

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA SERUM NİTRİK OKSİT,  
ENDOTELİN, VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ, İNTERLÖKİN 2,  
İNTERLÖKİN 18 DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ, BU DÜZEYLERİN TÜMÖR  
EVRELERİYLE İLİŞKİSİNİN VE VEGF GEN POLİMORFİZMİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Zülfü BAYHAN**  
**Genel Cerrahi Anabilim Dalı**  
**Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Nihat Zafer UTKAN**

**Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı**  
**Prof. Dr. Mustafa DÜLGER**

**2008**

**Etik Kurul Onay Tarihi: 05.06.2007    Proje No: 48/2007**

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>Sayfa</b>
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	2
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	4
ŞEKİLLER DİZİNİ	6
TABLolar DİZİNİ	7
TEŞEKKÜR	8
1. AMAÇ VE KAPSAM	9
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1. Kolorektal kanser	11
2.1.1. Embriyoloji	11
2.1.2. Kolorektal anatomi	11
2.1.3. İnsidans	18
2.1.4. Etyoloji	18
2.1.5. Evreleme ve prognoz	20
2.1.6. Tanı	24
2.1.7. Tanıda gecikme	27
2.1.8. Tarama	28
2.1.9. Tedavi	29
2.2. Tümör anjiogenezi	30
2.3. NO <sup>•</sup>	34
2.4. ET	39
2.5. IL-2	41
2.6. IL-18	42
2.7. VEGF	43
2.7.1. DNA polimorfizmi	45
2.7.2. VEGF polimorfizmi	46
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	48
3.1. Materyaller	48
3.2. Kullanılan kimyasallar, araç ve gereçler	48
3.2.1. Kimyasallar	48
3.2.2. Kullanılan tampon ve çözeltiler	49

3.2.3 Araç ve gereçler	51
3.3. Metodlar	51
3.3.1. Numune alınması ve hazırlık işlemleri	51
3.3.2. NO <sub>x</sub> ölçümü	52
3.3.3. ET ölçümü	55
3.3.4. VEGF ölçümü	55
3.3.5. IL-2 ölçümü	55
3.3.6. IL-18 ölçümü	55
3.3.7. Periferik kandan DNA izolasyonu	55
3.3.8. DNA konsantrasyonu ve saflığının ölçümü	56
3.3.9. Genotipleme	56
3.3.10. PCR	57
3.3.11 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	57
3.3.12 RFLP	57
3.3.13. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi	58
3.3.14. Gümüş Boyama	59
3.3.15. İstatiksel Analiz	59
4. BULGULAR	60
4.1. Kontrol ve hasta gruplarının serum NO, VEGF, ET, IL-18 ve IL-2 değerleri	60
4.2. Kontrol ve hasta grubundaki bireylerin deskriptif istatistiksel değerlendirme sonuçları.	62
4.3. Çalışılan parametrelerin ortalamaları ve gruplara göre karşılaştırılması; anlamlılık testleri	63
4.4 VEGF gen polimorfizminin değerlendirilmesi	65
5- TARTIŞMA	66
6- SONUÇLAR VE ÖNERİLER	80
7-ÖZET	82
8- ABSTRACT	83
9- KAYNAKLAR	84

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

**NO:** Nitrik oksit

**NO<sub>3</sub>:** Nitrat

**NO<sub>2</sub>:** Nitrit

**ET:** Endotelin

**VEGF:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü

**IL-2:** İnterlökin-2

**IL-18:** İnterlökin-18

**EGF:** Epidermal büyüme faktörü

**PIGF:** Plasental büyüme faktörü

**FGF:** Fibroblast büyüme faktörü

**TGF- $\alpha$ :** Transforme edici büyüme faktörü-alfa

**TGF- $\beta$ :** Transforme edici büyüme faktörü-beta

**HGF:** Hepatosit büyüme faktörü

**TNF- $\alpha$ :** Tümör nekroz faktör-alfa

**PDGF:** Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

**GCSF:** Granulosit koloni uyarıcı faktör

**IL-8:** İnterlökin-8

**ECM:** Ekstrasellüler matriks

**PA:** Plazminojen aktivatör

**MMP:** Matriks metalloproteinaz

**VEGFR:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü

**DAG:** Diaçilgliserol

**IP<sub>3</sub>:** İnositol trifosfat

**ECE:** Endotelin dönüştürücü enzim

**IL-1:** İnterlökin-1

**ANP:** Atrial natriüretik peptid

**PGI<sub>2</sub>:** Prostaglandin

**IGF:** İnsülin benzeri büyüme faktörü

**IP-10:** Human interferon indükleyici faktör

**NK:** Natural killer

**IL-2R:** İnterlökin-2 reseptörü

**GMCSF:** Granulosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör

**LAK:** Lenfokinle aktive edilmiş öldürücü hücreler

**$\gamma$ -IFN:** Gamma-interferon

**EDRF:** Endotel kaynaklı gevşetici faktör

**NOS:** Nitrik oksit sentetaz

**NO<sub>x</sub>:** Total nitrit + nitrat

**N:** Azot

**O:** Oksijen

**$\mu$ mol:** Mikromol

**pg:** Pikogram

**CEA:** Karsinoembrionik antijen

**SNP:** Single Nucleotide Polimorphism (Tek Nükleotid polimorfizmi)

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (polimeraz zincir tepkimesi)

<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1-</b> Kolorektal anatomi	11
<b>Şekil 2-</b> Kolon duvarı katları	12
<b>Şekil 3-</b> Kolon ve rektumun arteryel dolaşımı	13
<b>Şekil 4-</b> Anorektal anatomi	15
<b>Şekil 5-</b> Kolorektal kanserde evreler	22
<b>Şekil 6-</b> Kolorektal kanserde tümörün kolon duvarında yayılımı	22

<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1:</b> Kolorektal kanserde TNM Evrelemesi	21
<b>Tablo 2:</b> Anjiyogenik faktörler ve anjiyogenezi önleyen faktörler	30
<b>Tablo 3:</b> Nitrojen oksitleri	34
<b>Tablo 4:</b> c NOS ile i NOS arasındaki farklılıklar	37
<b>Tablo 5:</b> VEGF G634C ve VEGF C 936 T polimorfizmleri için poliakrilamid jel elektroforezi koşulları	57
<b>Tablo 6:</b> Kolon kanserli hastaların biyokimyasal analiz sonuçları	59
<b>Tablo 7:</b> Sağlıklı kontrollerin biyokimyasal analiz sonuçları	60
<b>Tablo 8:</b> Kolon kanserli hastaların deskriptif istatistiksel değerlendirme sonuçları	61
<b>Tablo 9:</b> Sağlıklı kontrollerin deskriptif istatistiksel değerlendirme sonuçları	61
<b>Tablo 10:</b> Hastalarla kontrollerin tüm parametrelerde karşılaştırılması	62
<b>Tablo 11:</b> Serum NO• düzeylerinin hasta alt grupları ve kontrollerde birbirleriyle karşılaştırılması	63
<b>Tablo 12:</b> Serum IL-18 düzeylerinin hasta alt grupları ve kontrollerde birbirleriyle karşılaştırılması	63
<b>Tablo 13:</b> Serum VEGF düzeylerinin hasta alt grupları ve kontrollerde birbirleriyle karşılaştırılması	63
<b>Tablo 14:</b> Serum IL-2 düzeylerinin hasta alt grupları ve kontrollerde birbirleriyle karşılaştırılması	64
<b>Tablo 15:</b> VEGF G-634-C gen polimorfizminin hasta ve kontrol gruplarına göre genotip dağılımları	65
<b>Tablo 16:</b> VEGF C-936-T gen polimorfizminin hasta ve kontrol gruplarına göre genotip dağılımları	65
<b>Tablo 17:</b> Hasta ve kontrol gruplarına göre VEGF G-634-C gen polimorfizminin allellik dağılımı	66
<b>Tablo 18:</b> Hasta ve kontrol gruplarına göre VEGF C-935-T gen polimorfizminin allellik dağılımı	66

