonel mutasyonların germline kaybı kolorektal kanserin kalıtsal formu olan ailesel adenomatöz polipozis ile %90-95 penetrasyon gösterecek şekilde ilişkilidir. Somatik APC mutasyonları en çok sporadik kolorektal kanserlerde

görülmektedir (105,119). β -katenin, TCF, Axin1 ve Axin2 gibi Wnt sinyal yolağının diğer önemli bileşenlerindeki değişikliklerin bu hastalığın etiolojisinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (105,120). Kolorektal kanserdeki birçok Axin1 mutasyonu APC, GSK-3 β ve β -katenin bağlayıcı domainin yer aldığı ekzon 1 ve 5 arasında oluşmaktadır. Kolorektal tümörlerdeki Axin2 mutasyonlarının yaklaşık %20'si MMR'deki bozukluklar sonucu oluşmaktadır (105,121-125).

Axin SAPK/JNK (apoptoz) yolağının pozitif, Wnt (survival) yolağının ise negatif düzenleyicisidir ve bu sistemler için sınırlayıcı faktördür. Bu yüzden Axin antagonist ve agonistlerinin keşfi kanser tedavisi için potansiyel hedeftir. Ayrıca Axin, fonksiyonel APC eksikliği olan hücrelerde aşırı eksprese edildiğinde β -katenini degrade edebilmektedir. Bu nedenle, APC ilişkili kanserlerde Axin tedavileri seçici olacaktır (105).

β -katenin kompleksiyle Wnt regülatörü görevi gören Axin'e ek olarak, Galektin-3'ünde benzer sekans motifi göstererek Wnt yolağı için önemli bir molekül olduğu bilinmektedir. β -galaktozid bağlayıcı protein ailesinin bir üyesi olan Galektin-3 (gal-3), β -katenin-bağlayıcı protein olarak tanımlanmıştır. Veriler, gal-3 molekülünün Wnt/ β -katenin yolağının önemli bir regülatörü olduğunu ve gal-3 ve β -katenin arasındaki fonksiyonel benzerlikleri ortaya koymuştur (9).

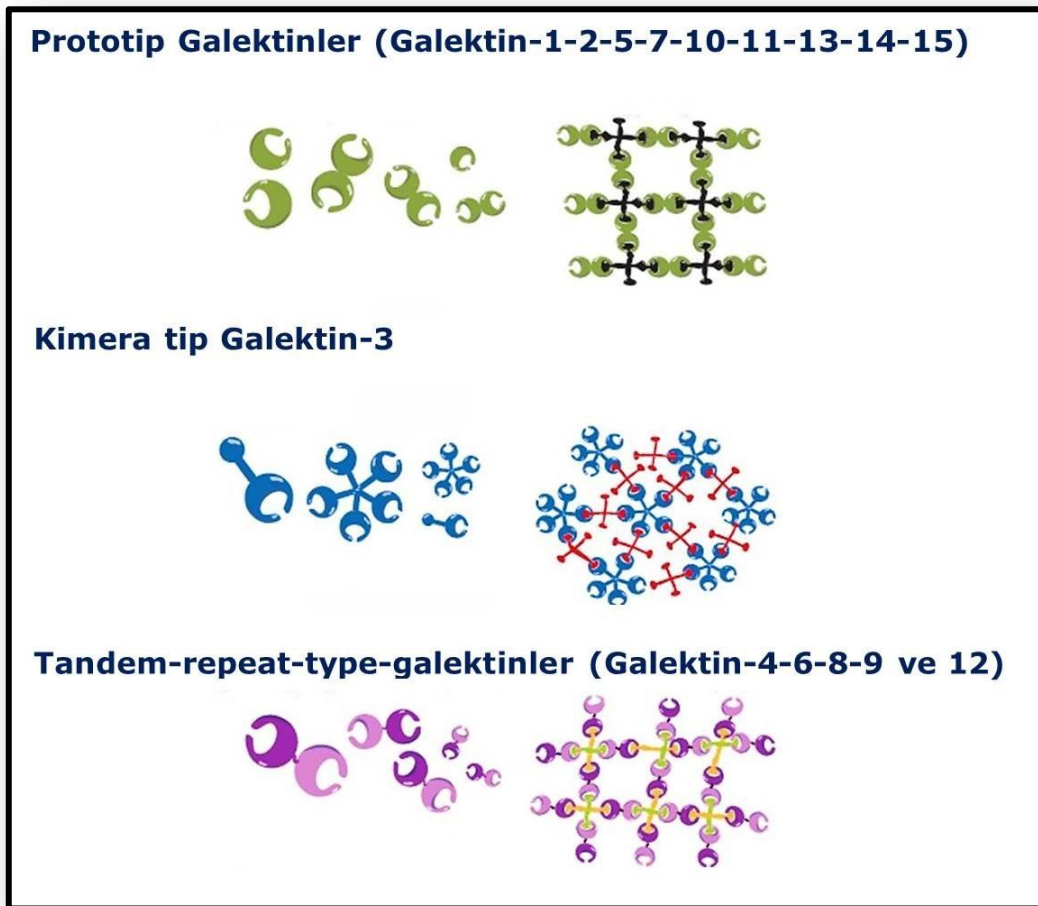
2.1.4.2. Galektin yapısı, karsinogenezdeki rolü ve Wnt sinyal yolağı

Galektinler, ortak paylaşılan amino asit dizileri ve oligosakkarit zinciri içeren, β -galaktoz için yüksek afinite ile tanımlanan hayvansal lektinlerdir (126,127). Galektinler, hücre dışında hücre yüzeyi ve ekstraselüler matrix glikanlarına bağlanır ve böylece çeşitli yollardan hücrel süreçler üzerinde etkili olur. Ancak, galektinler sitozol ve nükleusta da saptanabilir ve sitoplazmik ve nüklear proteinlerle beraber protein-protein etkileşimleri sayesinde intraselüler sinyal yolları gibi hücrel fonksiyonları etkileyebilir. Yapılan çalışmalar galektinlerin immün ve inflamatuvar yanıtlar, tümör gelişimi ve ilerlemesi, sinir dejenerasyonu, ateroskleroz, diyabet ve yara onarımı dahil olmak üzere, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rol oynadığını göstermektedir (128). Ayrıca, neoplastik transformasyon, tümör hücre sağkalımı, anjiyogenez ve tümör metastazına katkıda bulunmasından dolayı kanser biyolojisinde bir dizi önemli rol oynamaktadırlar (127,128). Bu nedenle, galektinler

teröpatik hedef olarak kullanılabilir ve inflamatuvar hastalıklar, kanser ve diğer bazı hastalıklar için terapötik ajan olabilirler (128).

Bugüne kadar, 15 memeli galektini tespit edilmiştir ve keşif sırasına göre (Galektin-1,Galektin-15) ardışık olarak numaralandırılmıştır. Tüm galektinler, karbonhidrat bağlanmasından sorumlu, yüksek derecede korunmuş, 130 amino asitlik karbonhidrat tanıma bölgeleri (CRDs) içerirler.

Prototip galektinler (Galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 ve -15) sadece bir CRD ye sahiptir. Tandem-repeat-type galektinler (Galektin-4, -6, -8, -9 ve -12) tek polipeptid zinciri üzerinde iki homolog CRD içerirler ve bunlar 70 aminoasite kadar ulaşan bağlayıcı tarafından ayrılmıştır. Galektin-3 ise, CRD bağlantısı için yaklaşık 120 amino asitlik nonlektin N-terminal bölge içermektedir (128).



Şekil 2-8: Galektin aile üyeleri ve Galektin-glikan kafes oluşumu (128)

Her galektinin karbonhidrat bağlama tercihi farklıdır (128,129). Çoğu galektin, karbonhidrat-bağlama aktivitesine bağlı olarak ya bivalent ya da multivalenttir. Tek-CRD bölgesi içeren galektinler dimer olarak mevcuttur, iki-CRD içeren galektinler iki karbonhidrat bağlama bölgesine sahiptir ve bu yüzden en az bivalenttir, galektin-3 ise multivalent karbonhidrat bağlamak üzere pentamer formdadır (128,130,131).

Galektin ailesi üyeleri, klasik bir sinyal dizisi içermez. Bu özelliği ile uyumlu olarak, proteinler, belirli koşullar altında nukleusta bulunmalarının yanı sıra, esas olarak sitoplazmada lokalize edilmiştir. Bazı galektinler, karbonhidrat yapısına bağlı olarak, birkaç farklı hücre yüzey antijen ya da reseptörüne bağlanabilir. Bu galektinlerin, özel reseptörler olmadığını ve uygun oligosakkarit içeren hücre yüzeyi ya da ekstra selüler matriks glikoproteinlerinin varlığında bağlanma gerçekleştirebileceğini göstermektedir. Buna ek olarak birçok çalışmada da, galektinlerin hücre içi fonksiyonları gösterilmiş ve karbonhidrat bağlama aktivitelerinin bağımsız olarak yapılabildiği bildirilmiştir. Galektinlerin, hücre içi ligandları bağlayabilme ve hücre içi sinyal yollarına katılma yoluyla sinyal iletimini düzenlemesi kanıt olarak gösterilmektedir (128,132).

2.1.4.2.1. Galektin-3

Galektin-3, β -galaktozid bağlayan hayvansal lektinler grubunun 31 kDa'luk üyesidir. Galektin-3, üç yapısal domain içermektedir: gelectin-3 homo-dimerizasyonu için gerekli olan amino terminal domain, tek bir karbonhidrat tanıma bölgesi (CRD) içeren COOH-terminal domain ve amino-terminal domain (133,134).

Ayrıca, N-terminal bölgesinde kısa amino asit segmentlerinden oluşan (yaklaşık olarak 120 aa'lik) ardışık tekrar bölgeleri içeren ve bu sayede C-terminal CRD ile bağlantı kurma özelliğine sahip tek galektindir (128). Bu protein, çeşitli hücre tipleri ve dokularda eksprese edilmektedir. Hücre tipi ve proliferatif durumuna bağlı olarak nukleus, hücre yüzeyi ve ekstraselüler çevrede bulunabilmesine rağmen esas olarak sitoplazmada görülmektedir. Galektin-3, endoplazmik retikulum/Golgi ağı üzerinden ilerleyen klasik salgı yolundan bağımsız bir şekilde ve henüz tam olarak aydınlatılmamış yeni bir mekanizma tarafından hücrelerden salgılanmaktadır. Galektin-3, pleiotropik biyolojik fonksiyon sergiler ve bu sayede birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli rol oynar (135).

Gen transfeksiyon ve antisens yaklaşımlar kullanarak, Galektin-3'ün bir dizi hücre tipinde apoptotik uyarılara karşı anti-apoptotik aktivite gösterdiği bulunmuştur (128,136,137). Galektin-3, anti-apoptotik aktivitesi Ser6 fosforilasyonuna bağlıdır (128,138). Fosforilasyon, hücreler apoptotik uyarılara maruz kaldıklarında , proteinlerin hücre dışına taşınması için gereklidir (128,139).

Ayrıca, Galektin-3, integrinleri içeren ekstraselüler matriks proteinlerini karbonhidrat-bağımlı bir şekilde bağlayabilir ve böylece ekstraselüler matriksin hücre adezyonunu etkiler (128,140). Kavramsal açıdan, pentamerik Galektin-3 multivalans özelliği sayesinde glikanlar için eşzamanlı olarak iki bağlanma bölgesi oluşturarak , ekstraselüler matriks ve hücreler arasında köprü rolü oynar. Ayrıca, pentamerik Galektin-3, seçilmiş hücre-yüzey glikanları ile birlikte kafesler oluşturabilir. Bu, TCR, EGFR, ve TCF β için gösterilmiştir (128,141,142).

Bunlara ek olarak, Galektin-3'ün bazı genlerin ekspresyonunu regüle ettiği gösterilmiştir. Örneğin, kanser ile ilgili genlerden siklin D1, troid transkripsiyon faktör 1 ve musin 2 gibi (128,143).

Galektin-3, immün ve inflamatuvar yanıtların oluşmasında da önemli bir molekül olarak yer almaktadır. Galektin-3 çeşitli bağışıklık hücrelerinde büyüme ve farklılaşmayı etkilemektedir. Örneğin, T hücreleri ve nötrofillerde apoptozu indüklemektedir. Ayrıca, mast hücreleri, nötrofiller, monositler ve T hücrelerinde dahil olduğu çeşitli lenfoid ve myeloid hücreleri aktive eder (128,144,145). Bunlara ek olarak, insan eozinofillerinin IL-5 üretiminin inhibisyonunu sağlayarak, myeloid hücreler üzerinde baskılayıcı etki göstermektedir (128,146). Ayrıca daha önce belirtildiği gibi, gal-3 ekstraselüler matrikste TCR kafesleri oluşturabilir ve bu mekanizma TCR tarafından başlatılan sinyal transdüksiyonunun negatif düzenleyicisidir.

2.1.4.2.2. Tümör gelişimi ve ilerlemesinde Galektin-3

Birçok kanser tipinde, gal-3 ekspresyonu değişkenlik göstermektedir (127,129). Galektin-3'ün tümör büyümesi, ilerlemesi ve metastazdaki rolü yaygın bir şekilde çalışılmıştır (128,147).

Galektin-3'ün hücre transformasyonu ve büyümesi üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılamamıştır ancak onkogenik K-RAS ile olan etkileşim yeteneği ve K-RAS/RAF/PI3K sinyal transduksiyonunu kolaylaştırmasının etkili olabileceği düşünülmektedir (128,148).

Aynı zamanda gal-3 ün siklin D1 ve c-myc ekspresyonunu uyarması ve β -katenin bağlayıcı özelliği ile Wnt yolağındaki etkisine ek olarak, hücre döngüsünün düzenlenmesi yoluyla da tümörogenezi etkileyebilir (128,149,150). Son çalışmalar, p53 tümör süpresör geninin neden olduğu apoptozda gal-3 ün baskılandığına işaret etmektedir (128,151).

Galektin-3 aynı zamanda tümörlerin mikroçevreleri üzerinde etki ederek tümör metastazını etkileyebilir. Stromada gal-3 varlığının meme kanseri için negatif bir prognostik faktör olduğu göstermiştir (128,152). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar, in vivo tümör metastazında Galektin-3 rolü için kanıt sağlamıştır (147). Örneğin, SCID farelerde, insan adenokarsinoma xenotransplants karaciğer metastazları anti-gal-3 antikoru tarafından inhibe edilmiştir. Transgenik gal-3 ün overeksprese olduğu meme kanseri hücreleri yüksek metastatik potansiyele sahiptir. Ayrıca, proteinin C-terminal domain fragmenti, insan meme kanserinin ortotopik nude fare modelindeki tümör metastazını inhibe etmiştir (128,153).

Son 10 yıl içerisinde yapılan çalışmalar, sindirim sistemi malignitelerinde, özellikle kolorektal kanserin gelişimi ve ilerlemesinde çeşitli galektinlerin önemini ortaya koymuştur (154). Kolon kanserinde, artan gal-3 seviyesi neoplastik progresyon ile ilişkilidir (154-157). Ayrıca, kolon kanseri gelişimi boyunca, kolon kanser hücrelerinde nüklear gal-3'ün kaybıyla birlikte subselüler gal-3 lokasyonunda da belirgin değişiklikler olmaktadır (154,158). Sanjuan ve ark., neoplastik progresyonun ilk aşamalarında nüklear gal-3 ekspresyonunun down-regüle olduğunu göstermiştir, oysaki sitoplazmik ekspresyon tümör gelişiminin ileri aşamalarında artmaktadır (154-159).

Galektin-3 sitololaksyon mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. İlginç bir şekilde, murin ve insan fibroblastı ile yapılan çalışmalar nükleusta hem fosforile hemde

non-fosforile galektin-3 ün bulunduğu ancak fosforile formun sadece sitoplazmada bulunduğunu ortaya koymuştur (154,160). Fosforilasyon galektin-3'ün laminin ve müsinine bağlanmasını %85 ten fazla oranda azaltmaktadır (161) ve fosforilasyon antiapoptotik ve antianojen aktivite için gereklidir (162) bu nedenle değişen gal-3 sitolokasyonu ile birlikte sitoplazmik ve fosforile gal-3'ün artışı neoplastik hücrelerin metastatik potansiyel kazanmalarına neden olabilir (154).