## **TEŞEKKÜR**

Asistanlık eğitimim süresince yakın ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini bizlere aktarmak için fazlasıyla çaba ve hoşgörü sarfeden, mesleki, etik ve insani değerlerini her zaman örnek alacağım, sayın hocam Genel Cerrahi ABD Başkanı Prof.Dr. Mustafa DÜLGER'e;

Asistanlık dönemim süresince eğitimim için her türlü imkanı sağlayan, sosyal ve bilimsel konularda bana yol gösteren ve yetişmemde büyük emeği olan sayın hocam Prof. Dr. Nihat Zafer UTKAN'a;

Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel ve manevi desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübeleriyle yetişmemi sağlayan çok değerli hocalarım Prof.Dr.Oğuz ÖZBAY ,Prof. Dr. Ahmet ALPONAT, Prof. Dr.Zafer CANTÜRK, Prof.Dr.Nuri GÖNÜLLÜ, Prof.Dr. Anıl ÇUBUKÇU, Doç.Dr. Oğuzhan BÜYÜKGEBİZ, Doç.Dr. Erdem OKAY ve Yrd.Doç. Dr. Oktay YİRMİBEŞOĞLU'na;

Uzmanlık Tezimin hazırlanmasına büyük katkıları olan Dr. Emel ERGÜL ve Dr. Gürler AKPINAR' a

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma;

Bana hayatımın her döneminde destek olan, maddi ve manevi her sıkıntıda yanımda olan, üzerimde sonsuz emekleri olan ve hayatımın bugününü onlara borçlu olduğum sevgili ailem; babam Mehmet BAYHAN, annem Melahat BAYHAN, kardeşlerim Bilge ve Uğur BAYHAN'a ;

Bana daima huzur ve mutluluk veren, her zaman yanımda olan sevgili eşim Nilüfer BAYHAN'a ;

## **SONSUZ TEŞEKKÜRLER.**



## 1.AMAÇ VE KAPSAM

Kolon ve rektum kanseri gastrointestinal sistemin en sık görülen kanseridir. Kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında meme kanserinden sonra ikinci sıradadır. Erkeklerde ise akciğer ve prostat kanserinden sonra üçüncü sıradaki en sık ölümcül kanserdir. Lenf nodu metastazı ve uzak metastaz görülen hastalarda prognoz kötü seyirlidir.

Kolon kanserine bağlı olan ölümlerin büyük bir kısmı operasyonu takiben 5 ila 10 yıl arasında olan uzak metastazlar nedeni ile olur. Tümörün büyüyüp ilerlemesi ve metastaz yapması için anjiogenezin önemli bir rolü vardır. Bu nedenle son zamanlarda kanser tedavilerinde antiangiogenik tedavi stratejileri ilgi odağı olmuştur.

Araştırmamız Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı tarafından yürütülmüştür. Ayrıca Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalından destek alınmıştır.

Araştırmanın hasta grubu Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalımız tarafından sağlanmıştır. Histopatolojik değerlendirme Patoloji Anabilim Dalı, istatistiksel değerlendirme yine Genel Cerrahi Anabilim Dalımız tarafından yapılmıştır.

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Bölümü tarafından kolorektal karsinom tanısı konulan ve henüz tedavi almamış 44 hasta ve 44 tane sağlıklı gönüllü kontrol grubu çalışmamızın evrenini oluşturmuştur.

Hastalar tümör çapı ve lokal yayılımı, lenf nodu yayılımı ve uzak metastaz yapmalarına göre TNM sınıflaması ile evrelendirilerek gruplandırıldı. Hastalar lenf nodu metastazı ve uzak metastaz yayılımı gösterip göstermemelerine göre EVRE 1-2 ve EVRE 3-4 olmak üzere 2 alt gruba sınıflandırıldı.

Araştırmamızın temel amacı; kolon kanserli hastalarda anjiogenezle direkt, indirekt ya da potansiyel olarak ilişkisi bulunabilen Nitrik Oksit, Endotelin, Vasküler endotelial growth faktör , İnterlökin 2 ve İnterlökin 18 parametrelerinin kantitatif ölçülmesi; bunların birbirleriyle, tümör yayılım derecesiyle, lenf nodu metastazı ve uzak metastazlarla olası ilişki ve etkileşimlerinin incelenmesidir. Ayrıca VEGF gen polimorfizminin kolorektal kanseri ile ilişkili olup olmadığının

belirlenmesi de amaçlanmıştır. Hedefimiz kolon kanserinin etiolojisi, patogenezi ve progresyonu ile ilgili aydınlatıcı sonuçlar elde etmektir. Ayrıca tedavisi ve prognozu ile ilgili yeni veriler elde edilmesi ümit edilmektedir. Literatür taramalarımızda bizim çalışacağımız parametrelerin tamamını aynı araştırmada uygulayan herhangi bir rapor yoktur. Bu durum araştırmamıza orjinallik katmaktadır. Ayrıca elde edilen verilerin gelecekte yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalar için yardımcı olacağını umuyoruz.

## **2-GENEL BİLGİLER**

### **2.1- KOLOREKTAL KANSER**

#### **2.1.1 EMBRİYOLOJİ**

Gestasyonun dördüncü haftasında gelişen primitif barsak; ön barsak (foregut), orta barsak (midgut) ve son barsak (hindgut) olarak üç parçaya ayrılır. Orta barsaktan ince barsaklar (ana safra kanalı girişinin başlangıcından itibaren) ve transvers kolonun orta kısmının proksimalinde kalın barsaklar gelişir. Bu bölümdeki barsak segmenti superior mezenterik arterden beslenir. Son barsaktan, transvers kolonun orta kısmından anüsün proksimaline kadar olan kalın barsaklar ve alt ürogenital trakt gelişir. Bu barsak segmentleri inferior mezenterik arter ile beslenir. Ektodermal kaynaklı olan distal anal kanal, beslenme ihtiyacını internal pudental arterin dallarından sağlar.

Gebeliğin altıncı haftasında gelişen orta barsak abdominal kavitenin dışına çıkar. Orta barsak dördüncü hafta sonlanırken superior mezenterik arter etrafında saat yönünün tersine 270 derecelik dönüşünü tamamlayarak abdominal kavitedeki son halini alır.