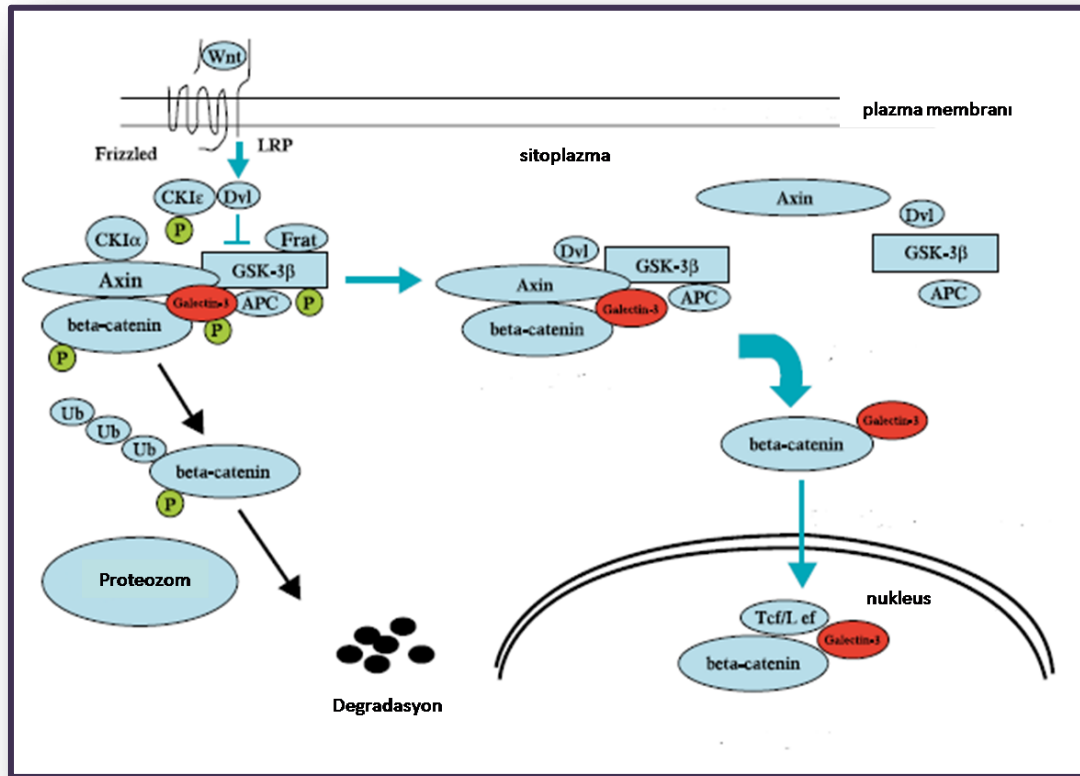
Bunun yanı sıra, gal-3 AP-1 aktivasyonu ile MUC2 müsin transkripsiyonunu upregüle etmektedir (163). MUC2 müsinöz karsinomalarda güçlü bir şekilde ifade edilmektedir (164) ve müsinöz kolorektal karsinomalı hastalarda hastalık seyrinde tipik olarak ileri düzeydedir.

Ayrıca, serum Galektin düzeylerinin değerlendirilmesi ilginç bir klinik araç olabilir (154). Gerçekten de, sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında, kolorektal kanserli hastalarda Galektin-3 serum düzeyleri metastatik hastalığı olan hastalarda bulunan maksimum konsantrasyonları ile önemli ölçüde daha fazladır (165).

KRK hem onkogenler hem de baskılayıcı genlerdeki mutasyonların birikimi ile gelişen çok aşamalı bir süreçtir (166). Kolorektal kanserlerin %90 ından fazlasında Wnt sinyal yolağının yapısal aktivasyonu tümörögenезin ilk olaylarından (167,168). Son zamanlarda, Gal-3, β -katenin için yeni bir bağlanma partneri olarak tanımlanmıştır ve bu yüzden Wnt sinyal yolağı ve gal-3 bağlantısı önemlidir (149,166). Wnt sinyal yolağı üzerinde, β -katenin-Axin ilişkisinin, GSK-3 β nın β -katenini fosforile etmesiyle başladığı raporlanmıştır (9,116,109). Oysaki galektin-3 ün β -katenin bağlayan yeni bir üye olduğu bulunmuştur (149). İnsan gal-3 ün GSK-3 β ile benzer sekans motifi (S92XXS96) taşıması, galektin-3 ün Axin bağlayıp bağlayamayacağı yada GSK-3 β tarafından fosforile edilip edilemeyeceği sorusunu akla getirmiştir (150). Son zamanlarda yapılan çalışmalar meme kanserinde, galektin-3ün β -katenin ve TCF4 bağlayarak siklin D1 ve c-myc gibi Wnt sinyal yolağı hedef genlerini aktive ettiğini göstermiştir (168,149,150). GSK-3 β olan ya da olmayan ve [γ -32P]ATP içeren reaksiyon karışımı içinde gal-3 inkübasyonu takip edildiğinde, galektin3 ün GSK-3 β tarafından fosforile edildiği ve bu fosforilasyonunda LiCl gibi GSK-3 β inhibitörleri tarafından inhibe edildiği bulunmuştur (9). β -katenine benzer şekilde Axin de GSK-3 β

bağımlı fosforilasyonu artırır (9,109,113,116,169), Axin, galectin-3 ün GSK-3 β bağımlı fosforilasyonunu sağlamaktadır (9).

Şekil 2-9: Galectin-3- β -katenin etkileşimi ve Wnt sinyal yolağı (9)



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grupta, 100 kişiden oluşan herhangi bir malignite bulgusu ve tercihen ailede kanser hikayesi olmayan sağlıklı bireyler kontrol grubuna alınmıştır.

İkinci grupta, İ.Ü. Radyasyon Onkolojisi, Samatya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Kliniği tarafından takip edilen 100 kolorektal kanserli hasta yer almaktadır. Projemize dahil edilen, kolorektal kanser tanısı konmuş hastalarımızın, klinik, histopatolojik değerlendirmeleri ve örnek alımları ilgili klinikler tarafından gerçekleştirilmiştir. Polimorfizm çalışması için sağlıklı ve kolorektal kanserli bireylerin kan örnekleri EDTA'lı tüpe alınıp, DNA izolasyonu yapılmış ve 100 kolorektal kanserli hasta, 100 sağlıklı kontrolde Axin1, Galektin-3 e ait gen polimorfizm analizleri yapılmıştır. Ayrıca sağlıklı ve hasta bireylerin serum Galektin-3 düzeyleri analizleri yapılmıştır.

Kolorektal kanserli ve normal bireylerden sağlanan kan örneklerinden DNA izolasyonu amonyum asetat ve proteinaz K'nın kullanıldığı tuz çöktürme yoluyla elde edilmiştir (170).

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz (Promega MBG), Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorür (Sigma A-5666), Amonyum sülfat, Asetik asit (MECK K-04134156), Borik asit (Sigma B-6768), Bromfenol blue (Sigma B-6896), DNA marker (Fermentas), EDTA (Merck K-90602121), Etanol (%99 Tekel), Etidyum Bromid (Sigma E-8751), Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), İzopropanol, Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Potasyum hidroksit (Sigma P 1767) Primerler (Fermentas), Proteinaz K (Stratagene 300-141) Sodyum dodesil (lauryl) sülfat (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C754962), Sodyum klorür (Carlo Erba 368257), Trizma baz (Sigma T-1503), Taqpolimeraz (Promega), Xylene blue (Fermentas).

3.3.Kullanılan Gereçler

Elektroforez için güç kaynağı (Titan plus Helena Laboratories), Elektroforez sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis), Hassas terazi (Mettler), Isıticılı manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj (TDX), PZR cihazı (MJ Research Techne), pHmetre (Hanna), Pipet takımı (Brand), Santrifüj (Hereaus), Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208), Su banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), Vorteks karıştırıcı (Nuve mix), nanodrop (ND-1000 spectrophotometer).

3.4. Çözeltiler

3.4.1. Dna İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.4.1.1.Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)

8.74 gram Amonyum klorür, 1 gram Potasyum bikarbonat, 200 µl 0.5 M Etilen diaminetetraasetat (EDTA)'ın tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 mililitre distile su eklendi ve çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak 1 litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktarılarak 120°C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

3.4.1.2. 0.5 M Disodyumetilendiaminteraasetat (EDTA) (pH 8.0)

186.1 gram Etilendiamintetraasetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü ve pH'sı NaOH çözeltisi ile 8.0'e ayarlanarak distile su ile 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl)

233.6 gram NaCl tartılarak erlene alındı. Üzerine 800 mililitre distile su ilave edildi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı. 120°C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL)

25 mililitre 4 M NaCl ve 50 mililitre 0.5 M Etilendiaminasetat (EDTA) balon jojeye konularak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

3.4.1.5. 1 M Tris Tamponu (Stok)

121.1 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 42 µl hidroklorik asit (HCl) ile yaklaşık 800 mililitre distile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldürüldü. Daha sonra balon jøjeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.6. 9.5 M Amonyum Asetat

73.22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 mililitre distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözüldürüldü. Balon jøjeye aktarıldı ve distile su ile 100 mililitreye tamamlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve +4°C’de saklandı.

3.4.1.7. %10’luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

10 gram Sodyum dodesil sülfat tartıldı. Beher içine alınarak üzerine 80 mililitre distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldürüldü ve pH’sı 7.2’ye ayarlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml)

20 miligram Proteinaz K tartılarak steril bir tüp içinde steril distile su ile 1 mililitreye tamamlandı. -20 °C’de saklandı.

3.4.2. Agaroz Jel Elektroferezinde Kullanılan Çözeltiler

3.4.2.1. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X)

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0.2 mililitre 0.5 M ,etilendiamintetraasetat, 1 mililitre 1M Tris (pH 8.0), 200 miligram Bromfenol blue, 200 miligram xylene cyanol tartılarak steril distile su ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

3.4.2.2. Etidyum Bromür (10 mg/ml)

1 gram Etidyum bromür tartılarak steril distile su ile 10 mililitreye tamamlandı.

3.4.2.3. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE)

54 gram Tris baz ve 27,5 gram borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 mililitre 0.5 M EDTA (pH 8.0) ve 800 ml. distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözüldürüldü.Çözelti balon jøjeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı ve 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Periferik Kandan Dna İzolasyonu

10 ml periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30 ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve +4°C'de 15 dakika bekletildi. +4°C'den çıkarılan örneklerin 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen süspansiyon edilerek üzerlerine tekrar 15-20 ml. eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler +4°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atılarak süspansiyon edildi. Süspansiyon olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS, 75 µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9.4 ml lökosit parçalama çözeltisi (WBL) eklenerek 56 °C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her 1 ml. örnek başına 0.37 ml. olacak şekilde 9.5 M Amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşça karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü (170).

3.5.1.1.Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini

Spektrofotometrik olarak, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. 50µg/ml çift iplikçikli DNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda 1 optik densite (OD) verdiği kabul edilmektedir.260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu: $OD_{260} \times 50\mu\text{g/ml}$

DNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1.8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1.8'den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

3.5.2. Axin1 Gen Polimorfizminin Allel Spesifik Pzr (AspZR) İle Tespit Edilmesi

3.5.2.1. Axin1 rs214250 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri

Axin1 ile ilgili gen bölgesinin çoğaltılmasında Allel Spesifik PZR (ASPZR) yöntemi kullanılmıştır. Allel spesifik PZR (ASPZR) DNA' daki tek nükleotid değişikliklerinin saptanmasında kullanılan özgün bir yöntemdir. Diğer benzer metodlara kıyasla daha hızlı ve spesifik bir tanımlama sağlamaktadır. Yöntemin temeli, hem mutasyonun bulunduğu bölgeye hem de normal diziyi içeren bölgeye ait iki ayrı primer dizisinin aynı koşullar altında amplifikasyonuna dayanmaktadır. Kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler herhangi bir literatürden alınmış olmayıp sanal olarak dizayn edilmiştir (171).

Ortak primer: 5' - GGA TGC TCT CAG GGT TCT - 3'

Mutant primer:

5' - GAG GAC GGC GAT CCA TCA - 3'

Wild-type primer:

5' - GAA GAC GGC GAT CCA TCG - 3'

3.5.3. Galektin-3 Gen Polimorfizmlerinin Tespit Edilmesi

3.5.3.1. Galektin-3 rs4644 ve rs4652 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri

Galektin-3 rs4644 ve rs4652 için ilgili gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler, literatürden alınmış olmayıp internet ortamında sanal olarak dizayn edilmiş ve yine sanal PZR ile doğruluğu test edilmiş primer dizileridir (172).

İleri primer: 5' - TTA TCC TGG ACA GGC ACC TC - 3'

Geri primer: 5' - AAG GAA TGC CAT CTC ACC AG - 3'

3.5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PZR)'da Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PZR'ın Hazırlanışı

DNA Taq polimeraz enzimi (5U/ μ l) (Fermentas EPO402)

PZR reaksiyonundaki son konsantrasyonu 1 unite olacak şekilde 25 μ l lik PZR reaksiyonuna eklendi.

dNTP'ler (100 μ mol/ml) (Fermentas R0171)

100 mM'lık dNTP'lerden (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10' ar μ l alınıp (toplam 40 μ l) 1 μ l'lik tüpe kondu ve üzerine 960 μ l distile su eklenerek (d₂H₂O) 1000 μ l 1mM 'lık dNTP karışımı hazırlandı ve -20 °C derin dondurucuda saklandı. PZR reaksiyonuna bu stoktan alınan dNTP karışımı kullanıldı.

3.5.4.1. PZR Karışımının Hazırlanışı

Axin1 rs214250 bölgesindeki amplifikasyonun gerçekleştirilmesi için, toplam reaksiyon hacmi 25 μ l olacak şekilde Tablo3.1'deki bileşenler sırası ile 0,2 ml'lik steril tüpe konuldu. Her örnek için iki PZR tüpü hazırlandı. Ortak primer her iki tüpün içerisine, primer G sadece birinci tüpün içine, primer A ise sadece ikinci tüpün içine pipetlendi.

Galektin-3 rs4644 ve rs4652 polimorfizimlerinin tespitinin yapılmasında, her bir örnek için yine toplam reaksiyon hacmi 25 μ l olacak şekilde, Tablo3.2'deki bileşenler sırası ile 0,2 ml'lik steril tüpe konuldu. PZR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde, soğukta ve steril kabin içerisinde yapıldı.

Tablo 3-1: Axin1 için PZR karışımının hazırlanması

PZR Karışımı	dH ₂ O	MgCl ₂	MgFree (Tampon)	dNTP	Primer	Taq DNA Polimeraz
Miktar (μ l)	15.4	1.5	2.5	1.5	2	0.2

Tablo 3-2: Galektin-3 için PZR karışımının hazırlanması

PZR Karışımı	dH ₂ O	MgCl ₂	MgFree (Tampon)	dNTP	Primer	Taq DNA Polimeraz
Miktar (μ l)	17.2	1.5	2.5	1.5	1	0.3

Taq polimeraz eklendikten sonra hiç vakit kaybetmeden tüp içine konan bileşenlerin iyice karışması için pipetleme işlemi yapıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 24 µl reaksiyon karışımı dağıtıldı. Daha sonra her tüpe 1 µl DNA eklenerek yeniden pipetleme yapıldı ve daha önceden 95 °C sıcaklığa çıkarılmış PZR cihazına(Biorad Thermal Cycler)örnekler yerleştirildi ve PZR işlemi başlatıldı.

3.5.5. PZR Şartları

Axin1 rs214250 Gen Polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri(oratak primer) ve geri primerler(G ve A) için annealing derecesi optimize edilerek 60 °C sıcaklık kullanıldı (Tablo 3.3).

Galektin-3, rs4644 ve rs4652 Gen Polimorfizmlerinin tespiti için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi ise optimize edilerek sırasıyla, 58.8 °C sıcaklıkları kullanıldı (Tablo 3.4).

Tablo 3-3: Axin1 rs214250 Gen Polimorfizmi PZR Koşulları

95 °C	5 dakika
95 °C 60°C 72°C	30 saniye 1dakika 1dakika } 30 döngü
72°C	10 dakika

Tablo 3-4: Galektin-3, rs4644 ve rs4652 Gen Polimorfizmleri PZR Koşulları

95 °C	5 dakika
94 °C 58.8 °C 72°C	45 saniye 45 saniye 45 saniye } 35 döngü
72°C	5 dakika

3.5.6. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler Ve Gereçler

5X TBE (Tris Buffer EDTA) Stok Tampon Hazırlanışı :

54gr Tris base (Sigma, T-8524) ve 27,5 gr. Borik asit (Sigma, B-6768) tartılarak 800 ml distile suda çözüldü. Üzerine 20 ml 0,5 M EDTA (pH :8,0) ilave edildikten sonra 1000 ml'ye tamamlandı. Elektrofrezde stok 5X TBE tamponundan hazırlanan 1 X TBE kullanıldı.