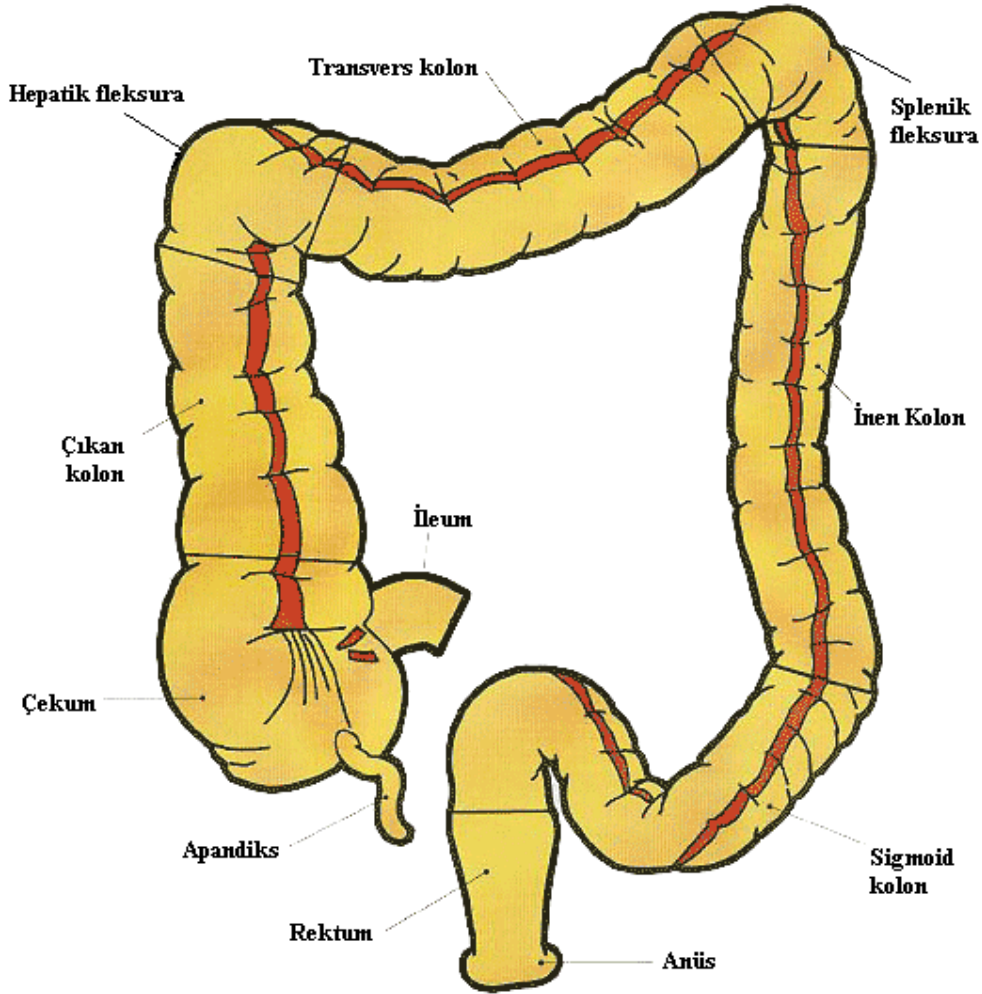
Gelişmekte olan sonbarsak, altıncı haftada anatomik bir septumla ventralde ürogenital sinüs ile dorsalde rektumla bölünen kloaka ile sonlanır. Anal kanal, ince anal membranın sekizinci haftada yırtılmasıyla oluşur. Alt anal kanaldaki dentate line endodermal sonbarsak ile ektodermal doku arasındaki geçiş bölgesidir.

#### **2.1.2 ANATOMİ**

##### **2.1.2.1 Kolon**

Yaklaşık 90-150 cm uzunluğundaki kolon, ileumdan rektuma kadar uzanır. Terminal ileum ve çekum, ileoçekal kapak hizasında posteromedial sınırdaki birleşir. Treves'in kıvrımı (ince barsak üzerindeki tek antimezenterik yağlı doku) distal ileumda, ileoçekal kapağın hemen proksimalinde yer alır. Çekum çıkan kolonun antimezenterik tarafında bir çıkıntı olarak yer alır ve mezenterik olmayan büyük bir

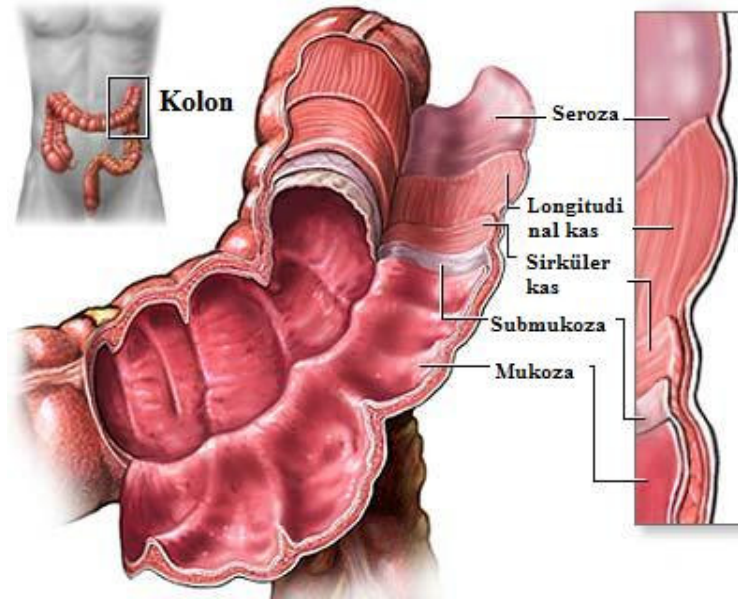
poştur. Çekum yaklaşık 7.5-8.5 cm çapındadır ve kolonun en geniş bölümüdür. Kolon sigmoid kolona doğru giderek daralır, en dar yeri 2,5 cm çapındadır. Sigmoid tümörler küçük boyutlarda dahi semptomatik olurken çekum tümörleri büyük boyutlara erişmeden semptom vermezler. Göreceli olarak daha büyük çapta oluşundan dolayı çekum, distal obstrüksiyonlarda en çok rüptüre olan bölümdür. Bu La Place kanunu ile açıklanabilir: Gerim küre yarıçapı ile doğru orantılıdır. (T=P.R; T=barsak duvarındaki gerim, P=iç basınç, R=barsak iç yarıçapı)



Şekil 1.Kolorektal anatomi

Kolon duvarı tabakaları sırasıyla mukoza, submukoza, içte sirküler kaslar, dışta longitudinal kaslar ve serozadır. Longitudinal kaslar tenya coli adı verilen üç düz banta ayrılır ve kolonun çevresinde birbirinden 120 derece mesafede bulunurlar.

Tenyalar apandiks proksimalinde birleşir, proksimal rektumda sakral promontorium hizasında ayrı ayrı bantlar halinde ortadan kaybolurlar. Haustra koliler tenyalar arasındaki keselenmelerdir ve plica semilunaris adı verilen hilal biçimli yapılarla birbirinden ayrılırlar. Appendices epiploica tenyalara tutunan yağlı çıkıntılardır.