Yükleme Tamponu (Loading Buffer : 6X)

Yükleme tamponu (loading buffer) olarak %40 sükröz + %0,25 bromfenol mavisi karışımı kullanıldı.

%2'lik Agaroz Jel Hazırlanması:

- 4 gr. agaroz (Sigma) tartılarak erlen içine konuldu. Üzerine son hacim 200 ml. olacak şekilde 1X TBE tamponu eklenerek, mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözüldürüldü.
- Erlenin sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde (50-55°C) çözülmüş agaroz jel içine 4,5 µl etidyum bromür (10mg/ml) ilave edildi.
- Hazırlanan jel yatay jel yatağı içine dökülerek, yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı.
- Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır duruma geldi.

3.5.6.1. Galektin-3 PZR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi:

- %2'lik jel hazırlandıktan sonra 1X TBE tamponu içeren jel tankı içine uygun şekilde konuldu.
- Agaroz jelin üzerini 2-3 ml gelecek şekilde 1X TBE tamponu jel üzerine eklendi.
- 7 µl PZR ürününe, 3 µl yükleme tamponu (6X) eklenip pipetleme yapılarak karıştırıldı. 10 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi.

Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı (E-C apparatus Corporation, E-C4000P) 500 miliamper 120 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi.

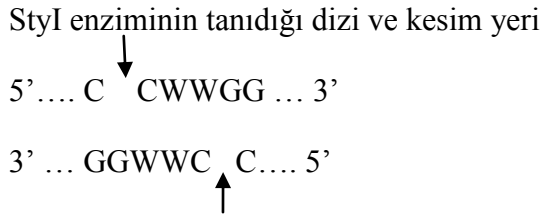
3.5.6.2. PZR Ürünlerinin Kontrolü:

Galektin-3 ile ilgili gen bölgelerine ait PZR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla PZR tüplerinden alınan 7 µl örnek 3 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yukarıda tanımlanan elektroforez sisteminde yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) PZR ürünleri incelendi ve fotoğrafı UV transillüminator düzeneğinde çekildi.

3.5.7. Galektin-3 Gen Polimorfizmlerinde Enzim Kesimi

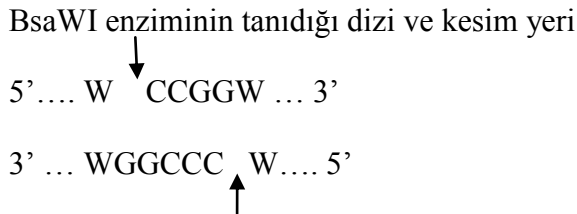
3.5.7.1. Galektin-3 rs4644 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

Amplifiye olan PZR ürünleri StyI enzimi 37°C’de 3 saat kesilmiştir. Kesim işleminde bir örnek için 5 µl PZR amplifikasyon ürünü, 4 µl distile su, Neb3 Tampon 1 µl, 0.1 µl BSA ve 0.25 µl enzim kullanılmıştır.



3.5.7.2. Galektin-3 rs4652 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

Amplifiye olan PZR ürünleri BsaWI enzimi 60°C’de 3 saat kesilmiştir. Kesim işleminde bir örnek için 5 µl PZR amplifikasyon ürünü, 4 µl distile su, 1 µl Neb4 tampon, 0.1 µl BSA ve 0.25µl enzim kullanılmıştır.







3.5.8.Axin1 rs214250 ve Galektin-3 rs4644, rs4652 Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü

- %3lik agaroz jel hazırlandı.
- Axin1 için doğrudan PZR ürününden, Galektin-3 için ise ilgili kesim enzimleri ile kesilen PZR ürünlerinden 8 µl ve yükleme tamponundan 2 µl alınarak karıştırılıp %3'lik agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı.
- Kesim ürünleri, DNA moleküler marker (Fermentas PUC 19, 50 bp marker) ile birlikte yürütüldü.
- Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık (304 nm) altında incelendi.

3.5.8.1.Axin1 rs214250 Gen Polimorfiziminin Değerlendirilmesi

Axin1 ilgili gen bölgesine ait primerlerinin amplifikasyonu sonucu 148 bç'lik PZR ürünü oluşmaktadır. Normal homozigot bireylerde (CC genotipi) amplifikasyonu ürünü sadece 2. tüpte (yani wild-type primerinin bulunduğu reaksiyon tüpünde), mutant homozigot bireylerde (TT genotipi) amplifikasyon ürünü sadece 1. tüpte (yani mutant primerinin bulunduğu reaksiyon tüpünde), heterozigot bireylerde ise (CT genotipi) amplifikasyon ürünü her iki tüpte (hem wild-type, hem de mutant primer dizilerini içeren reaksiyon tüpünde) gözlemlendi(Şekil 3.1).

	Normal Homozigot (CC)		Hererozigot (CT)		Mutant Homozigot (TT)	
	Mutant PZR ürünü	Wil-type PZR ürünü	Mutant PZR ürünü	Wil-type PZR ürünü	Mutant PZR ürünü	Wil-type PZR ürünü
Axin1 geni (148 bç) ürünü						

Şekil 3-1: Axin1 rs214250 Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü

3.5.8.2. Galektin-3 rs4644 Gen Polimorfiziminin Değerlendirilmesi

Uygun koşullar altında StyI enzim ile kesilen PZR ürünlerinden homozigot C alleleline sahip mutasyon içermeyen PZR ürünleri 201 bç büyüklüğünde tek bant verirken, mutasyon içeren A alleleline sahip ürünler enzim kesimi sonrası 170 bç ve 31 bç olmak üzere iki bant vermektedir. Heterozigot yani CA genotipine sahip mutasyonlu PZR ürünleri ise 201, 170 ve 31 bç olmak üzere her üç bandı da içermektedir (Şekil 3.2).

Yürüme yönü Yükleme kuyusu	CC	CA	AA
201bç		■	
170bç	■	■	■
31 bç		■	■

Şekil 3-2: Galektin-3 rs4644 Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü

3.5.8.3. Galektin-3 rs4652 Gen Polimorfiziminin Değerlendirilmesi

Uygun koşullar altında BsaWI enzimi ile kesilen PZR ürünlerinden homozigot C alleleline sahip mutasyon içeren PZR ürünleri, 201 bç büyüklüğünde tek bant verirken, A alleleline sahip ve mutasyon içermeyen PZR ürünleri 134 bç ve 67 bç olmak üzere iki bant verir. Heterozigot yani AC genotipine sahip mutasyonlu PZR ürünleri ise 201, 134 ve 67 bç olmak üzere her üç bandı da içerir (Şekil 3.3).

Yürüme yönü Yükleme kuyusu	CC	AC	AA
201bç			
134bç			
67 bç			

Şekil 3-3: Galektin-3 rs4652 Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü

3.5.9.Serum Galektin-3 Düzeyinin ELISA Yöntemi ile Tayini

Çalışmada ‘eBioscience’ tarafından geliştirilen ELISA test kiti kullanılmıştır. Örnekler kitte bulunan Sample Diluent ile 1:1 oranında sulandırıldı. 100µl standart, 50 µl kontrol ve örnek serumları Galektin-3’e karşı spesifik antikor kaplanmış kuyucuklara konulduktan sonra 50 µl Biotin-Konjugat eklenerek plate kaplanıp oda sıcaklığında çalkalayıcıda 400rpm de 2 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrası 350µl yıkama tamponu eklenerek 3 kez iyice yıkandı. İyice yıkandığından emin olunan kuyucuklara daha sonra 100’er µl galektin-3’e karşı poliklonal antikor (Streptavidin-HRP) eklendi. Daha sonra, oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat inkübasyon ve sonrasındaki yıkama aşamaları tekrarlandı. Kuyucuklara bundan sonra 100µl konjugat (TMB Substrat) eklendi. Oda sıcaklığında karanlıkta 10 dakika inkübe edildi ve her kuyucuğa 100 µl durdurma solusyonu (1M Fosforik asit) eklenip, bekletme yapmadan ELISA cihazında okutuldu. Sonuçlar ELISA okuyucusunda 450nm dalga boyunda okunduktan sonra ng/ml olarak hesaplanmıştır. Kitin galektin-3 ölçüm hassasiyeti 0.39 ng/ml olarak belirtilmiştir.

Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri için SPSS 11.0 paket programı kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alınmıştır. Axin1 ve Galektin-3 polimorfizmine ait genotip ve allellerinin görülme sıklığının, gruplar arası farklılıklarla beraber değerlendirilmesi için Ki kare (χ^2) ve Fisher Exact testleri, sayısal verilerin analizi için student-t testi kullanılmıştır. Allel frekansları gen sayımı yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasındaki serum galektin düzeyi karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamıza İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Kliniği ve Vakıf Gureba Bezmialem Üniversite hastanesi onkoloji kliniği tarafından kolorektal kanser tanısı konulan hastalar ile tercihen yaş ortalaması 50'nin üzerinde olan, ailede kanser hikayesi bulunmayan, sigara ve alkol kullanmayan sağlıklı bireyler dahil edilmiştir. Gönüllüler önce yapılacak araştırma ile ilgili bilgilendirilmiş ve gönüllü onam formu okutularak imzalatılmıştır.

Tablo 4-1: Çalışma gruplarına ait veriler

	KONTROL n= 117	KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALAR n= 119
Cins		
Kadın, n (%)	52(44.4)	42(35,3)
Erkek, n(%)	65(55.6)	77(64,7)
Yaş Ortalamaları (yıl)	56.2±11.35	60.98 ±13.3
Ailede Kanser Hikayesi		
Pozitif, sayı(%)	0 (0)	5 (4.2)
Negatif, sayı (%)	117 (100)	114 (95,8)
Alkol Kullanımı		
Pozitif, sayı(%)	0 (0)	4(3,4)
Negatif, sayı(%)	117(100)	115(96,6)
Sigara Kullanımı		
İçenler, sayı (%)	0(0)	9(7.6)
İçmeyenler , sayı (%)	117(100)	110(92.4)

n:birey sayısı; tablodaki değerler $X \pm SD$ olarak verilmiştir; gruplararası analiz student t testi ve Kikare (χ^2) ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma grubumuza dahil edilen kolorektal kanserli hastaların klinik ve patolojik verileri değerlendirildiğinde hastaların %3.4'ünde tümör T1, %18,4'u T2, %60.9'i T3 ve %17.2'si T4 evresindeydi. Hastalar lenf nodu tutulumu açısından incelendiğinde, N0 %49,4, N1 %29,9, N2 %13,8, N3 %6,9 olarak değerlendirilmiştir. Kolorektal kanserli hastalar histolojik evrelendirmeye göre değerlendirildiğinde, % 19,6'ü iyi differansiye, % 63'u orta differansiye, %17.4'si ise az differansiye tümörlerdi. Hastaların, %79,5'sinde uzak metastaz gözlenmezken, %20,5'sinde uzak metastaz söz konusuydu. Hastaların, %33,7'sinde perinöral invazyon gözlenirken, %66,3'ünde gözlenmemiştir. Hastalar anjiyolenfatik invazyon durumları açısından incelendiğinde, %32,1'inde anjiyolenfatik invazyon gözlenirken, % 67,9'unda gözlenmemiştir. Müsinöz komponent varlığı olan bireyler hasta grubunun % 9,2'sini oluşturmaktadır.

Tablo 4-2: Kolorektal kanserli hastalarda Axin rs214250, Gal3 rs4644 ve Gal3 rs4652 gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımları

Genotipler ve Alleller	Kolorektal Kanserli Hastalar n(%)	Kontroller n(%)	P
Axin rs214250			
CC	74 (62,2)	77 (65.8)	0.260
CT	33 (27.7)	23 (19.7)	
TT	12 (10.1)	17 (14.5)	
C Alleli	181 (76.1)	177 (75.6)	0.917
T alleli	57 (23.9)	57 (24.4)	
Gal3 rs4644			
CC	62 (52.1)	61 (52.1)	0.026
CA	52 (43.7)	40 (34.2)	
AA	5 (4.2)	16 (13.7)	
C alleli	176 (74)	162 (69.2)	0.25
A alleli	62 (26)	72 (30.8)	
Gal3 rs4652			
AA	46 (38.7)	48 (41)	0.039
AC	65 (54.6)	50 (42.7)	
CC	8 (6.7)	19 (16.2)	
A alleli	157 (66)	146 (62.4)	0.418
C alleli	81 (34)	88 (37.6)	

N: birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

Axin1 rs214250 gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde, genotip dağılımı ve allel frekansları açısından kontrol grubu ve kolorektal kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Galektin-3 rs4644 gen polimorfizmi sonuçlarına bakıldığında genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve kolorektal kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır. Kolorektal kanserli hastalarda CC genotip frekansı %52.1, CA genotipi %43.7, AA genotipinin frekansı %4.2 iken kontrol grubunda CC genotip frekansı %52.1, CA genotip frekansı %34.2, AA genotip frekansının %13.7 olduğu gözlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur. ($p=0.0260$) (Tablo 4.2). Galektin-3 rs4644 gen polimorfizminde kanserli hastalara ait allel frekansları değerlendirildiğinde C allel frekansının kolorektal kanserli hastalarda (%74) kontrol grubuna göre (%69.2) yüksek olduğu, A allel frekansının ise hasta grubunda (%26) kontrol grubuna (%30.8) göre düşük olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır. ($p> 0.05$) (Tablo 4.2).

Galektin-3 rs4652 gen polimorfizmi sonuçlarına bakıldığında genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve kolorektal kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır. Kolorektal kanserli hastalarda AA genotip frekansı %38.7, AC genotipi %54.6, CC genotipinin frekansı %6.7 iken kontrol grubunda AA genotip frekansı %41, AC genotip frekansı %42.7, CC genotip frekansının %16.2 olduğu gözlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur. ($p=0.0390$) (Tablo 4.2). Galektin-3 rs4652 gen polimorfizminde kanserli hastalara ait allel frekansları ayrı ayrı değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır. ($p> 0.05$) (Tablo 4.2).

Tablo 4-3: Hasta grubunda Axin 1, Galektin-3 4644, Galektin-3 4652 Genotiplerinin Klinik ve Patolojik Parametrelere Göre Dağılımı

	Galektin3 rs:4644			Galektin3 rs:4652			Axin1		
	CC n(%)	CA n(%)	AA n(%)	AA n(%)	AC n(%)	CC n(%)	CC n(%)	CT n(%)	TT n(%)
Cinsiyet									
Kadın	21(50)	20(47.6)	1(2.4)	15(35.7)	27(64.3)	0(0)	23(54.8)	15(35.7)	4(9.5)
Erkek	41(53.2)	32(41.6)	4(5.2)	31(40.3)	38(49.4)	8(10.6)	51(66.2)	18(23.4)	8(10.4)
T evre									
T3+T4	32(47.1)	34(50)	2(2.9)	25(36.8)	38(55.9)	5(7.4)	46(67.6)	17(25)	5(7.4)
T1+T2	10(52.6)	7(36.8)	2(10.5)	7(36.8)	10(52.6)	2(10.5)	9(42.4)	5(26.3)	5(26.3)
Lenf Nod Tutulumu									
N1+N2+N3	23(52.3)	18(40.9)	3(6.8)	18(40.9)	22(50)	4(9.1)	27(61.4)	11(25)	6(13.6)
N0	19(44.2)	23(53.5)	1(2.3)	14(32.6)	26(3.7)	3(7)	28(65.1)	11(25.6)	4(9.3)
Uzak Metastaz									
Var	10(55.6)	7(38.9)	1(5.6)	7(38.9)	10(55.6)	1(5.6)	9(50)	6(33.3)	3(16.7)
Yok	32(45.7)	35(50)	3(4.3)	25(35.7)	39(55.7)	6(8.6)	47(67.1)	16(22.9)	7(10)
Anjiyolenfatik İnvazyon									
Pozitif	15(55.6)	11(40.7)	1(3.7)	9(33.3)	16(59.3)	2(7.4)	14(51.9)	8(29.6)	5(18.5)
Negatif	25(43.9)	29(50.9)	3(5.3)	21(36.8)	31(54.4)	5(8.8)	38(66.7)	14(24.6)	5(8.8)
Perinöral İnvazyon									
Pozitif	11(37.9)	17(58.6)	1(3.4)	8(27.6)	20(69)	1(3.4)	19(65.5)	8(27.6)	2(6.9)
Negatif	30(52.6)	24(42.1)	3(5.3)	23(40.4)	28(49.1)	6(10.5)	35(61.4)	14(24.6)	8(14)
Diferansiyasyon									
Az	6(66.7)	3(33.3)	0(0)	5(55.6)	4(44.4)	0(0)	4(44.4)	4(44.4)	1(11.1)
Orta-İyi	17(45.9)	17(45.9)	3(8.1)	13(35.1)	17(45.9)	7(18.9)	23(62.2)	9(24.3)	5(13.5)
Müsinöz Komponent									
Müsinöz Ca	7(87.5)*	1(12.5)	0(0)	4(50)	3(37.5)	1(12.5)	5(62.5)	2(25)	1(12.5)
Değil	35(44.3)	40(50.6)	4(5.1)	28(35.4)	45(57)	6(7.6)	50(63.3)	20(25.3)	9(11.4)

N:birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

Galaktin-3 rs4644 için hasta grubunda müsinoz komponent taşıyan CC genotipli hastaların frekansı %87.5, müsinoz olmayanların ise %44.3 olarak saptanmış olup fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p=0.026, OR: 1.975(1.387-2.831)) Ancak cinsiyet, tümör evresi, lenf nod metastaz pozitifliği, uzak metastaz varlığı, anjiyolenfatik invazyon ve perinoral invazyon parametreleri ile Galektin-3 4644 genotip dağılımları arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır (Tablo 4.3).