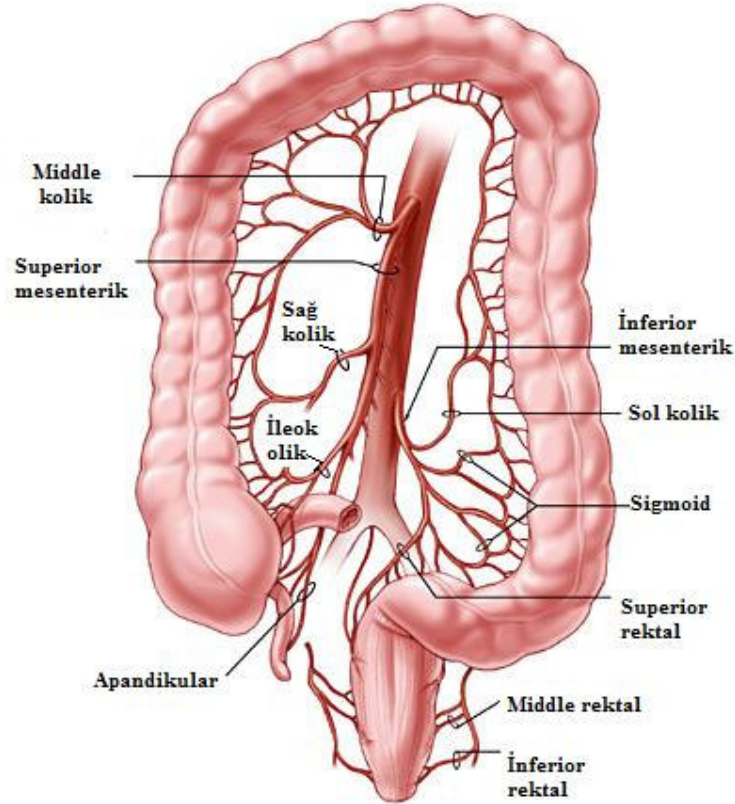
**Şekil 2. Kolon duvarı katları**

Omentum transvers kolonun ön-üst kenarına tutunur. Çıkan kolon, inen kolon, hepatic ve splenik fleksuraların arka yüzleri genellikle retroperitoneal iken çekum, transvers kolon ve sigmoid kolon intraperitoneal yerleşimlidir. Her ne kadar volvulus en sık sigmoid kolonda görülse de çekum ve nadiren transvers kolon da intraperitoneal olmaları ve fiksasyonlarının yetersiz olmaları nedeniyle kendi mezenteri etrafında dönebilirler.

**2.1.2.1.1 Arteriyel dolaşım:** Superior mezenterik arter aortanın önünde, çöliak aksın aşağısında seyrederek. Pankreasın arkasından aşağı doğru ilerler ve duodenumun üçüncü kısmını önden çaprazlar. Superior mezenterik arter, çekum, çıkan kolon ve transvers kolonu ileokolik ve orta kolik dalları ile besler. Kadavra çalışmaları

göstermiştir ki; sağ kolik arter %15 ten daha az bir oranda superior mezenterik arterden çıkar. %85 hastada ise ileokolik arterden köken alır. İnferior mezenterik arter infrarenal aortadan çıkarak inen kolonu, sigmoid kolonu ve üst rektumu sol kolik, sigmoidal ve superior rektal dalları ile besler.

Splenik fleksura hizasında superior ve inferior mezenterik arter arasında kollateraller bulunur. İleokolik, sağ, orta ve sol kolik arterler bir seri anastomoz damarları ile birbirlerine bağlanarak Drummond'un marjinal arterini oluştururlar. Drummond'un marjinal arteri kolonun mezenterik sınırı boyunca yer alır ve kolona vasa rectaları sağlar. Riolan arkı mezenter köküne yakın yerleşir. Riolan arkı inferior mezenterik arterin sol kolik dalı ile superior mezenterik arterin orta kolik dalı arasındaki sabit olmayan bir damardır. Genellikle kıvrıntılı yapısı ile inferior ya da superior mezenterik arterdeki oklüzyonlar sonrası en iyi şekilde görülebildiğinden kıvrım yapan mezenter arter olarak tanımlanır.



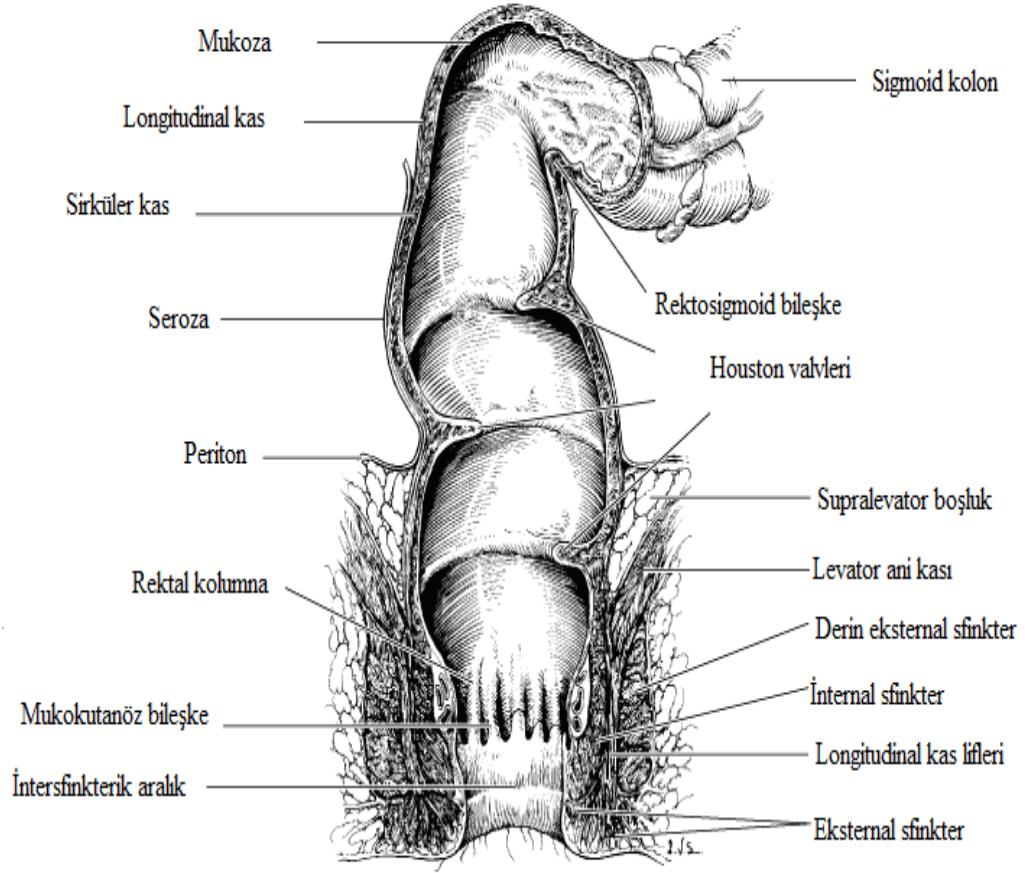
Şekil 3:Kolon ve rektumun arteriyel dolaşımı

**2.1.2.1.2 Venöz Drenaj:** İnférieur mezenterik ven (sol kolik arterin asendan dalına komşu olarak uzanır) dışında kolonu drene eden venler ilgili arterlerle aynı yolu takip eder. İnférieur mezenterik ven; inen kolonu, sigmoid kolonu ve proksimal rektumu drene eder. Treitz ligamanının solunda retroperitoneal olarak ilerler, pankreas gövdesi arkasında devam eder ve splenik vene katılır. Superior mezenterik ven; çekumu, çıkan kolonu ve transvers kolonu drene ederek splenik venle birleşip portal veni oluşturur.

**2.1.2.1.3 Lenfatik Drenaj:** Kolon, submukoza ve muskuler mukozada yerleşmiş lenfatik kanallarla çevrilidir. Mukoza damardan zengin olmasına rağmen lenfatikleri yoktur. Bu yüzden muskularis mukozaya penetre olmamış yüzeysel kanserler lenfatik yolla metastaz yapamazlar. Bu segmenter yapı, tümörün logitudinal intramural yayılımını sınırlandırır. Anüler lezyonlar submukoza ve serozal zonlarda dairesel yayılımla sonuçlanır. Lenfatik damarlar kolonun arteryel dolaşımını takip ederler. Lenf nodları barsak duvarında (epikolik), barsak kenarının iç yüzeyi boyunca (parakolik), mezenterik arterler boyunca (intermediate) ve superior ve inferior arterlerin çıkışları civarında (ana) yer alır.