İncelenen hastaların klinik ve patolojik parametreleriyle Axin1 ve galaktin-3 rs4652 genotip dağılımları değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlılık olmadığı görülmüştür (Tablo 4.3).

Axin1 polimorfizmi için ise ileri tumor evresinde (T3+T4) tumor büyüklüğü açısından C alleli taşımak (%92.6) erken evrede olanlara göre (%73.7) daha yüksek saptanmış olup fark istatistiksel olarak anlamlıdır. (p=0.022, OR: 1.257 (0.953-1.659))

Axin 1, Galektin-3 4644, Galektin-3 4652 kombine genotip analiz sonuçları

İkili kombine genotip analizleri sonucunda, gal-3 rs4644 ve rs4652 birlikteliği için, kontrol grubunda en yüksek frekansta gözlenen genotip CCAA (%40,2) iken, hasta grubunda en yüksek frekansta saptanan genotip ise CAAC (%35,3) dir. Gal-3 rs4644 ve Axin1 rs214250 kombinasyonu için, kontrol grubunda en yüksek frekansta olan genotip CCCC (%35.9) iken, hasta grubunda en yüksek frekansta olan genotip CACC (%31,9) ve gal-3 rs4652 ve Axin1 rs214250 genotip birlikteliğinde hasta grubunda en yüksek frekansta olan genotip ACCC (%37) iken kontrolde AACC (%30,8) olarak bulunmuştur. Hasta grubunda AACC kombine genotipi (%3.4) kontrol kontrol grubuna göre(%13.7) daha düşük frekansta saptanmış olup aradaki fark istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur. (OR: 0,246; %95CI: 0,085-0,713) (p=0.004). Hasta grubunda ise, gal-3 rs4644 ve Axin1 rs214250 kombinasyonu bir arada incelendiğinde, hasta grubunda CCCT kombinasyonunun (%18,5) kontrol grubuna göre (%9,4) daha yüksek olduğu saptanmış olup, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (OR: 1,966; %95CI: 0,999-3,871) (p=0,044)

Üçlü genotip analizi sonuçlarına bakıldığında, CCAACC kombine genotipi kontrol (%20,2) ve hasta grubunun (%29,1) her ikisinde yüksek frekansta gözlenmiştir ve arada istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

Ancak, hasta grubundaki CCAACT kombine genotipinin (%12,6), kontrol grubuna oranla (%4,3) yüksek frekansta gözleendiği ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür(OR: 2,95; %95CI: 1,108- 7,855) (p=0,022).

Galaktin-3 serum Düzeyi Sonuçları

Kolorektal kanserli hastalarda serum Galaktin düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hastalarda Galaktin-3 serum düzeyleri (5.9 ± 0.69 ng/ml) kontrol grubuna göre (0.79 ± 0.01 ng/ml) daha yüksek oranda tespit edilmiş olup istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlılık bulunmuştur.($p < 0.001$) (Tablo 4.4).

Tablo 4-4: Kolorektal Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda Galektin3 Genotipleri ve Serum Galektin düzeyleri (ng/ml)

Gal3 Genotip	Hasta Grubu (N)	Ortalama Değer Standart Hata ($X \pm SE$)	Kontrol Grubu (N)	Ortalama Değer Standart Hata ($X \pm SE$)	P değeri
rs 4644					
CC	25	4.82 ± 0.78	34	0.78 ± 0.01	$p < 0.001$
CA	28	7.09 ± 1.13	21	0.81 ± 0.01	$p < 0.001$
AA	3	4.25 ± 3.32	8	0.77 ± 0.03	$p = 0.024$
rs 4652					
AA	19	5.19 ± 0.95	25	0.778 ± 0.011	$p < 0.001$
AC	31	6.72 ± 1.04	28	0.80 ± 0.011	$p < 0.001$
CC	6	4.12 ± 1.94	10	0.77 ± 0.02	$p < 0.001$

Tablodaki değerler $X \pm SE$ (Standard Hata) olarak verilmiştir.

Çalışma gruplarının kendi içlerinde serum galektin düzeylerinin genotiplere göre karşılaştırılması Kruskal-Wallis Testi analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma grupları arasında serum galektin düzeyi karşılaştırılması Mann-Whitney U analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Hasta ve kontrol grupları kendi içlerinde Axin 1, Galektin-3 4644 ve Galektin-3 4652 genotip dağılımları ve serum Galektin düzeyleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir. Hasta ve kontrol gruplarında, ortalama serum Gal3 düzeylerinin gerek Gal 4644, gerekse 4652 genotiplerine göre dağılımı incelendiğinde, her iki genotip açısından istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır (Tablo 4.4)

Tablo 4.5.: Hasta grubunun klinik ve patolojik verilerine göre Gal-3rs4644, rs4652 ve Axin 214250 genotip dağılımı ile galaktin-3 serum düzeyleri arasındaki ilişki

	Galektin3 rs:4644			Galektin3 rs:4652			Axin1		
	CC Ort±SD (n)	CA Ort±SD (n)	AA Ort±SD (n)	AA Ort±SD (n)	AC Ort±SD (n)	CC Ort±SD (n)	CC Ort±SD (n)	CT Ort±SD (n)	TT Ort±SD (n)
T evre									
T3+T4	5,34±1,02 (17)	4,96±1,15 (18)	1±-- (1)	5,46±1,16 (14)	5,1±1,14 (18)	3,24±2,10 (4)	4,49±0,74 (25)	7,94±2,19 (8)	1,76±0,56 (3)
T1+T2	2,95±0,71 (4)	10,0±1,53 (4)	0,85±- (1)	3,14±1,69 (2)	7,6±1,81 (6)	0,85±-- (1)	5,79±1,95 (7)	4,83±-- (1)	7,41±-- (1)
Lenf Nod Tutulumu									
N1+N2+N3	5,13±1,32 (12)	5,20±1,55 (11)	1±-- (1)	5,67±1,52 (10)	5,07±1,42 (12)	1,15±0,15 (2)	4,5±1,03 (16)	8,49±2,79 (5)	1,76±0,56 (3)
N0	4,56±1,03 (9)	6,56±1,49 (11)	0,85±- (1)	4,33±1,22 (6)	6,38±1,36 (12)	3,84±2,86 (3)	5,05±1,00 (16)	6,48±3,06 (4)	7,41±-- (1)
Uzak Metastaz									
Var	5,86±2,58 (6)	5,14±3,46 (4)	---	7,56±3,67 (4)	4,24±2,28 (6)	---	3,69±1,88 (6)	10,8±7,58 (3)	1,11±-- (1)
Yok	4,50±0,69 (15)	6,14±1,05 (19)	0,92±0,1 (2)	4,37±0,72 (12)	6,13±1,01 (19)	2,77±1,70 (5)	5,14±0,75 (27)	5,9±4,8 (6)	3,68±1,83 (3)
Anjiyolenfatik İnvazyon									
Pozitif	3,05±0,51 (7)	3,26±0,89 (7)	---	3,29±0,56 (5)	3,31±0,79 (8)	1,30±-- (1)	3,35±0,71 (8)	4,05±0,99 (3)	1,76±0,56 (3)
Negatif	5,68±1,34 (12)	7,10±1,41 (15)	0,92±0,075 (2)	5,88±1,68 (9)	6,94±1,32 (16)	3,13±2,14 (4)	5,13±0,96 (22)	9,37±2,68 (6)	7,41±-- (1)
Perinöral İnvazyon									
Pozitif	4,07±1,24 (5)	6,20±1,79 (9)	---	5,16±1,75 (3)	5,52±5,53 (11)	---	5,18±1,29 (10)	7,75±3,95 (3)	1,11±- (1)
Negatif	5,27±1,34 (15)	5,66±1,36 (13)	0,92±0,075 (2)	5,33±1,34 (12)	5,9±1,30 (13)	2,77±1,70 (5)	4,66±0,91 (21)	7,52±2,48 (6)	3,86±1,83 (3)
Diferansiyasyon									
Az(kötü)	5,33±2,59 (3)	8,22±7,32 (2)	---	7,44±2,61 (2)	5,85±4,84 (3)	---	5,48±4,58 (2)	10,2±5,36 (2)	1,11±-- (1)
Orta-İyi	5,37±1,43 (11)	6,87±1,59 (11)	0,92±0,075 (2)	5,24±1,67 (9)	7,56±1,60 (10)	2,77±1,70 (5)	5,36±1,06 (18)	8,99±3,59 (4)	2,08±0,78 (2)
Müsinöz Komponent									
Müsinöz Ca	1,73±0,69 (2)	1,12±- (1)	---	1,04±- (1)	2,40±-- (1)	1,12±-- (1)	1,53±0,45 (3)	---	---

Değil	5,22±0,91 (19)	6,11±1,09 (21)	0,92±0,075 (2)	5,44±1,07 (15)	5,87±1,00 (23)	3,18±2,12 (4)	5,11±0,75 (29)	7,59±1,96 (9)	3,17±1,47 (4)
--------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	------------------	-------------------	------------------	------------------

Hasta grubunu klinik ve patolojik verileri ile axin ve galektin genotiplerinin serum galektin-3 düzeyleri ile karşılaştırılmasında, Gal-3 genotipleri ve gal-3 serum düzeyleri arasında herhangi bir anlamlılık bulunmadı.

Son olarak, hasta grubunun klinik ve patolojik verileri ile Gal3 serum düzeyleri karşılaştırıldığında, cinsiyet, tümör evresi, lenf nodu tutulumu, uzak metastaz, anjiolenfatik invazyon, perinöral invazyon ve diferansiyasyon açısından herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Ancak, müsinoz komponent varlığı olan hastalarda Gal-3 serum düzeyinin, olmayanlara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

İnsan tümörogenezi, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların birikimi ile ilişkili olarak ortaya çıkmaktadır (173). Kolorektal kanser patogenezi, iyi huylu polip olarak başlayan ve ardından adenom ve karsinomaya doğru ilerleyen çok aşamalı bir süreçtir (174). Genetik polimorfizm çalışmaları, kanser riski ya da progresyonu ile ilişkili ve aynı zamanda anti-kanser ilaçların toksitesini ve tedavideki etkinliği gibi pek çok önemli konuda hastalığın teşhis ve tedavi sürecinde öncülük edebilecek aydınlatıcı bilgiler sunmaktadır (175). Son 10 yıldaki araştırmalar, KKR gelişimi ve tümörogenezinde genetik ve epigenetik değişiklikler üzerine odaklanmıştır. KKR tümörogenezinde Wnt sinyal yolağı anahtar bir role sahiptir ve kanser progresyonunda yer almaktadır. Wnt sinyal yolağının anormal aktivasyonu hem embriyogenezde hem de tümör oluşumunda çeşitli farklılaşma olaylarını içermektedir (176). Moleküler çalışmalar, Wnt sinyal yolağının insan kolorektal kanserlerinde %90'dan fazla oranda deregüle olduğunu göstermiştir(177-179). Bu yolağın deregülasyonu APC, CTNNB1, AXIN1 ya da AXIN2 genlerdeki genetik değişikliklerle sonuçlanabilmektedir (180-185).

β -katenin, APC, Axin1 ve TCF4 genlerinin mutasyon analiz sonuçlarında, KKR'ların büyük çoğunluğunda MSI ile birlikte Wnt sinyal yolağı değişikliklerinin olduğu belirtilmiştir (186). Axin GSK-3 β , β -katenin, APC, plakoglobin ve Dvl ile kompleks oluşturarak β -katenin'in GSK-3 β bağımlı fosforilasyonunu teşvik eder (84,113,116,186-189). Fosforile β -katenin, ubiquitin-proteozom mekanizması tarafından degrade edilir ve β -katenin sitoplazmada normal hücrelerden az olacak şekilde düzenlenir (90,186,190). APC fonksiyonuna ek olarak Axin fonksiyon kaybının da, Wnt sinyal yolağında işlev bozukluğuna yol açarak, sitoplazma ve nükleusta β -katenin birikimine neden olduğu ve böylece karsinogenezi etkilediği düşünülmektedir (186).

Axin; APC, β -katenin ve GSK-3 β 'nin bir arada bulunduğu β -katenin sinyal regülasyonunu koordine etmek üzere bir iskele protein görevi görür. Matthew J. ve ark. Axin'nin β -katenin'nin regülasyonu ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (87). Axin kanser hücrelerinde overeksprese olduğunda, β -katenin ve GSK-3 β gibi Wnt-1 sinyal komponentlerini bağlar ve β -katenin'i downregüle eder. Burada, GSK-3 β tarafından APC'nin in vitro fosforilasyonunun hAxin (human Axin) proteininin katılımı ile gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Aynı bir çalışmada, GSK-3 β 'nin β -katenin'in turnoverı için kritik olduğu bilinen serin ve treonin kalıntılarını fosforile ettiği ve Axin'in bu fosforilasyonu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (87,88,113). Ikeda ve ark. tarafından elde edilen bu bulgular Matthew ve ark.'larının verilerini desteklemektedir. Bu nedenle, Axin'nin GSK-3 β ve APC bağlantısı için kayıp halkayı sağlayan molekül olduğu düşünülmektedir (87).

Axin'nin β -katenin protein seviyesini downregüle etme özelliği olduğu gibi, tümör baskılayıcı etkisi de görülebilmektedir (7,191). Satoh ve ark. genetik değişiklikler sonucu Axin1 inaktivasyonunun hepatoselüler karsinomların sık rastalanan bir özelliği olduğunu rapor etmiştir (185). Ayrıca, wild type Axin1'in adenovirus aracılı transferinin, sadece Axin-yoksun hücrelerde değil aynı zamanda β -katenin mutasyonu olan ya da APC-yoksun hücrelerde de hücre büyümesinin baskılayıp apoptozu indüklediği gösterilmiştir (180,185).

Axin1 mutasyonları, kolon kanser hücre hattı (123), hepatoselüler karsinoma(HCC) (185, 192), yumurtalık endometriyum adenokarsinoma (124) ve sporadik medulablastomalarda (193) rapor edilmiştir(194). Kolorektal kanserde Axin1 mutasyonlarının çoğu APC, GSK-3 β ve β -katenin bağlayıcı domenleri bulunduran exon 1 ve 5 arasında meydana gelmektedir (7,105).

Shimizu ve ark., Axin1 genini analiz ederek belirledikleri 8 mutasyondan 6 tanesinin Axin'in fonksiyonel domenlerinde (RGS ve GSK-3 β bağlayıcı domain) yer aldığını bildirmiştir (186). Axin'nin RGS domeni, APC'nin 20 aa tekrarları ile doğrudan etkileşimdedir (111,116). β -katenin regülasyonunda Axin-APC etkileşiminin işlevi tam olarak anlaşılmasına rağmen, Axin-APC etkileşiminin APC'nin GSK-3 β bağımlı fosforilasyonunu teşvik ettiği raporlanmıştır (87, 187) ve APC'nin fosforile formunun fosforile olmamış formuna göre daha fazla β -katenin degradasyonuna yol açtığı ileri sürülmüştür (86).

Dahası, APC'nin sporadik KRK'ların çoğunda gözlenen ve C-terminal bölgesinin yarısının eksik olduğu kısaltılmış varyantının, β -katenin bağlanma aktivitelerini korumalarına karşın Axin ile etkileşime giremedikleri gösterilmiştir (116). Bu nedenle, Axin-APC etkileşiminin, APC'nin fosforilasyon durumunu düzenleyerek B-katenin degradasyon sürecinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. (186).

George W ve ark., prostat kanseri hücre hatlarında yaptıkları bir çalışmada, Axin1 rs214250 mutasyonunun P69SV40T, M12, M2182 ve M2205 hücre hatlarında bulunduğunu bildirmişlerdir (195). Ayrıca ülkemizde Akut Lösemi hataları ile yapılan bir çalışmada, incelenen örnek ve hücre hatlarında sıklıkla Axin1 mutasyonlarına rastlandığı belirtilmiştir. Rs241250 mutasyonu, çalışılan örneklerin %1'i ile KG1 ve MV4:11 hücre hatlarında saptanmıştır (196).

Axin1 insan kanserlerinin tedavisinde gen-terapisi yaklaşımı için iyi bir aday olduğundan, Axin tarafından regüle edilen genlerin belirlenmesi ve tanımlanması karsinogenetik sürecin daha iyi anlaşılmasını ve yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasını sağlayabilir (180).

Şimdiye kadar, Axin1 rs214250 varyasyonu ile ilgili yapılmış olan mevcut çalışmalar, daha çok farklı kanser tiplerinde ve hücre hatlarında mutasyon saptamaya yönelik çalışmalar arasında yer almıştır. Bizim çalışmamızda, bu mutasyonun hastalık riski ya da klinik-patolojik veriler ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Yaptığımız analize göre, Axin1 rs214250 varyantlarının KRK hastaları ve sağlıklı kontroller arasındaki dağılımında anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Hastalar kendi içlerinde klinik ve patolojik verilerine göre kıyaslandığı zaman, ileri tümör evresine (T3+T4) sahip hastalarda, C alleli taşımanın erken evrede olan hastalara göre daha yaygın olduğu belirlenmiş ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Gal-3, çeşitli biyolojik fonksiyonlarla ilişkili multifonksiyonel karbonhidrat bağlayıcı bir proteindir ve son zamanlarda β -katenin ile ilişkisi rapor edilmiştir (166). Hücre büyümesi, mRNA kırılması, hücre döngüsü ve apoptoz direnci gibi birçok biyolojik fonksiyon Galaktin-3 tarafından düzenlenir. Ayrıca hücre farklılaşması, transformasyon, anjiyojenez, immün yanıt ve apoptoz üzerindeki etkisi nedeniyle çeşitli kanser türlerinin ilerleme ve metastazı ile ilişkilendirilmektedir.

Salgılanan Galaktin-3, laminin, fibronektin ve kollajen IV gibi glikokonjugatlar hücre yüzeyine bağlanarak hücre yapışması ve sinyalizasyonu, immün yanıt, anjiyogenez ve kanser gelişimini modüle eder (197,198)

Galektin-3, meme kanseri ve kolorektal kanser başta olmak üzere, prostat kanseri, mide kanseri, tiroid, pankreas ve akciğer kanseri de dahil olmak üzere, çeşitli insan kanser tiplerinde, progresyon ve metastaz ile ilişkilendirilmektedir (199-205). Gal-3'ün kanser için diğer önemli bir rolü ise apoptozu regüle edebilme yeteneğidir. Gal-3'ün Staurosporin, sisplatin, genistatin ve anoikis tarafından indüklenen apoptozdan epitelyal hücrelerini koruduğu bildirilmiştir. Diğer bir deyişle, Galektin bir anti-apoptotik bir faktör olarak çalışır (206-209).

Gal-3'ün iki varyantının (rs4644 ve rs4652) Gal-3 protein düzeylerini etkilediği belirlenmiştir(210). Rs4644 (galektin-3 +191 A>C) , galektin3'ün 64.pozisyonundaki prolin amino asidinin histidin amino asidi ile yer değiştirmesine neden olur (Gal-3 64 His64Pro). rs4652 (galektin-3 +292 A>C) ise 98.pozisyonundaki treonin kalıntısının prolin kalıntısına (Thr98Pro) dönüşmesine yol açar (198). Chen ve ark. Glioma hastaları ile yaptıkları bir çalışmada, gal-3 +292A>C (rs4652) nin A allel frakansı ve A/A genotipi taşımanın glioma hastalarında kontrollere göre önemli düzeyde yaygın olduğunu ve AA genotipi varlığının ileri tümör evresiyle ilişkili olduğunu rapor etmiştir (199).

Bizim çalışmamızda ise, gal-3 4652 genotipi incelendiğinde, hasta ve kontroller arasından allel dağılımı açısından anlamlı bir fark bulunamamakla beraber, genotip dağılımlarına göre incelendiğinde, kontrollerde CC genotip frekansının daha yüksek olduğu gözlenmiş ve fark istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. (P= 0.039)

Meme kanserinde yapılan bir çalışmada, galektin-3 ün 191inci pozisyonundaki (rs4644) germline mutasyonu (Pro64His), matriks metalloproteinaz parçalanmasına duyarlılık ve ilaca-bağlı apoptoza direnç ile sonuçlandığı bildirilmiştir (197). Gal-3 tarafından kontrol edilen anjiogenez ve tümör büyümesi gibi fonksiyonlar, MMP yıkımına dayanıklı Gal-3 p64 varyantını taşıyan BT-549 hücrelerinde inhibe olduğu gösterilmiştir (197,211).

Ayrıca meme karsinoma hücrelerinde Gal-3 aşırı ekspresyonunun hücreleri kemoterapötik ilaçlara karşı dirençli hale getirdiği (212,139), ancak Akt'yi inaktive ederek ve hücreleri TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) aracılıklı apoptoza duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (213,162,214).

Salgılanmış galektin-3 H64 varyantı küçük damarların endotel hücrelerine bağlanır ve hücre göçü, morfogenezi ve anjiyogenezi tetikler. MMP'ler tarafından parçalanmış gal-3 H64 varyantının, endotel hücre yüzeyine, karbonhidrat-bağımlı olarak, tam uzunluktaki gal-3'e göre yaklaşık 20 kat daha yüksek afinite ile bağlandığı; aynı zamanda MMP parçalanmasına dayanıklı gal-3 P64 varyantı, Gal-3 H64 fonksiyonlarına benzerlik göstermediği belirtilmiştir (197). In vivo koşullarda bölünmüş gal-3'ün meme kanseri gelişimindeki MMP'lerin aktivitesi için marker olduğu bulunmuştur (197,211). Ayrıca meme kanserli hastalarda Gal-3 serum düzeylerinin, sağlıklı kontrollere göre yüksek olması Gal-3'ün meme kanseri ilerleyişinde etkili olduğunu düşündürmektedir (165,197).

Meyer ve ark. Prostat kanserinde yaptıkları bir çalışmada, gal-3 rs4644'ün His64 varyantını kodlayan minör allelinin koruyucu etkisinin olduğunu tespit etmişler (OR 0.82, 95% CI 0.69;0.99, P = 0.04) ve sonuçların dominant modele uygun olduğunu ve tek bir histidin allelinin varlığının koruyucu etki oluşturmak için yeterli olduğunu belirtmişlerdir (p = 0.01) (215).

Bizim çalışmamızda da gal-3 rs4644 AA genotip frekansının kontrollerde, KRK hastalarına göre daha yüksek olduğu ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. (P=0.026) Bu sonuçlar Meyer ve ark. larının bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Anormal gal-3 ekspresyonu birçok kanser tipinde bulunmuştur (216,217,127). Kolorektal karsinomalarda gal-3 ekspresyonun yaygın şekilde incelenmiştir ancak çelişkili sonuçlar mevcuttur. Çeşitli çalışmalarda kolorektal kanserde artmış gal-3 ifadesi gözlenmiştir ve hastalığın progresyonu ve metastazla ilişkili olduğu önerilmiştir (155,157,218). Aksine, kolorektal kanserli ve buna karşılık gelen normal doku incelendiğinde azalmış gal-3 ekspresyonu da rapor edilmiştir (219,158). Son zamanlarda gal-3, β -katenin bağlayıcı yeni partner olarak tanımlanmıştır (149), bu nedenle Wnt sinyal yolağı ile bağlantılıdır (166).

Shi ve ark. gal-3 tüm kolorektal hücre hatlarında, normal kolon dokusu ile karşılaştırıldığında metastatik kolorektal kanserli doku numuneleri içinde aşırı eksprese edildiği ve Wnt-2 ya da gal-3 ekspresyonunun susturulmasının TCF-reporter aktiviteyi inhibe ettiğini ve sitozolik β -katenin düzeyinin azaldığını ve downstream mutasyonlar içeren insan kolorektal kanser hücrelerinde apoptozun indüklendiğini bulmuşlardır (166).

Klinik olarak, kolorektal müsinöz karsinomalar tipik müsinöz adenokarsinomlardan daha kötü prognoza sahiptir (220,221). MUC 2 musin, gastrointestinal sistemden salgılanan, yüksek molekül ağırlıklı, karbonhidrat açısından zengin bir glikoproteindir (222). Ayrıca kolorektal kanserin ilerleme ve metastazında önemli bir modülatör olduğu ve gal-3 için önemli bir ligand olabileceği (223) düşünülmektedir. Kolon kanser hücrelerinde yüksek gal-3 düzeyi yüksek MUC2 musin ile birlikte ve düşük gal-3 düzeyi düşük MUC2 musin ile rapor edilmiştir (159,224,225). Endo ve ark, 8 müsinöz karsinom arasından 7 (% 87.5)'sinde pozitif gal-3 ifadesi olduğunu ve bunun Galektin-3'ün MUC 2 musin ile etkileşim yoluyla malign davranışı modüle ettiğinin bir göstergesi olduğunu belirtmiştir (205).

Bizim çalışmamızda ise yüksek Galektin 3 düzeyi müsinöz komponent varlığı olan hasta bireylerde gözlenememiştir. Bu ilgi çekici sonuç, hasta grubumuz içerisinde müsinöz komponent varlığı olan hasta sayısının, olmayanlara göre düşük olduğundan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Lurisci ve ark gal-3 serum düzeyinin sağlıklı bireylerde kanserli hastalara göre düşük olduğunu tespit etmişlerdir. (ortalama, 62 ng/ml; aralık, 20–313 ng/ml;). Meme, mide-bağırsak, akciğer, yumurtalık kanseri, melanoma, non-Hodgkin lenfoması hastalarında gal-3 serum seviyelerinde belirgin artış tespit edilmiştir (P = 0.014). Ayrıca, metastatik hastalığı olan hastalardan alınan serum gal-3 konsantrasyonları lokalize tümörü olan hastalarından daha yüksek bulunmuştur. Maksimum gal-3 serum konsantrasyonları (ortalama, 320 ng / ml; aralığı, 20-950 ng / ml) metastatik gastrointestinal kanserli hastalarda tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, dolaşımdaki gal-3'ün tümör ilerlemesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (165).

Biz de çalışmamızda, Lurisci ve ark.'larının bulgularına paralel olarak hasta ve kontrollerde gal-3 serum düzeylerini karşılaştırdığımızda, kolorektal kanserli hastalarda (5.9 ± 0.69 ng/ml) gal-3 serum düzeylerinin, kontrol grubuna göre (0.79 ± 0.01) daha yüksek olduğunu ve farkın ileri düzeyde anlamlılık gösterdiğini tespit ettik. ($p<0.001$). Ayrıca hasta ve kontrol grubunun gal-3 serum düzeyleri ve gal-3 genotipleri karşılaştırıldığında, hem rs4644 hem de rs4652 polimorfizimleri için anlamlı fark olduğu belirlidik. rs4644 ve rs4652 için sırasıyla; CC($p<0.001$), CA($p<0.01$), AA($p=0.024$); AA($p<0.001$), AC($p<0.001$), CC($p<0.001$). Ancak farklı olarak, hasta grubunun klinik ve patolojik verileri ile Gal-3 serum düzeyleri arasında herhangi bir anlamlılığa rastlanamamıştır.

Gal-3, çeşitli neoplastik hücrelerde artan seviyede bulunmuştur ve çeşitli deneysel gözlemler, bu molekülün in vivo tümör metastazına dahil olduğunu düşündürmektedir (226,227). Gal-3'ün metastatik sürece nasıl dahil olduğunu açıklamak için çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür: (a) gal-3 ün hücre dışı matriks proteinleri (laminin, fibronektin, vitronektin gibi) (228,229) ve lizozom ilişkili membran proteinleri gibi hücre yüzey proteinleri ile etkileşim potansiyeli, gal-3 ekstraselüler matriks ya da diğer hücrelerin, hücre bağlantısında bir köprü görevi üstlenebileceğini göstermektedir. b) Gal3'ün tamamlayıcı glikoproteinler aracılığı ile homotipik hücre-hücre adezyonunu yönetebilme yeteneği (230, 231) , bu lektinin tümör emboli oluşumu ve dolaşımında tümör hücrelerinin yayılımında etkili olduğu teorisini desteklemektedir. (c) Yakın zamanda yapılan gözlemler, gal-3'ün hücre-hücre sıkı bağlantıların kaybı ile indüklenen apoptoza karşı koruyuculuk özelliği göstererek (229, 232) gal-3 ekspresyonunun tümör hücrelerinde dolaşımla yayılan hücrelerin hayatta kalımı konusunda kritik bir belirleyici rolü üstlenebileceğini önermektedir(165).

İkili kombine genotip analizleri sonucuna göre gal3 rs4652-Axin1 kombine genotipi AACC, hasta grubunda (%3.4), kontrol grubuna göre (%13.7) daha düşük olarak belirlenmiş ve fark istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur. (OR: 0,246; %95CI: 0,085-0,713) (p=0.004). Gal-3 rs4644 ve Axin1 rs214250 kombinasyonu bir arada incelendiğinde, hasta grubunda CCCT kombinasyonunun (%18,5) kontrol grubuna göre (%9,4) daha yüksek olduğu saptanmış olup, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (OR: 1,966; %95CI: 0,999-3,871) (p=0,044). Üçlü genotip analizi sonuçlarına bakıldığında, hasta grubundaki CCAACT kombine genotipinin (%12,6), kontrol grubuna oranla (%4,3) yüksek frekansta gözleendiği ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür(OR: 2,95; %95CI: 1,108- 7,855) (p=0,022).

Sonuç olarak;

1. Axin1 rs214250, genotip dağılımı ve allel frekansları açısından kontrol grubu ve kolorektal kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır(p>0.05).
2. Galektin-3 rs4644 genotip dağılımı; hastalarda CC genotip frekansı %52.1, CA genotipi %43.7, AA genotipinin frekansı %4.2 iken kontrol grubunda CC genotip frekansı %52.1, CA genotip frekansı %34.2, AA genotip frekansının %13.7 olduğu gözlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur. (p=0.0260).
3. Galektin-3 rs4644 gen polimorfizminde C allel frekansının kolorektal kanserli hastalarda (%74) kontrol grubuna göre (%69.2) yüksek olduğu, A allel frekansının ise hasta grubunda (%26) kontrol grubuna (%30.8) göre düşük olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır. (p> 0.05)
4. Galektin-3 rs4652 Kolorektal kanserli hastalarda AA genotip frekansı %38.7, AC genotipi %54.6, CC genotipinin frekansı %6.7 iken kontrol grubunda AA genotip frekansı %41, AC genotip frekansı %42.7, CC genotip frekansının %16.2 olduğu gözlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur. (p=0.0390) .