**2.1.2.1.4 Sinirleri:** Sempatik sinirler peristaltizmi azaltırken parasempatik sinirler stimüle eder. Sağ kolonun sempatik lifleri omuriliğin son altı torakal segmentlerinden köken alır. Torasik splanknik sinirler içinde çöliak pleksusa kadar gelip oradan superior mezenterik pleksusa giderler. Sağ kolonun parasempatik sinirlerinin sağ vagus ile geldiği düşünülür.

Sol kolonun ve rektumun sempatik innervasyonu ilk üç lomber segment kaynaklıdır. Bu sinirler preaortik pleksusa katılırlar ve aorta bifürkasyonun altında inferior mezenterik pleksus adını alırlar. Sol kolonun parasempatik sinirleri sakral sinirlerden köken alarak rektumun diğer ucunda nervus erigentesleri oluşturur. Sakral parasempatiklerin dağılımı hipogastrik pleksustan geçerek splenik fleksuraya kadar ulaşır .



**Şekil 4. Anorektal anatomi**

#### 2.1.2.2 Rektum ve Anal Kanal

Rektal duvar, mukoza, submukoza ve içte sirküler ile dışta longitudinal olmak üzere iki tam kat muskuler tabaka içerir. Rektum yaklaşık 12-15 cm uzunluğundadır ve sigmoid kolon ile anal kanal arasında sakrum eğikliğine uygun olarak yerleşmiştir. Ön peritoneal refleksiyon kadınlarda anüsün 5-7.5 cm üzerinde, erkeklerde ise anüsün 7-9 cm üzerinde yer alır. Arka peritoneal refleksiyon genellikle anüsün 12-15 cm üzerindedir. Rektumun 1/3 üst kısmı ön ve lateral yüzde peritonla kaplıdır. Orta 1/3 ise sadece ön yüzde peritonla kaplıdır. Alt 1/3 ise peritoneal



refleksiyonun altında kalır.

Rektumun üç eğikliği vardır. Proksimal ve distal eğiklik sağa yatık iken ortadaki parça sola yatıktır. Bu birleşim yerleri lümen içinde Houston'ın valvleri olarak isimlendirilir. Houston'ın orta valvi anterior peritoneal refleksiyonla aynı seviyededir. Waldayer'in fasyası dördüncü sakral vertebra hizasında başlayan ve rektumun önüne doğru yayılan, sakrumun damarlarını ve sinirlerini çevreleyerek uzanan sıkı rektosakral fasyadır. Ekstraperitoneal fasyanın önünde Denonvilliers fasyası yer alır ki bu erkeklerde rektovezikal septum, kadınlarda ise rektovajinal septumdur.

Anal kanal, pelvik diyaframda başlar, anal vergede sonlanır. Yaklaşık 4 cm uzunluğundadır ve anteroposteriorde kollabe olmuş bir yarık şeklindedir. Anatomik anal kanal, anal vergeden dentate çizgiye kadar uzanır. Buna rağmen cerrahlar pratikte, cerrahi anal kanalı anal vergeden anorektal halkaya kadar olan kısım olarak tanımlarlar. Anorektal halka dentate çizginin 1-1.5 cm üzerindedir.

**2.1.2.2.1 Arteriyel dolaşım:** İnférieur mezenterik arterin terminal dalları sol ana iliak arteri geçtikten sonra superior rektal arter adını alır. Sigmoid kolon mezosu içinde aşağı inerek üçüncü sakral vertebra hizasında ikiye ayrılır. Superior rektal arterin sağ ve sol dalları üst ve orta rektumu kanlandırır. Orta ve inferior rektal arterler rektumun alt 1/3'ünü kanlandırır. Orta rektal arter internal iliak arterden çıkar. Üst ve orta rektal arterler arasında kollateraller mevcuttur. İnférieur rektal arterler internal pudental arterin dallarıdır. İnternal ve eksternal sfinkterlerle anal kanalı kanlandırır ve diğer rektal arterlerle kollateral oluşturmazlar.

**2.1.2.2.2 Venöz drenaj:** Rektumun venöz drenajı arteriyel dolaşımına paraleldir hem portal dolaşıma hem de sistemik (kaval) dolaşıma katılırlar.

**2.1.2.2.3 Lenfatik drenaj:** Rektal lenfatik akım segmenter ve dairesel olup arteriel kan akımı ile aynı şekilde dağılır. Üst ve orta rektum lenfatikleri inferior mezenterik lenf bezlerine dökülür. Rektumun alt kısmının lenfatikleri, superior rektal arteri izleyen lenfatikler tarafından drene edilerek inferior mezenterik lenf bezlerine dökülür. Dentate çizginin üzerinde kalan anal kanalın lenfatikleri superior rektal

lenfatikler yoluyla ya inferior mezenterik lenf bezlerine ya da lateralde internal iliak lenf bezlerine drene olurlar. Dentate çizginin altındaki bölümün lenfatik drenajı inguinal lenf bezlerine doğrudur.

**2.1.2.2.4 İnnervasyon:** Rektumun innervasyonu pelvisin tüm ürogenital organları ile birlikte ve hem sempatik hem de parasempatik innervasyonu vardır. Alt rektum, mesane, kadın ve erkek genital organları hipogastrik sinirlerle sempatik innervasyon alırlar. 2, 3 ve 4. sakral köklerden çıkan (n.erigentes) kökler rektumun ön ve lateralinde hipogastrik sinirlerle birleşerek pelvik pleksusu oluştururlar ve pelvis lateralinde seyrederek periprostatik pleksusta pelvik pleksustan çıkar. Bu pleksustan çıkan karışık sinir lifleri rektum, internal anal sfinkter, prostat, mesane ve penisi innerve eder .

### **2.1.3 İNSİDANS**

Kolorektal kanserler gastrointestinal sistemin en sık kanseridir. Kolorektal kanserler, erkeklerde akciğer ve prostat, kadınlarda ise akciğer ve meme kanserinden sonra en sık görülen kanserlerdir (1,2). ABD’de bu kanserin insidansı geçen yüzyılın ilk yarısında artmış, ikinci yarısında ise stabil hale gelmiştir. Amerika Birleşik Devletleri’nde 2001 yılında yeni 130.000 kolorektal kanser olgusu saptanmıştır ve yaklaşık 60.000 kişi bu hastalık nedeniyle kaybedilmiştir. Erkeklerde rektal kanser biraz daha sık iken, kadında kolon kanseri biraz daha sıktır. Kolorektal kanserli hastaların çoğunda tanı 40 yaş üzerinde konmaktadır ve bu yaştan sonra insidans sabit bir artış göstermektedir. Olguların %6-8’i 40 yaşın altındakilerde görülür (2). Familiyal ve herediter formlarda hastalığın başlangıcı daha erken yaşlarda, tipik olarak 3. dekada görülür (3).

### **2.1.4 ETYOLOJİ**

1. Coğrafya: Hastalığın dünyadaki dağılımı bölgeler arasında farklılıklar gösterir. Kuzey Amerika ve Yeni Zelanda’da sıkken, Afrika ve Orta Amerika’da daha az görülür (2).

2. Yaş: Kolorektal kanser görülme sıklığı 40 yaşından itibaren artar. ABD’de 1993-1995 yılları arasında yapılan bir taramada 40 yaş altındaki hastalarda kolorektal kanser görülme oranı %0.05-0.06 iken aynı oran 40-60 yaş arası %0.6-0.8 ve 60-80 yaş arasında %3-4 olarak bulunmuştur (1).

3. Aile hikayesi ve genetik: Ailede kolorektal kanser bulunması bir diğer risk faktörüdür. Birinci derece bir akrabada kolorektal Ca kanser bulunmasıyla risk 1.7 kat artarken, ikiden fazla kolorektal kanser bulunduğunda risk 2.7 kat ve 45 yaş altı akrabalarda kolorektal kanser varlığında 5.3 kat artar (3). Kolorektal kanser gelişme riski familial adenomatöz polipozis (FAP) ve herediter non polipozis kolorektal kanser (HNPCC)’de yüksektir.

Familial adenomatöz polipozis (FAP): FAP herediter polipozis sendromunun prototipidir. Otozomal dominant bir hastalıktır. Hasta kalın barsağında 100 üzerinde adenomatöz polip bulunması yada FAP ailesi bireylerinden birinde herhangi bir sayıda adenom saptanması ile tanı konur. FAP, önceden tanımlanan çeşitli barsak dışı bulgularla bir sendromlar spektrumunu içermektedir. FAP ayrıca Gardner Sendromu (epidermal inklüzyon kistleri, kemikte osteomalar ve kolonik polipler) ile Turcot sendromunu (kolonik polipler ve beyin tümörleri) da kapsamaktadır. Adenomatöz polipozisten sorumlu olan genetik defekt 5. Kromozom üzerinde q21 lokusu yakınında bulunmaktadır. Bu gen APC (adenomatöz polipozis koli) geni olarak adlandırılmaktadır. FAP 8000 kişide 1 ila 29000 kişide 1 arası sıklıkta görülmektedir. Gen ekspresyonu defektli hastaların %100 ünde oluşur. Eğer tedavi edilmezlerse genetik defekt bulunan hastaların tümünde kolon kanseri oluşacaktır. FAP’lı bir hastanın ortalama farkedilme yaşı 29’dur. FAP nedeni ile oluşan kolorektal kanserin bir hastada ortalama farkedilme yaşı 39’dur. FAP’lı hastalar için en uygun tedavi tüm kolon ve rektum mukozasının çıkarılmasıdır.

HNPCC’de kolorektal Ca’lı hastanın en az üç akrabasında kolorektal ca vardır ve bu hastaların en az biri 50 yaş altında olup en az biri birinci derece akrabadır ve bu durum en az iki nesilden beri devam etmektedir (Amsterdam Kriterleri) (4). HNPCC’nin FAP’tan farkı polipler yoktur ya da çok azdır. HNPCC hastalarındaki kanserler sporadik kolorektal kanserlere göre daha sık az diferansiye ve müsinözdür. Taşlı yüzük tip de bu hastalarda daha sıktır. Bu sıklıkla kötü prognozla birlikte görülen bulgulara rağmen HNPCC bulunan hastalarda prognoz aynı patolojik

evredeki sporadik kolorektal kansere göre daha iyidir. HNPCC hastalarında %20 senkron, %35 metakron tümör gelişimi vardır.

4. Şişmanlık: Yağdan zengin ve posalı yiyeceklerden fakir beslenme bilinen risk faktörleridir. Yağların kolon mukozası için toksik olduğu bildirilmiştir. Diyetle liflerin artması yüksek yağlı beslenen hastalarda kolon kanseri sıklığını azaltır. Posanın artması karsinogenlerin yoğunluğunu azaltır, kolonik transit zamanı kısaltır, sonuç olarak zararlı bakterilerin çoğalmasını azaltır .

5. Kolorektal kanserle ilişkili diğer durumlar:

- Adenomatöz polipler başta olmak üzere, hamartomatöz ve juvenil polipozis sendromlarında da kolorektal kanser riski artar (5,6).
- Kolorektal kanser saptanan hastalarda senkron veya metakron lezyon gelişme riski yüksektir.
- İnflamatuvar barsak hastalıklarında kolorektal kanser insidansı artar (7,8).
- Meme, over ve uterus kanserlerinde kolorektal kanser gelişme riski iki kat artmıştır (9).
- Üreterosigmoidostomi ve pelvik radyasyon uygulanması risk faktörleri arasındadır (10,11).
- Kolorektal kanserlerin %75'ini ise hiçbir risk faktörü bulunmayan sporadik kanser olgularından oluşur (12).

Kolorektal kanserlerin çoğu sigmoid kolon ve rektumda yerleşir. Ancak proksimal kolon kanserleri giderek artmaktadır.

### **2.1.5 EVRELEME VE PROGNOZ**

Aşık bir metastazın bulunmadığı durumda kolorektal kanserin doğru evrelendirilmesi ancak cerrahi rezeksiyon ve histolojik analiz sonucu yapılabilir. Diğer solid tümörlerden farklı olarak primer lezyonun boyutunun kolon kanseri prognozuna etkisi çok azdır. Prognozla yakın ilişkili faktörler; tümörün barsak duvarındaki penetrasyon derinliği, bölgesel lenf bezlerinin tutulumu ve uzak metastaz varlığıdır.

Evrelemede amaç; hastalığın yayılım derecesini saptamak, bu şekilde tedavinin planlanması ve prognoz açısından tahminde bulunabilmektir. Bu amaçla en sık kullanılan sistemler TNM ve Dukes sistemleridir.

### **Dukes Evrelendirmesi**

Evre Yayılım

A Sadece mukozada

B Tüm duvar (+), lenf ganglionu (-)

C Tüm duvar(+), lenf ganglionu (+)

D Uzak metastaz (+)

### **TNM Klinik Sınıflaması**

Primer tümör T, lenf bezi tutulumu N ve uzak metastaz M ile temsil edilmektedir.

T- Primer tümör

Tx Primer tümör değerlendirilmiyor.

T0 Primer tümör yok.

Tis Carcinoma in situ.

T1 Tümör submukozaya yayılmış.

T2 Tümör muscularis propria'ya yayılmış.

T3 Tümör subserozaya veya peritonla kaplı olmayan perikolik veya perirektal dokulara geçmiş.

T4 Tümör visseral peritonu (seroza) geçmiş ve komşuluk yolu ile diğer organları tutmuş.

N- Regional lenf nodülleri

Nx Regional lenf nodülleri değerlendirilemiyor.

N0 Regional lenf nodüllerine yayılım yok.

N1 1 -3 perirektal veya perikolik lenf nodülünde metastaz var.

N2 4 veya daha fazla pararektal veya perikolik lenfnodülünde metastaz var.

N3 Vasküler yapılar boyunca herhangi bir lenf nodülünde metastaz var.

M- Uzak metastaz

Mx Uzak metastaz varlığı değerlendirilemiyor.