5. Galaktin-3 rs4644 için hasta grubunda müsinoz komponent taşıyan CC genotipli hastaların frekansı %87.5, müsinoz olmayanların ise %44.3 olarak saptanmış olup fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p=0.026, OR: 1.975(1.387-2.831))
6. Axin1 polimorfizmi için ise ileri tumor evresinde (T3+T4) tumor büyüklüğü açısından C alleli taşımak (%92.6) erken evrede olanlara göre (%73.7) daha yüksek saptanmış olup fark istatistiksel olarak anlamlıdır. (p=0.022, OR: 1.257 (0.953-1.659))
7. Gal-3 4652-Axin1 İkili kombine genotip analiz sonucunda hasta grubunda AACC kombine genotipi (%3.4) kontrol kontrol grubuna göre(%13.7) daha düşük frekansta saptanmış olup aradaki fark istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur. (OR: 0,246; %95CI: 0,085-0,713) (p=0.004).
8. Gal-3 rs4644-Axin1 kombine genotip analiz sonucunda hasta grubunda CCCT kombinasyonunun (%18,5) kontrol grubuna göre (%9,4) daha yüksek olduğu saptanmış olup, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (OR: 1,966; %95CI: 0,999-3,871) (p=0,044)
9. Üçlü genotip analizi sonucunda, hasta grubundaki CCAACT kombine genotipinin (%12,6), kontrol grubuna oranla (%4,3) yüksek frekansta gözlemlendiği ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür(OR: 2,95; %95CI: 1,108- 7,855) (p=0,022).
10. Hastalarda serum Galektin-3 düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hastalarda gal-3 serum düzeyleri (5.9± 0.69ng/ml) kontrol grubuna göre (0.79±0.01ng/ml) daha yüksek oranda tespit edilmiş olup istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlılık bulunmuştur.(p<0.001).

Çalışmamız, Gal-3 4644, Gal3 4652 ve Axin1 varyantlarının ve bu varyantların serum gal-3 seviyeleri üzerine etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır. Daha önce Axin1 varyantları ile yapılan çalışmalar daha çok mutasyon analizi çalışmalarına dayanmakta idi. Bizim çalışmamızda, Axin1 geni varyantlarının allel spesifik PZR yöntemi ile belirlenmiş olması açısından literatüre katkı sağlamaktadır. Ayrıca çalışmamız, Axin1 polimorfizminin yüksek sayılı hasta-kontrol grubunda çalışıldığı ve Türk popülasyonda genotip frekans verilerinin ortaya koyulduğu ilk çalışmadır.

Ayrıca çalışmamız, kolorektal kanserde gal-3 varyantları ve Galektin serum düzeyleri arasındaki bağlantının gösterildiği ender çalışmalardan biridir.

Çalışmamızdan aldığımız sonuçlara göre, Wnt yolağı bileşenlerinden olan Axin1 ve Gal-3 varyantlarının, serum Gal-3 seviyeleri ve kolorektal kanser oluşum ve ilerlemesinde potansiyel rolü olabileceği düşüncesini desteklemektedir. Ancak kesin bir kanıya varılabilmesi için daha geniş kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir. Sunduğumuz verilerin, gelecekte bu amaçla yapılacak araştırmalara ışık tutabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Dagfinn A., Doris S M., Lau R, Vieira R., Greenwood D.,Kampman E., Norat T. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose response meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2011;343:d6617
2. Bengi G., Akpınar H. Does glucagon like peptide-2 receptor expression have any effect on the development of human colorectal cancer? Departments of Gastroenterology and Pathology, Dokuz Eylül University Hospital, İzmir
3. Judith M. E., Walsh, Jonathan P. Terdiman. Colorectal Cancer Screening. *JAMA*. 2003;289:1288-1296.
4. Martinez M. E., Willett W. C. Calcium, Vitamin D and Colorectal Cancer: A Review of the Epidemiologic Evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:163-168.
5. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Elizabeth Ward E., Forman D., CA CANCER J Global Cancer Statistics. *CLIN* 2011;61:69–90
6. Aspirin And The Risk Of Colorectal Cancer In Women Giovannucci E., Egan, K., Hunter D., Stampfer M., Colditz G., Willett W. Speizer F. *N Engl J. med* 1995;333:609-14.
7. Nighat P. Khan, Arshad A. Pandith , Mahboob Ul Hussain , Adfar Yousuf , Mosin S. Khan, Khursheed A. Wani , Syed Mudassar Novelty of Axin 2 and lack of Axin 1 gene mutation in colorectal cancer: a study in Kashmiri population. *Mol Cell Biochem* (2011) 355:149–155
8. Li-Hua JIN, Qiu-Jie SHAO, Wen LUO, Zhi-Yun YE, Qing LI, Sheng-Cai LIN. Detection of point mutations of the axin1 gene in colorectal cancers. *Int. J. Cancer*: 107, 696–699 (2003)
9. Tatsuo Shimura, Yukinori Takenaka, Tomoharu Fukumori, et al., Implication of Galektin-3 in Wnt Signaling. *Cancer Res* 2005;65:3535-3537.
10. P Demetter, N Nagy, B Martin, A Mathieu, P Dumont, C Decaestecker, I Salmon. The galektin family and digestive disease. *J Pathol* 2008; 215: 1–12
11. Potter JD., Hunter D. Colorectal Cancer: Epidemiology. In: *Genetics of Colorectal Cancer*. Eds: Potter JD, Lindor NM, Springer, USA, 2009. p.5-25.

12. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2002; 55: 74–108.
13. Lynch HT, Smyrk TC et al. Genetics, natural history, tumor spectrum and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: An updated review. *Gastroenterology* 1993; 104: 1535.
14. Lynch HT et al. *Current Therapy in Colon and Rectal Surgery*. Fazio VW ed. Philadelphia: BC Decker Publishing Company; 1990.
15. Steward BW, Kleihues P. *Colorectal Cancer*. World Cancer Report. Lyon: IARC Press; 2003: 198–202.
16. K pelioglu AA. Kolorektal Kanserde Histopatoloji. *Kolorektal  zel Sayısı, T rkiyeKlinikleri, Journal of Surgery* 2004; 9: 25-7.
17. Doğusoy G, Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D. *Kolon Rektum ve Anal Bۆlge Hastalıkları*. İstanbul: Türk Kolon ve Rektum Cerrahi Derneği; 2003.
18. Josep J.(2012) General Aspects of Colorectal Cancer ISRN Oncology doi:10.5402/2012/139268
19. U. Guller, A. Zettl, M. Worni et al., “Molecular investigation of lymph nodes in colon cancer patients using one-step nucleic acid amplification (OSNA). A new road to better staging?”*Cancer*. In press.
20. <http://www.hopkinscoloncancercenter.org> (Son erişim tarihi 02/10/13)
21. Russo MW, Wei JT, Thiny MT, et al. Digestive and liver diseases statistics, 2004. *Gastroenterology* 2004; 126: 1448–53.
22. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004;54: 8–29.
23. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
24. Levin KE, Dozois RR.(1991).Epidemiology of large bowel cancer. *World J Surg*,15(5):562-7.
25. SiegelR. *Cancer Statistics*, 2012
26. İzmirli M. (2007) Cancer statistics of SSK Okmeydanı Training and Research Hospitals Department of Oncology from 1999 to 2004, *Türk Onkoloji Dergisi* 22(4):172-182
27. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>

28. Hagggar Fatima A. (2009). Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors Clin Colon Rectal Surg, 22(4),191-7.
29. Farin Amersi, M.D. (2005) Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Health Services Clinics In Colon And Rectal Surgery
30. Kemppainen M. (1993) Characteristics of colon cancer in elderly patients. Gerontology 39:222—227
31. World Cancer Research Found and American Institute for Cancer Research, Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective, Washington, DC,USA, 2007.
32. World Cancer Research Found and American Institute for Cancer Research, Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer. Continuous Update Project, Colorectal Cancer Report 2010, Summary, Washington, DC, USA, 2011.
33. T.Norat, S. Bingham, P. Ferrari et al., “Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition,” Journal of the National Cancer Institute, vol. 97, no. 12, pp. 906–916, 2005.
34. Chao,M. J.Thun, C. J. Connell et al., “Meat consumption and risk of colorectal cancer,” The Journal of the American Medical Association, vol. 293, pp. 172–182, 2005
35. Giovannucci E, Colditz GA, Stampfer MJ, et al. A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in U.S. women. J Natl Cancer Inst 1994;86:192–199
36. Slattery ML, Potter JD, Friedman GD, et al. Tobacco use and colon cancer. Int J Cancer 1997;70:259–264
37. Knekt P, Hakama M, Jarvinen R, et al. Smoking and the riskof colorectal cancer. Br J Cancer 1998;78:136–139
38. <http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-risk-factors>
39. Laken SJ.(1997)Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. Nat Genet;17:79-83
40. Rozen P. (1999) Prevalence of the I1307k APC gene variant in Israeli Jews of different ethnic origin and the risk of colorectal cancer. Gastroenterology 116:54-57

41. Gryfe R. (1999) Inherited colorectal polyposis and cancer risk of the APC I1307K polymorphism. *Am J Hum Genet.* 64:378-384
42. Woodage T.(1998) The APC I1307K allele and cancer risk in a community-based study of Ashkenazi Jews. *Nat Genet* 20:62-65
43. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research; 2007
44. Zisman AL. (2006) Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Arch Intern Med*;166(6): 629–634
45. Giovannucci E.(2001) An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer EpidemiolBiomarkPrev*; 10: 725-31
46. <http://www.cancer.org/Cancer/ColonandRectumCancer/OverviewGuide/colorectal-cancer-overview-what-causes> (Erişim tarihi: 26.09.13)
47. World Cancer Research Fund (WCRF) Panel (Potter JD, Chair). Diet, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. (1997) Washington (DC): WCRF/American Institute of Cancer Research.
48. Potter JD.(1993) Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev*;15:499-545.
49. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jun 2;91(11):916-32.
50. Bazensky I, Shoobridge-Moran C, Yoder LH. Colorectal cancer: an overview of the epidemiology, risk factors, symptoms, and screening guidelines. *MedsurgNurs* 2007;16(1):46-51
51. De Jong AE. (2005) Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2005;100(1):139-143
52. Lee KJ. (2007) Study Group. Physical activity and risk of colorectal cancer in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Cancer Causes Control*;18(2):199-209
53. Triantafyllidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of

- carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res.* 2009 Jul;29(7):2727-37.
54. Tsanou E. (2008) The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res.* Nov-Dec;28(6A):3815-26
 55. Desai TK, Barkel D. (2008) Syndromic colon cancer: lynch syndrome and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterol Clin North Am*; 37: 47-72
 56. Nystrom-Lahti M.(1994) Mismatch repair genes on chromosomes 2p and 3p account for a major share of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families evaluable by linkage. *Am J Hum Genet*; 55: 659-65.
 57. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:677–685
 58. Hahn M, Saeger HD, Schackert HK. Hereditary colorectal cancer: clinical consequences of predictive molecular testing. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14: 184-93
 59. J. Perea, M. Lomas and M. Hidalgo. Molecular basis of colorectal cancer: Towards an individualized management? *REV ESP ENFERM DIG (Madrid)*. Vol. 103. N.º 1, pp. 29-35, 2011
 60. www.sciencedirect.com
 61. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 11-27.
 62. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 2006; 8: 412-19.
 63. Akin C. Molecular diagnosis of mast cell disorders: a paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2006; 8: 141-51.
 64. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138: 2059-72
 65. Lanza G, Matteuzzi M, Gafa R, et al. Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *Int J Cancer*. 1998; 79: 390-5
 66. Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Herfarth K, et al. Confirmation that chromosome 18q allelic loss in colon cancer is a prognostic indicator. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 427-33.

67. Wang W, Wang G-Q, Sun X-W, et al. Prognostic values of chromosome 18q microsatellite alterations in stage II colonic carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2010; 16: 6026-34.
68. Kang GH. (2011) Four molecular subtypes of colorectal cancer and their precursor lesions. *Arch Pathol Lab Med.* 2011, 135(6):698-703
69. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-19.
70. Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1174-79
71. B. Iacopetta, F. Grieu, and B. Amanuel, "Microsatellite instability in colorectal cancer," *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, vol. 6, no. 4, pp. 260–269, 2010.
72. Axel Walther, Elaine Johnstone, Charles Swanton, Rachel Midgley, Ian Tomlinson & David Kerr. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer* 9, 489-499 (July 2009)
73. K. Soreide. E. A. M. Janssen. H. Soiland. H. Korner. J. P. A. Baak. Microsatellite instability in colorectal cancer. *British Journal of Surgery* 2006; 93: 395–406
74. K. Søreide, B. S. Nedrebø, J. C. Knapp, T. B. Glomsaker, J. A. Søreide, and H. Kørner, "Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer:potential implications for the surgical oncologist," *Surgical Oncology*, vol. 18, no. 1, pp. 31–50, 2009
75. Sohaily S.(2012) A. Molecular pathways in colorectal cancer, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27(9) 1423–1431
76. Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol.* 1999; 9: 349-57
77. Nosho K, Irahara N, Shima K, et al. Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. *PLoS ONE.* 2008; 3: e3698.
78. Hardy RG, Meltzer SJ, Jankowski JA. ABC of colorectal cancer: Molecular basis for risk factors. *BMJ* 2000; 321: 886-889.

79. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJC. The prognostic significance of K-ras, p53 and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005; April, Vol. 12, pp 586-1590.
80. S Segditsas and I Tomlinson. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* (2006) 25, 7531–7537.
81. Irma M. Oving and Hans C. Clevers. Molecular causes of colon cancer. *European Journal of Clinical Investigation* (2002) 32, 448–457
82. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP et al. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996;382:225–30.
83. Smalley MJ, Sara E, Paterson H, Naylor S, Cook D, Jayatilake H et al. Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *EMBO J* 1999;18:2823–35.
84. Kishida S, Yamamoto H, Hino S, Ikeda S, Kishida M, Kikuchi A. DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-katenin stability. *Mol Cell Biol* 1999;19:4414–22.
85. Itoh K, Krupnik VE, Sokol SY. Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-katenin. *Curr Biol* 1998;8:591–4.
86. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-katenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 1996;272:1023–6.
87. Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. Downregulation of beta-katenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-katenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 1998;8:573–81.
88. Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-katenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 1996;10:1443–54.
89. Yamamoto H, Kishida S, Kishida M, Ikeda S, Takada S, Kikuchi A. Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *J Biol Chem* 1999;274:10681–4.

90. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-katenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997;16:3797–804.
91. Marikawa Y, Elinson RP. beta-TrCP is a negative regulator of Wnt/beta-katenin signaling pathway and dorsal axis formation in *Xenopus* embryos. *Mech Dev* 1998;77:75–80.
92. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R et al. Functional interaction of beta-katenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996;382:638–42
93. Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H et al. The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-katenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 1999;9:207–10
94. Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V et al. XTcf-3 transcription factor mediates beta-katenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 1996;86:391–9
95. Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P et al. The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 1998;395:608–12.
96. Brantjes H, Roose J, van de Wetering M, Clevers H. All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res* 2001;29:1410–9.
97. Waltzer L, Bienz M. *Drosophila* CBP represses the transcription factor tcf to antagonize Wingless signaling. *Nature* 1998;395:521–5.
98. Brannon M, Brown JD, Bates R, Kimelman D, Moon RT. XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* 1999;126:3159–70.
99. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N et al. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-katenin and transcription factor TCF. *Nature* 1999;399:798–802.
100. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeling H, Zawel L, da Costa LT et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway [see comments]. *Science* 1998;281:1509–12.

101. Roose J, Huls G, van Beest M, Moerer P, van der Horn K, Goldschmeding R et al. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-katenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* 1999;285:1923–6.
102. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. beta-katenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 1999;155:1033–8.
103. Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P et al. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-katenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 1999;18:2883–91.
104. Yuan S, Shi Y, Tang SJ. Wnt signaling in the pathogenesis of multiple sclerosis-associated chronic pain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012 Dec;7(4):904-13. doi: 10.1007/s11481-012-9370-3. Epub 2012 May 2.
105. S Salahshor, J R Woodgett. The links between axin and carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2005;58:225–236
106. Zeng L, Fagotto F, Zhang T, et al. The mouse fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell.* 1997;90:181–92.
107. Nighat Parveen • Mahboob Ul Hussain • Arshad A. Pandith • Syed Mudassar . Diversity of axin in signaling pathways and its relation to colorectal cancer. *Med Oncol* (2011) 28:S259–S267
108. Paula MC, Harold F. The genetics of KRK. *Ann Intern Med.* 2002; 137:603–12.
109. Yamamoto H, Kishida S, Uochi T, et al. Axil, a member of the Axin family, interacts with both glycogen synthase kinase 3 beta and beta-katenin and inhibits axis formation of *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol.* 1998;18:2867–75.
110. Mai M, Qian C, Yokomizo A, et al. Cloning of the human homolog of conductin (AXIN2), a gene mapping to chromosome 17q23–q24. *Genomics.* 1999;55:341–4.
111. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-katenin, APC, and GSK3beta. *Science.* 1998;280:596–9.
112. Luo W, Ng WW, Jin LH, Ye Z, Han J, Lin SC. Axin utilizes distinct regions for competitive MEKK1 and MEKK4 binding and JNK activation. *J*

- Biol Chem. 2003;278:37451–8. Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways neurosignals 2004;13:99–113 111.
113. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-katenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-katenin. *EMBO J*.1998;17:1371–84.
 114. Fagotto F, Jho E, Zeng L, Kurth T, Joos T, Kaufmann C, Costantini F. Domains of Axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization. *J Cell Biol*. 1999;145:741–56.
 115. Hsu W, Zeng L, Costantini F. Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *J Biol Chem* 1999;274:3439–45.
 116. Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, Kishida M, Sakamoto I, Koyama S et al. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-katenin. *J Biol Chem*1998;273:10823–6.
 117. Sakanaka C, Williams LT. Functional domains of axin. Importance of the C terminus as an oligomerization domain. *J Biol Chem* 1999;274:14090–3.
 118. <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/WNTSignPathID20042.html>
 119. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159–70.
 120. Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:199–221.
 121. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, et al. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1995;6:3–16.
 122. Liu W, Dong X, Mai M, et al. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-katenin/TCF signalling. *Nat Genet* 2000;26:146–7.
 123. Webster MT, Rozycka M, Sara E, et al. Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28:443–53.