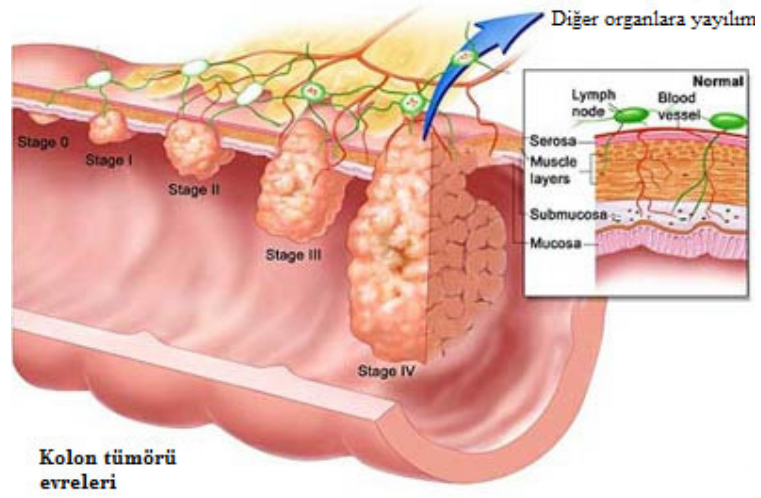
M0 Uzak metastaz yok.

M1 Uzak metastaz var.

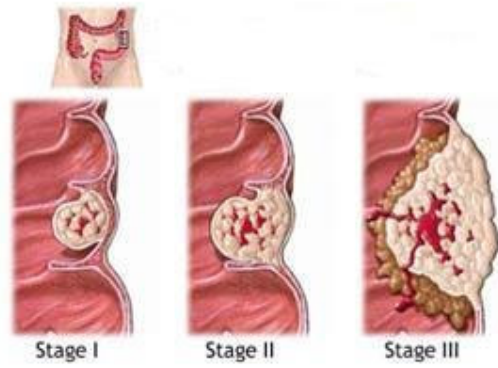
**Tablo 1: Kolorektal kanserde TNM Evrelemesi**

Evre	Primer tümör	Lenf nodu tutulumu	Uzak metastaz
Evre 1	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Evre 2	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
Evre 3	Herhangi T	N1	M0
	Herhangi T	N2, N3	M0
Evre 4	Herhangi T	Herhangi N	M1

TNM sistemi daha ayrıntılı patolojik bilgi sağlar ve kolaylıkla daha basit olan Duker sistemine çevrilebilir. Evre 1 Duker evre A ile, Evre 2 Duker evre B ile, Evre 3 Duker evre C ile ve Evre 4 ise Duker evre 4 ile denktir.



**Şekil 5. Kolorektal kanserde evreler**



**Şekil 6. Kolorektal kanserde tümörün kolon duvarında yayılımı**

Beş yıllık sağ kalım oranı hastalık evreleğirmesinin prognostik önemini açıkça ortaya koymaktadır. En iyi sağ kalım evre 1 dedir, hastaların %90 dan fazlası 5 yıl yaşar. Evre 2 de bu rakam %60-80 arasına kadar düşer. Lenf bezi metastazı olanlarda (Evre 3) beş yıllık sağkalım oranı %20-50 arasındır.

Dukes A'da 5 yıllık sağkalım oranı %80, B1-2'de %50-60, C1-2'de %15-30, D'de %5'in altındadır (16).

Olumsuz prognostik etkisi olan diğer faktörler; tümörün kötü histolojik farklılaşma göstermesi (müsin üreten tümörler ile taşlı yüzük hücreli tümörlerde prognoz kötüdür) , kanserin venöz ve perinöral invazyonu, barsak perforasyonu, yüksek CEA ve anöplid nükleustur.

### 2.1.6 TANI

Hikaye, fizik muayene ve tanısal testlerle tanıya gidilir. Özellikle aile hikayesi, kanama, dışkılama alışkanlığındaki değişiklikler ve kilo kaybı sorgulanmalıdır.

Kolorektal kanserlerde semptom ve bulgular tümörün lokalizasyonu, makroskopik yapısı, tümörün yayılım derecesi ve kanama, perforasyon ve tıkanma gibi komplikasyonların oluşumuna göre değişir.

Sağ kolon kanserlerinde karın ağrısı, dispeptik yakınmalar, halsizlik ve karın sağ alt kısmında palpabl kitle en sık görülen yakınmalardır. Nedeni açıklanamayan anemi ve hızlı kilo kaybı varlığında sağ kolon tümörü mutlaka akla gelmelidir. Gözle görülür kanama nadiren görülür. Dispeptik yakınmalar ve sağ alt kadran ağrısı sıklıkla duodenum ve safra kesesi hastalıklarıyla karıştırılabilir. Sağ kolonun çapının sol kolonun yaklaşık iki katından fazla olması, bu bölümdeki dışkının daha sıvı olması ve bu bölgenin tümörlerinin daha çok ülseröz ve vejetan tipte olması nedeniyle sağ kolon kanserlerinde tıkanma nadiren görülür. Bu nedenle tümör belli bir çapa ulaşmadan tanı genellikle konulamaz. Kolorektal kanserlerde hastanın yakınmalarının başlangıcı ile definitif tedavi arasındaki süre ortalama 7-9 ay olup , bu gecikmeden doktorlar en az hastalar kadar sorumludur (13,14).

Sol kolon kanserlerinde bu bölgede kolon çapının daha dar olması, dışkının daha kıvamlı olması ve bu bölümde yerleşen tümörlerin daha çok daraltıcı tipte olması nedeniyle temel yakınmalar dışkılama ile ilgili değişikliklerdir. Dışkılama güçlüğü, dışkı çapında incelme, kabızlık veya veya kabızlık sürecini takip eden ishal (Koenig sendromu), distansiyon, kolik tarzda ağrılar ve dışkıya bulaşmış rektal kanama en sık görülen yakınmalardır. Kanama sık olmakla birlikte nadiren masiftir. Sadece kanamanın rengine bakarak yer tahmininde bulunmak doğru değildir. Kısmi ya da tam obstrüksiyon gelişebilir.



Rektum kanserlerinde ana semptom rektal kanamadır. Kanama dışkıyla karışık dışkının üzerine sürülmüş veya dışkı öncesinde olabilir. Sık görülen diğer bulgular kabızlık, karın ağrısı ve boşalamama hissidir. Rektum kanserli hastalarda en sık yapılan hata bu hastalarda rastlantısal olarak bulunan hemoroidlerin hastadaki yakınmaları oluşturduğunu düşünerek rektum kanserinin araştırılmamasıdır. Birçok hasta için anorektal bölgeyle ilgili yakınmaların nedeni hemoroidleridir. En fazla tanı hatalarının rektal kanaması olup muayenede hemoroid veya diğer selim anal bölge hastalıkları saptanan kolorektal kanser hastalarında yapıldığı unutulmamalıdır. Bazen de komplikasyonlar hastalığın ilk bulgularını oluşturur:

1. Perforasyon: Bazen gelişen nekroz nedeniyle tümörün olduğu yerden ve bazen de tıkanıklığa bağlı olarak çekum veya sağ kolondan perforasyon oluşabilir.
2. İleus: En sık görülen komplikasyon olup tümörün lümeni tıkamasına bağlı olarak oluşur.
3. Fistül oluşumu: Mesane, mide ve vajenle tümörlü barsak kısmı arasında fistül oluşursa buna ait yakınmalar oluşabilir.

### **2.1.6.1 FİZİK MUAYENE**

Hastalığın lokal yayılım derecesi ve varsa uzak yayılım bulguları araştırılmalıdır. Karın muayenesinde ve rektal tuşede kitle varlığı araştırılmalıdır. Ayrıntılı anorektal muayene yapılmalıdır. İncelemede apse, sinüs, condylom, eksternal hemoroid, dermatit ve cilt lezyonlarının varlığı araştırılmalı, anal kanal parmakla hafifçe aralanarak prolapsus, anal fissür, hipertrofik anal papilla, skin tag, internal prolabe hemoroidler varsa not edilmelidir. Daha sonra anal kanal ve rektumun parmakla muayenesi yapılmalıdır.