124. Wu R, Zhai Y, Fearon ER, et al. Diverse mechanisms of beta-katenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* 2001;61:8247–55.
125. Domingo E, Espin E, Armengol M, et al. Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:138–42.
126. Danguy A, Camby I, Kiss R. Galektins and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002;19;1572:285–93
127. Liu FT, Rabinovich GA. Galektins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005;5:29–41
128. Ri-Yao Yang, Gabriel A. Rabinovich, Fu-Tong Liu. Galektins: structure, function and therapeutic potential. doi:10.1017/S1462399408000719; Vol. 10; e17; June 2008
129. Hirabayashi, J. et al. (2002) Oligosaccharide specificity of galektins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1572, 232-254
130. Fred Brewer, C. (2002) Binding and cross-linking properties of galektins. *Biochim Biophys Acta* 1572, 255-262
131. Sacchetti, J.C., Baum, L.G. and Brewer, C.F. (2001) Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. *Biochemistry* 40, 3009-3015
132. Liu, F.T., Patterson, R.J. and Wang, J.L. (2002) Intracellular functions of galektins. *Biochim Biophys Acta* 1572, 263-273
133. N Mazurek, Jc Byrd, Y Sun, M Hafley, K Ramirez, J Burks, Rs Bresalier. Cell-Surface Galektin-3 Confers Resistance To Trail By Impeding Trafficking Of Death Receptors In Metastatic Colon Adenocarcinoma Cells. *Cell Death And Differentiation* (2012) 19, 523–533.
134. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T et al. Galektins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597–598.
135. Anna Krześlak. Anna Lipińska. Galektin-3 As A Multifunctional Protein. *Cellular & Molecular Biology Letters*. Volume 9, (2004) Pp 305 – 328

136. Hsu, D.K. and Liu, F.T. (2004) Regulation of cellular homeostasis by galektins. *Glycoconj J* 19, 507-515
137. Hsu, D.K., Yang, R.Y. and Liu, F.T. (2006) Galektins in apoptosis. *Methods Enzymol* 417, 256-273
138. Yoshii, T. et al. (2002) Galektin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 277, 6852-6857
139. Takenaka, Y. et al. (2004) Nuclear export of phosphorylated galektin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol* 24, 4395-4406
140. Hughes, R.C. (2001) Galektins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83, 667-676
141. Demetriou, M. et al. (2001) Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 409, 733-739
142. Partridge, E.A. et al. (2004) Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 306, 120-124
143. Nakahara, S. and Raz, A. (2007) Regulation of cancer-related gene expression by galektin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. *Cancer Metastasis Rev.*
144. Rabinovich, G.A. et al. (2007) An emerging role for galektins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scand J Immunol* 66, 143-158
145. Liu, F.T. (2005) Regulatory roles of galektins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol* 136, 385-400
146. Cortegano, I. et al. (1998) Galektin-3 downregulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol* 161, 385-389
147. Liu, F.T. and Rabinovich, G.A. (2005) Galektins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5, 29-41
148. Ashery, U. et al. (2006) Spatiotemporal organization of Ras signaling: rasosomes and the galektin switch. *Cell Mol Neurobiol* 26, 471-495
149. Shimura, T. et al. (2004) Galektin-3, a novel binding partner of beta-katenin. *Cancer Res* 64, 6363-6367
150. Shimura, T. et al. (2005) Implication of galektin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res* 65, 3535-3537

151. Cecchinelli, B. et al. (2006) Repression of the antiapoptotic molecule galektin-3 by homeodomain-interacting protein kinase 2-activated p53 is required for p53-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 26, 4746-4757
152. Moisa, A. et al. (2007) Growth/adhesionregulatory tissue lectin galektin-3: stromal presence but not cytoplasmic/nuclear expression in tumor cells as a negative prognostic factor in breast cancer. *Anticancer Res* 27, 2131-2139
153. John, C.M. et al. (2003) Truncated galektin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer. *Clin Cancer Res* 9, 2374-2383
154. P Demetter, N Nagy, B Martin, A Mathieu, P Dumont, C Decaestecker, I Salmon. The galektin family and digestive disease *J Pathol* 2008; 215: 1–12
155. Irimura T, Matsushita Y, Sutton RC, Carralero D, Ohannesian DW, Cleary KR, et al. Increased content of an endogenous lactose-binding lectin in human colorectal carcinoma progressed to metastatic changes. *Cancer Res* 1991;51:387–393.
156. Legendre H, Decaestecker C, Nagy N, Hendlisz A, Schuring MP, Salmon I, et al. Prognostic values of galektin-3 and the macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human colorectal cancers. *Mod Pathol* 2003;16:491–504.
157. Nakamura M, Inufusa H, Adachi T, Aga M, Kurimoto M, Nakatani Y, et al. Involvement of galektin-3 expression in colorectal cancer progression and metastasis. *Int J Oncol* 1999;15:143–148.
158. Lotz MM, Andrews CW Jr, Korzelius CA, Lee EC, Steele GD Jr, Clarke A, et al. Decreased expression of Mac-2 (carbohydratebinding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3466–3470.
159. Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A, Castronovo V, van den Brule F, Liu FT, et al. Differential expression of galektin 3 and galektin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology* 1997;113:1906–1915.
160. Cowles EA, Agrwal N, Anderson RL, Wang JL. Carbohydratebinding protein 35. Isoelectric points of the polypeptide and a phosphorylated derivative. *J Biol Chem* 1990;265:17706–17712.

161. Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. Phosphorylation of the β -galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J Biol Chem* 2000;275:36311–36315.
162. Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HRC, Raz A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 2002;277:6852–6857.
163. Song S, Byrd JC, Mazurek N, Liu K, Koo JS, Bresalier RS. Galectin-3 modulates MUC2 mucin expression in human colon cancer cells at the level of transcription via AP-1 activation. *Gastroenterology* 2005;129:1581–1591.
164. Blank M, Klussmann E, Kruger-Krasagakes S, Schmitt-Graff A, Stolte M, Bornhoeft G, et al. Expression of MUC2-mucin in colorectal adenomas and carcinomas of different histological types. *Int J Cancer* 1994;59:301–306.
165. Iurisci I, Tinari N, Natoli C, Angelucci D, Cianchetti E, Iacobelli S. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:1389–1393.
166. Yihui Shi, Biao He, Kristopher M. Kuchenbecker, Liang You, Zhidong Xu, Iwao Mikami, Adam Yagui-Beltran, Genevieve Clement, Yu-Ching Lin, Junichi Okamoto, Dawn T. Bravo and David M. Jablons. Inhibition of Wnt-2 and galectin-3 synergistically destabilizes b-*catenin* and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer*: 121, 1175–1181 (2007)
167. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:55–67
168. Shumei Song, Nachman Mazurek, Chunming Liu, Yunjie Sun, Qing Ding, Kaifeng Liu, Mien-Chie Hung, Robert S. Bresalier. Galectin-3 Mediates Nuclear B-Katenin Accumulation and Wnt Signaling in Human Colon Cancer Cells by Regulation of Glycogen Synthase Kinase-3B Activity. *Cancer Res* 2009; 69: (4). February 15, 2009
169. Kikuchi A. Roles of Axin in the Wnt signaling pathway. *Cell Signal* 1999;11:777–88.
170. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
171. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs214250

172. http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi
173. Fearon ER, Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61: 759-67.
174. Sze Chuen Cesar Wong, Elena Siu Fong Lo, King Chung Lee, John K. C. Chan, W. L. Wendy Hsiao. Prognostic and Diagnostic Significance of β -Katenin Nuclear Immunostaining in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. Vol. 10, 1401–1408, February 15, 2004
175. Yasui W, Sentani K, Motoshita J, Nakayama H. Molecular pathobiology of gastric cancer. *Scand J Surg* 2006; 95: 225-31
176. Dan Huang, Xiang Du. Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. *World J Gastroenterol* 2008 March 28; 14(12): 1823-1827
177. Fakhraddin Naghibalhossaini, Mozhdeh Zamani, Pooneh Mokarram, Islam Khalili, Mozhgan Rasti, Zohreh Mostafavi-pour. Epigenetic and genetic analysis of WNT signaling pathway in sporadic colorectal cancer patients from Iran. *Mol Biol Rep* (2012) 39:6171–6178
178. Giles RH, van Es JH, Clevers H (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653:1–24. doi:10.1016/S0304-419X(03)00005-2
179. Thorstensen L, Lind GE, Løvig T, Diep CB, Meling GI, Rognum TO, Lothe RA (2005) Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia* 7:99–108.
180. Hideyuki Ishiguro, Tatsuhiko Tsunoda, Toshihiro Tanaka, Yoshitaka Fujii, Yusuke Nakamura and Yoichi Furukawa Identification of AXUD1, a novel human gene induced by AXIN1 and its reduced expression in human carcinomas of the lung, liver, colon and kidney. *Oncogene* (2001) 20, 5062 – 5066
181. da Costa LT, He TC, Yu J, Sparks AB, Morin PJ, Polyak K, Laken S, Vogelstein B and Kinzler KW. (1999). *Oncogene*, 18, 5010 ± 5014.
182. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B and Clevers H. (1997). *Science*, 275, 1784 ± 1787.
183. Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T and Nakamura Y. (1998). *Cancer Res.*, 58, 2524 ± 2527.

184. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B and Kinzler KW. (1997). *Science*, 275, 1787 ±1790.
185. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y and Nakamura Y. (2000). *Nat. Genet.*, 24, 245 - 250.
186. Yosuke Shimizu, Satoshi Ikeda, Masahiko Fujimori, Shinya Kodama, Masahiro Nakahara, Masazumi Okajima, and Toshimasa Asahara Frequent Alterations in the Wnt Signaling Pathway in Colorectal Cancer With Microsatellite Instability. *GENES, CHROMOSOMES & CANCER* 33:73–81 (2002)
187. Ikeda S, Kishida M, Matsuura Y, Usui H, Kikuchi A. 2000. GSK-3b-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by b-katenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin. *Oncogene* 19:537–545.
188. Kodama S, Ikeda S, Asahara T, Kishida M, Kikuchi A. 1999. Axin directly interacts with plakoglobin and regulates its stability. *J Biol Chem* 274:27682–27688.
189. Sakanaka C, Weiss JB, Williams LT. 1998. Bridging of b-katenin and glycogen synthase kinase-3b by axin and inhibition of b-katenin-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3020–3023.
190. Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. 1997. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of b-katenin. *J Biol Chem* 272:24735–24738.
191. Peifer M, Polakis P (2000) Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis a look outside the nucleus. *Science* 287:1606–1609
192. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, Thomas G, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J (2001) Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 120: 1763–1773, doi: 10.1053/gast.2001.24798
193. Dahmen RP, Koch A, Denkhaus D, Tonn JC, Sorensen N, Berthold F, Behrens J, Birchmeier W, Wiestler OD, Pietsch T (2001) Deletions of AXIN1, a

- component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res* 61: 7039–7043
194. M Nakajima, M Fukuchi, T Miyazaki, N Masuda, H Kato and H Kuwano. Reduced expression of Axin correlates with tumour progression of oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* (2003) 88, 1734 – 1739
 195. George W. Yardy, David C. Bicknell , Jennifer L. Wilding, Sylvia Bartlett, Ying Liu, Bruce Winney , Gareth D.H. Turner, Simon F. Brewster, Walter F. Bodmer. Mutations in the AXIN1 Gene in Advanced Prostate Cancer. *EUROPEAN UROLOGY* 56 (2009) 486 – 494
 196. Yucel Erbilgin, Ozden Hatirnaz Ng , Nurhan Mavi , Ugur Ozbek & Muge Sayitoglu. Genetic alterations in members of the Wnt pathway in acute leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, March 2012; 53(3): 508–510
 197. Vitaly Balan, Pratima Nangia-Makker, Ann G. Schwartz, et al. Racial Disparity in Breast Cancer and Functional Germ Line Mutation in Galektin-3 (rs4644): A Pilot Study. *Cancer Res* 2008;68:10045-10050.
 198. Dumic J, Dabelic S, Flogel M. Galektin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760: 616–35.
 199. Hong-jie Chen, Zhao-cong Zheng, Bang-qing Yuan, Zheng Liu, Junjie Jing, Shou-Sen Wang. The effect of galektin-3 genetic variants on the susceptibility and prognosis of gliomas in a Chinese population. *Neuroscience Letters* 518 (2012) 1– 4
 200. J. Miyazaki, R. Hokari, S. Kato, Y. Tsuzuki, A. Kawaguchi, S. Nagao, K. Itoh, S. Miura, Increased expression of galektin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes, *Oncol. Rep.* 9 (2002) 1307–1312.
 201. R.S. Bresalier, J.C. Byrd, L. Wang, A. Raz, Colon cancer mucin: a new ligand for the beta-galactoside-binding protein galektin-3, *Cancer Res.* 56 (1996) 4354–4357.
 202. V. Castronovo, F.A. Van Den Brule, P. Jackers, N. Clausse, F.T. Liu, C. Gillet, M.E. Sobel, Decreased expression of galektin-3 is associated with progression of human breast cancer, *J. Pathol.* 179 (1996) 43–48.
 203. K. Balasubramanian, R. Vasudevamurthy, S.U. Venkateshaiah, A. Thomas, A. Vishweshwara, S.M. Dharmesh, Galektin-3 in urine of cancer

- patients: stage and tissue specificity, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135 (2009) 355–363.
204. S.E. Baldus, T.K. Zirbes, M. Weingarten, S. Fromm, J. Glossmann, F.G. Hanisch, S.P. Monig, W. Schroder, U. Flucke, J. Thiele, A.H. Holscher, H.P. Dienes, Increased galectin-3 expression in gastric cancer: correlations with histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation, *Tumour Biol.* 21 (2000) 258–266.
205. M. Kosacka, P. Piesiak, A. Kowal, M. Golecki, R. Jankowska, Galectin-3 and cyclin D1 expression in non-small cell lung cancer, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30 (2011) 101.
206. Kazuya Endo, Shunji Kohno, Eiji Tsujita, Akihiro Watanabe, Hideaki Nakashima, Hideo Baba And Yoshihiko Maehara. Galectin-3 Expression Is A Potent Prognostic Marker In Colorectal Cancer. *Anticancer Research* 25: 3117-3122 (2005)
207. Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H et al: Galectin 3 : a novel antiapoptotic molecules with a functional BH1(NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res* 57: 5272-5276, 1997.
208. Yu F, Finney RL, Raz A et al: Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem* 277: 15819-15827, 2002.
209. Matarrese P, Fusco O, Tinari N et al: Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int J Cancer* 85: 545-554, 2000.
210. C.Y. Hu, S.K. Chang, C.S. Wu, W.I. Tsai, P.N. Hsu, Galectin-3 gene (LGALS3) +292C allele is a genetic predisposition factor for rheumatoid arthritis in Taiwan, *Clin. Rheumatol.* 30 (2011) 1227–1233.
211. Nangia-Makker P, Raz T, Tait L, Hogan V, Fridman R, Raz A. Galectin-3 cleavage: a novel surrogate marker for matrix metalloproteinase activity in growing breast cancers. *Cancer Res* 2007;67:11760–8.
212. Choi JH, Chun KH, Raz A, Lotan R. Inhibition of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in breast cancer cells by galectin-3. *Cancer Biol Ther.* 2004;3:447-452.

213. Mazurek N, Sun YJ, Liu KF, et al. Phosphorylated galectin- 3 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling by regulating phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 in human breast carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2007;282:21337-21348.
214. Nachman Mazurek, James C. Byrd, Yunjie Sun, Suguru Ueno, and Robert S. Bresalier. A Galectin-3 Sequence Polymorphism Confers TRAIL Sensitivity to Human Breast Cancer Cells.
215. Andreas Meyer, Irina Coinac, Natalia Bogdanova, Natalia Dubrowinskaja, et.al. Apoptosis gene polymorphisms and risk of prostate cancer: A hospital-based study of German patients treated with brachytherapy. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 31 (2013) 74–81
216. van den Brule F, Califice S, Castronovo V. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J* 2004;19:537–42.
217. Califice S, Castronovo V, van den Brule F. Galectin-3 and cancer (Review). *Int J Oncol* 2004;25:983–92.
218. Schoeppner HL, Raz A, Ho SB, Bresalier RS. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. *Cancer* 1995;75:2818–26.
219. Castronovo V, Campo E, van den Brule FA, Claysmith AP, Cioce V, Liu FT, Fernandez PL, Sobel ME. Inverse modulation of steady-state messenger RNA levels of two non-integrin laminin-binding proteins in human colon carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1161–9.
220. Kubota K, Akasu T, Fujita S et al: Clinical and pathological prognostic indicators with colorectal mucinous carcinoma. *Hepatogastroenterolgy* 51: 142-146, 2004.
221. Ikeda S, Shimizu Y, Fujimori M et al: Immunohistochemical and mutational analyses of beta-katenin, Ki-ras, and p53 in two subtypes of colorectal mucinous carcinoma. *Clin Cancer Res* 15: 5660-5665, 2003.
222. Van Klinken BJW, Dekker J, Buller HA et al: Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *Am J Physiol* 269: G613-G627, 1995.

223. Breusaliere RS, Byrd JC, Wang L et al: Colon cancer mucin: a new ligand for the α -galactoside-binding protein galektin-3. *Cancer Res* 56: 4354-4357, 1996.
224. Bresalier RS, Mazurek N, Sternberg LR et al: Metastasis of human colon cancer is altered by modifying expression of the α -galactoside-binding protein galektin 3. *Gastroenterology* 115:287-296, 1998.
225. Dudas SP, Yunker CK, Sternberg LR et al: Expression of human intestinal mucin is modulated by the α -galactoside binding protein galektin-3 in colon cancer. *Gastroenterology* 123: 817-826, 2002.
226. Nangia Makker, P., Ochieng, J., Christman, J. K., and Raz, A. Regulation of the expression of galactoside-binding lectin during human monocytic differentiation. *Cancer Res.*, 53: 5033–5037, 1993.
227. Platt, D., and Raz, A. Modulation of the lung colonization of B16–F1 melanoma cells by citrus pectin. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84:438–442, 1992.
228. Woo, H. J., Shaw, L. M., Messier, J. M., and Mercurio, A. M. J. The major non-integrin laminin protein of macrophages is identical to carbohydrate-binding protein 35 (Mac-2). *J. Biol. Chem.*, 265: 7097–7099, 1990.
229. Matarrese, P., Fusco, O., Tinari, N., Natoli, C., Liu, F. T., Malorni, W., and Iacobelli, S. Overexpression of galektin-3 in human breast carcinoma causes increased cell adhesion and protection from apoptosis. *Int. J. Cancer*, in press, 2000.
230. Inohara, I., and Raz, A. Functional evidence that cell surface galektin-3 mediates homotypic cell adhesion. *Cancer Res.*, 55: 3267–3271, 1995.
231. Inohara, I., Akahani, S., Kohts, K., and Raz, A. Interactions between galektin-3 and Mac 2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer Res.*, 56: 4530–4534, 1996.
232. Kim, H. R., Lin, H. M., Biliran, H., and Raz, A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galektin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res.*, 59: 4148–4154, 1999.

HAM VERİLER

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

Çalışmanın Adı: “**Kolorektal Kanserli Hastalarda Axin1 ve Galektin-3 Gen Varyantlarının İncelenmesi ve Galektin-3 Serum Düzeyinin Belirlenmesi**”

- Çalışmaya kolorektalkanser tanısı konulmuş 100 hasta ve 100 sağlıklı birey katılacaktır.
 - Gönüllüden 10 cc EDTA’lı kan örneği alınacaktır.
 - Alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılacaktır.
 - Elde edilen DNA örneklerinde hastalığınızın oluşmasında rol oynayabileceği düşünülen Axin1 ve Galektin-3 gen polimorfizmlerinin incelenmesi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) teknikleri kullanılacaktır.
- Polimorfizm çalışmaları, direkt hastalık sonucunu belirtmemekte olup, kişiye söz konusu hastalığa yatkınlıkla ilişkili genetik yapıya sahip olup olmadığını göstermektedir.
- Elde edilen DNA bu çalışma dışında başka bir işlem için kullanılmayacaktır.
 - Diğer bir çalışmada gönüllü DNA’sının kullanılması gerektiğinde kendisinden izin alınacaktır.
 - Elde edilen serum örneklerinden Galektin-3 düzeylerinin tayini ELISA tekniği kullanılarak belirlenecektir.
 - Gönüllünün uygulama sırasında herhangi bir rahatsızlıkla ve riskle karşılaşması söz konusu değildir.
 - Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırmacı ve destekleyiciye aittir. Gönüllü arzusu üzerine mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın çalışmadan ayrılabilir.
 - Kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır.
 - Bu işlemler için sizden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.
 - Bu çalışma için size herhangi bir ücret ödenmeyecektir.
 - Çalışmaya katılmak zorunluluğunuz bulunmamaktadır.
 - Gönüllünün çalışmaya katılmayı reddetmesi onun gelecekteki takip ve

tedavisi üzerine olumsuz etkisi bulunmayacaktır.

- Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırıcı ve destekleyiciye aittir.
- Gönüllünün çalışmaya katılım süreci sadece doku örneğinin alınması ile sınırlıdır.
- Çalışma kabul kriterlerin'e ve özelliklerine uyum sağlamadığınız takdirde çalışmadan çıkarılabileceğiniz durumlar oluşabilir. Bu nedenle çalışmadan araştırıcının isteğı ile çıkarılabilirsiniz.
- Çalışma sonunda elde edilecek verilerle uluslararası çapta yayınlanabilecek, hastalığınıza açıklık getirecek bilgiler elde edilebilmesi mümkündür. Bu şekilde çalışma sonucunda ulaşılan önemli bir bilgi varsa tarafınıza bildirilecektir.
- Sayın Doç.Dr.Soykan Arıkan veya Prof.Dr.Esra Kaytan Sağlam tarafından İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.
- Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.
- Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağını bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.
- Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.
- İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağılanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük

altına girmeyeceğim).

- Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Doç.Dr.Soykan Arıkan'ı / Prof.Dr. Esra Kaytan Sağlam'ı arayabileceğimi biliyorum.
- Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.
- Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.
- İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı-soyadı, İmzası

Doç. Dr. Soykan Arıkan/ Prof.Dr.Esra Kaytan Sağlam

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı, İmzası, Görevi

Dr.Yiğit Düzköylü/Dr.Züleyha Akgün

KOLOREKTAL KANSERİ ARAŞTIRMA FORMU
OLGU FORMU

Form No:	Protokol No :	Tarih :
Adı Soyadı :	Yaş :	Cinsiyet :
Boy / Kilo :	Meslek :	Kan Grubu:
Memleket:	Yaşadığı yer:	

Öyküsü:**Yakınmanın başlangıç zamanı:****Öz geçmişi:**

Sigara tüketimi (süre, miktar)
Alkol kullanımı
İlaç kullanımı :
Transfüzyon

İskemik kalp hastalığı
Kronik Böbrek Yetersizliği
Steroid kullanımı
Kronik Karaciğer Hastalığı
Diğer

Diabetes Mellitus
Malign hastalık
Kemoterapi
Radyoterapi

Soy geçmişi:

Diğer malign hastalıklar
Diabetes Mellitus
Kronik Karaciğer Hastalığı
Hipertansiyon

Beslenme Tarzı:

Yağ tüketimi:	zeytinyağı	az	orta
bol	bitkisel yağ	az	orta
bol	Hayvansal Yağ	az	orta
bol	Meyve tüketimi	az	orta
bol	Sebze tüketimi	az	orta
bol			

Öz geçmişinde kolon ile ilgili yakınma / hastalık:

Konstipasyon
Ülseratif kolit
Crohn
Polip (tipini yazınız)
Adenom (tipini yazınız)

Ameliyat öncesi Kan Biyokimyası:

Glukoz	BUN	Prot	Alb
ALT	AST	ALP	GGT
LDH	T Kolest	Trig	
LDL	HDL	Ca	P
Hb	Htc	Löko	Tromb

Ameliyat öncesi tanı :**Yapılan Ameliyat :****Histopatolojik incelemeye ait veriler.****Ek belgeler:**

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1647

Tarih : 15.11.2012

Konu : Prof. Dr. İlhan YAYLIM ERALTAN hk,

Sayın Prof. Dr. İlhan YAYLIM ERALTAN
 DETAE

İlgi : DETAE'nin 22/10/2012 gün ve 740 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Gurbet KORKMAZ'ın yürüteceği 2012/906-1090 dosya numaralı "Kolorektal kanserli hastalarda Axin1 ve Galaktin-3 gen varyantlarının incelenmesi ve Galektin-3 serum düzeyinin belirlenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 02.11.2012 tarihli 18 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Ad Soyad	Unvanı	İmza	Tarih
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Profesör	[İmza]	15.11.2012
Prof. Dr. İlhan YAYLIM ERALTAN	Profesör	[İmza]	15.11.2012
Prof. Dr. Mustafa DİL	Profesör	[İmza]	15.11.2012
Prof. Dr. Cengiz ÖZKAN	Profesör	[İmza]	15.11.2012
Dr. Mustafa DİL	Doçent	[İmza]	15.11.2012

Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN
 İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
 Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
				Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	19/10/2012		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	<input type="checkbox"/>		Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>				
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>		Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:18	Tarih: 02.11.2012				
	İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. İlhan YAYLIM ERALTAN'ın sorumluluğunda ve Yüksek Lisans Gurbet KORKMAZ'ın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **	İmza	
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Sevdâ ÖZEL	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Araştırma ile ilişki
** :Toplantıda Bulunma

Bu karar araştırma projesinin etik açıdan değerlendirme sonucunu bildirmektedir. Klinik ilaç araştırması projeleri için, etik kurulu onayı sonrasında, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmeliğin 5/a .maddesi gereğince, Sağlık Bakanlığına da başvurulması ve gerekli iznin alınması gerekmektedir.

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Kolorektal kanserli hastalarda Axin1 ve Galaktin-3 gen varyantlarının incelenmesi ve Galektin-3 serum düzeyinin belirlenmesi"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. İlhan YAYLIM ERALTAN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biokimya, Moleküler Tıp			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz : Deneysel Araştırma				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

PATENT HAKKI İZİNİ

TELİF HAKKI İZİNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	GURBET	Soyadı	KORKMAZ
Doğ.Yeri	SİVAS	Doğ.Tar.	05.10.1984
Uyruğu	T.C	TC Kim No	23819563276
Email	korkmazgurbet@gmail.com	Tel	05076898858

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp ABD	2013
Lisans	Hacettepe Üniversitesi	2011
Lise	Sivas Kongre Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Zayıf	Orta	53,75	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	82,160		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	iyi

Yayımları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası Yayınlar:

1. Zeybek U, Yaylım I, Ozkan NE, **Korkmaz G**, Turan S, Kafadar D, Cacina C, Kafadar AM. Cyclin D1 Gene G870A Variants and Primary Brain Tumors. Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14(7):4101-6.
2. Tuna G, Küçük hüseyin O, Arıkan S, Kaytan Sağlam E, Güler E, Cacina C, Oztop O, Turan S, **Korkmaz G**, Yaylım I. Do CDKN2 p16 540 C>G, CDKN2 p16 580 C>T, and MDM2 SNP309 T>G Gene Variants Act on Colorectal Cancer Development or Progression? DNA Cell Biol. 2013 Jul;32(7):400-8.

Ulusal Yayınlar:

1. Canan Cacina, Soykan Arıkan, Yemliha Yıldız, Bahar Toptaş, Saime Turan, N. Ezgi Özkan, **Gurbet Korkmaz**, Seden Küçücük, İlhan Yaylım, Turgay İsbir. Meme Kanseri Hastalarında Nitrik Oksit Sentase 3 (NOS3) Glu298Asp Gen Varyantlarının incelenmesi. DETAE e-Journal, Issue 5, 2013.

Uluslararası Poster Sunumları:

1. **G.Korkmaz**, N.E.Ozkan, S.Turan, O.Timirci Kahraman, A.Ergen, E.Kaytam Sağlam, Y.Duzkoylu, E.N.Yenilmez, S.Arıkan, I.Yaylım. Haplotype effects of Galektin-3 gene variants on colorectal cancer. The 5th EMBO Meeting 2013, 21-24 September 2013, Amsterdam
2. U. Cakatay, N. E. Ozkan, K. Yanar, S. Aydın, S. Turan, **G. Korkmaz**, C. Cacina, K. Karatoprak, A. Verim and I. Yaylım. Relation of eNOS/NOS3 genotypes and oxidative stress markers in larynx cancer patients. 38th FEBS Congress "Mechanisms in Biology"2013. 6-11 July 2013, St.Petersburg.

3. İlhan Yaylım, Brunilda Mezani, M.Muzaffer İlhan, Bahar Toptas, Sema Demirci Çekiç, Saime Turan, **Gurbet Korkmaz**, Nazlı Ezgi Ozkan, Ayse İrem Yasin, Seda Yüce, Ertugrul Tasan, H.Arzu Ergen, Reşat Apak. A Possible Association Between Manganese Superoxide Dismutase Genotypes and Antioxidants Markers in Acromegaly Patients. 12th International Conference on Oxidative Stress, Redox States & Antioxidants.3-4 June 2013, Paris.
4. Nazlı Ezgi Ozkan, Saime Turan, **Gurbet Korkmaz**, Canan Cacina, Hande Karagedik, Soykan Arıkan, Esra Kaytan Sağlam, Gülay Tuna, Arzu Ergen, İlhan Yaylım. Alterations in Key Cellular Regulator Genes and Their Combined Effects on Colorectal Cancer. 12-14 June 2013 Systems Biology of Human Disease, Heidelberg.

Ulusal Poster Sunumları:

1. Akif Turna, Saime Turan, Arzu Ergen ,**Gurbet Korkmaz**, Nazlı Ezgi Ozkan, Canan Cacina, Ender Coskunpınar, Yasemin Müsteri Oltulu, Umit Zeybek, İlhan Yaylım . “ NOS3 Glu298Asp gen variantları ve akciğer kanser riski arasında olası bir ilişkinin araştırılması” XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Eylül 2013, İzmir
2. Özlem Timirci Kahraman, **Gurbet Korkmaz**, Saime Turan, Nazlı Ezgi Özkan, Ümit Zeybek, Levent Verim, İlhan Yaylım, Turgay İsbir, “Mesane Kanseri Riski ve Prognozu Üzerinde Apoptoz İlişkili Fas-1377 G/A ve Fas Ligand – 844T/C Gen Varyantlarının Kombine Etkisinin İncelenmesi. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 19-23 Aralık 2012, Bursa.
3. Özlem Timirci-Kahraman, Saime Turan, Nazlı Ezgi Özkan, **Gurbet Korkmaz**, Ayşegül Verim, İlhan Yaylım. Larinks Kanseri Riski ve Prognozu Üzerinde Fas Ligand -844 T/C Gen Varyantı Etkisinin İncelenmesi. IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, Uludağ Üniversitesi, 13-16 Aralık 2012, Bursa.

4. Canan Cacina, Soykan Arıkan, Saime Turan, N. Ezgi Özkan, **Gurbet Korkmaz**, Nihal Yiğitbaşı Yozgatlı, Ş.Ümit Zeybek, İlhan Yaylım. Kolorektal Kanseri Hastalarda EGF A61G Gen Varyasyonunun Araştırılması. IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, Uludağ Üniversitesi, 13-16 Aralık 2012, Bursa.
5. Özlem Küçükhüseyin, Ayşegül Verim, Saime Turan, **Gurbet Korkmaz**, Nazlı Ezgi Özkan, İlhan Yaylım, Hülya Yılmaz-Aydoğan. İleri Glikozilasyon Son Ürün Reseptörü RAGE -374 T/A Gen Polimorfizminin Larinks Kanseri Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması. IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, Uludağ Üniversitesi, 13-16 Aralık 2012, Bursa.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):