### **2.1.6.2 İNCELEME YÖNTEMLERİ**

En sık başvuru yöntemleri kolon grafisi, sigmoidoskopi, kolonoskopi, transrektal ultrasonografi ve CT'dir. Kolon grafileri kolorektal kanserlerin tanısında son derece değerli bilgiler sunar. Ancak yalnız başına tarama için kullanılmamalıdır. CT ile primer tümör saptanabilir ve primer tümör ile tümörün duvardışı yayılımı

gösterilebilir. Ancak tanı amaçlı ilk kullanılacak yöntem CT olmamalıdır. Transrektal ultrasonografi preoperatif evrelemede kullanılan bir diğer yöntemdir.

**Sigmoidoskopi:** Kolorektal kanserlerin yaklaşık 2/3'ü 60 cm'lik sigmoidoskop ile ulaşılabilecek bölgededir. Kalın barsağın distal bölümlerinden kaynaklandığı düşünülen patolojilerin saptanmasında ve özellikle asemptomatik hastalarda tarama amacıyla kullanılabilir. Gizli veya belirgin kanama varlığında kolonoskopi tercih edilmelidir.

Kolonoskopi kaynağı bulunamayan kanamalarda, kolon grafisinde anormal bulgular saptandığında, sigmoidoskopide polip saptandığında, inflamatuvar barsak hastalıklarında ve daha önceden polip veya kolorektal kanseri bulunan hastalarda tanı amaçlı olarak yapılabilir. Bunun yanısıra; kolonoskopi tedavi amacıyla polipektomide, kanama kontrolünde, yabancı cisimlerin çıkarılmasında, psödoobstrüksiyonun dekompresyonunda, sigmoid volvulusun detorsiyonunda, striktürlerin dilatasyonunda, tümörlerin fulgurasyonunda kullanılabilir. Günümüzde rektal kanamalarda artan bir oranda kolonoskopi tercih edilmektedir. İşlem biopsi yapılmasına olanak sağlamasının yanısıra, senkron lezyonların gözden geçirilmesine ve ameliyat seçeneklerinin değerlendirilmesine olanak sağlar. Kolonoskopi tamamlanırsa kolon grafisine gerek yoktur. Önceden hastaya kolon grafisi çekilmiş olsa bile kolon grafisiyle 5 mm'den küçük poliplerin (Dimunitif polip) %20'sinin gözden kaçırılacağı düşünüldükçe kolonoskopi yapılmalıdır (13).

Polipektomi sonrası polipin bir bölümünde kanser saptanan hastalarda aşağıdaki şartlara uyan poliplerde polipektomi yeterli sayılır.

1. Polip saphıysa
2. İyi veya orta diferansiye ise
3. Venöz veya lenfatik invazyon yoksa
4. Rezeksiyon sınırları negatifse
5. Kanser muskularis mukozada sınırlı ve polipin baş veya boynunda ise polipektomi yeterlidir.

Aksi durumlarda hastalar ameliyat edilerek rezeksiyon yapılır.

### **2.1.6.3 LABORATUAR**

Laboratuar testerinin hiçbirisi kolorektal kanserlere spesifik değildir. Dışkıda gizli kan tanı ve tarama amaçlı kullanılabilir. CEA kolorektal kanser hastaların yanı sıra mide, pankreas, meme, akciğer, prostat, over, safra yolları ve uterus gibi çeşitli organların selim ve habis durumlarında artabilir. Bu nedenle erken tanıdan daha çok takipte kullanılmalıdır.

### **2.1.6.4 AYIRICI TANI**

Sağ kolon tümörlerinde apandisit, ileoçekal tüberküloz, çekum aktinomikozu, hematolojik hastalıklar, lenfoma, Crohn hastalığı, safra kesesi ve duodenum hastalıkları; sol kolon tümörlerinde divertikül, ülseratif kolit ve iskemik kolit ve rektum tümörlerinde anorektal bölgenin tüm hastalıkları düşünülmelidir.

### **2.1.7 TANIDA GECİKME**

Kolorektal kanserlerde tanısal gecikme hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemesinin yanısıra yaşam süresini de kısaltmaktadır. Gecikme nedenleri hastayla ve doktorla ilgili olarak ikiye ayrılır.

1. Hastaya ait nedenler: Hastalar ilk bulgular ortaya çıktıktan sonra doktora başvurularını başta korku ve cehalet olmak üzere çeşitli nedenlerle geciktirmektedirler. Kolorektal kanserli 299 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada hastaların yaklaşık %95'inin ya semptomlarla kolorektal kanserin ilişkili olabileceğini düşünmediği, ya semptomları ciddiye almadığı ya da semptomları diyetsel faktörlere bağladığı, sadece %5 hastanın kanser olabileceğini düşündüğü saptanmıştır (15).

2. Doktora bağlı gecikmeler: İngiltere'de hastanın pratisyen hekimden cerraha gönderilinceye kadar geçen süre ortalama 14 hafta olarak bulunmuştur (12). Bu gecikmede en önemli faktörlerin biri rektal tuşenin yapılmaması ya da doğru olarak değerlendirilememesidir. Tabiki bu noktada kolorektal kanserlerin yaklaşık %45'inin rektumda bulunduğu ve bunların da ancak yarısının tuşede parmak mesafesinde

olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle rektal tuşenin negatif olması doktora aşırı bir güvenlik duygusu vermemelidir. Bir diğer gecikme nedeni hastanın bir başka hastalık nedeniyle uzun süre tedavi edilmesidir. Bu tür hastalara en iyi örnek sağ kolon kanseri nedeniyle halsizlik ve anemisi olan hastaların uzun süre hematolojik bozukluk olarak takip edilmeleridir.

### **2.1.8 TARAMA**

Herkesin üzerinde anlaştığı bir tarama programı yoktur. Son zamanlarda daha ağırlık kazanan düşünce hastaların risk faktörlerine göre sınıflandırılmasıdır (12).

Düşük riskli hastalar: Tarama 50 yaşından başlanarak aşağıdaki beş şekilde yapılabilir;

1. Yıllık dışkı gizli kan tahlili: Hasta arka arkaya yaptığı üç dışkılamanın her birinden ikişer örnek verir. Eğer herhangi biri pozitif bulunursa kolonoskopi ya da kolon grafisi ile birlikte sigmoidoskopi yapılır.
2. Her 5 yılda bir sigmoidoskopi
3. Her 5 yılda bir sigmoidoskopi ve yıllık gizli kan
4. 10 yılda bir kolon grafisi (tercihen sigmoidoskopi ile birlikte)
5. Her 10 yılda bir kolonoskopi

Yüksek riskli hastalar:

- a. Birinci derece akrabalarında kolorektal kanser bulunanlar, risksiz hastalar gibi takip edilir, ancak takip 50 yaş yerine 40 yaşında başlar.
- b. Daha önce adenomatöz polip nedeniyle polipektomi yapılan hastalara 3 yıl sonra kolonoskopi yapılır. Normalse hasta 5 yıl sonra kontrole çağrılır.
- c. FAP ailesindeki bireylerde FAP geni varlığı genetik testlerle araştırılır. 18 yaşından başlanarak her yıl fleksible sigmoidoskopi yapılır.
- d. HNPCC'de kesinleşmiş bir takip protokolü yoktur. Ya 18 yaşından başlanarak 1-2 yıl arayla kolonoskopi yapılır ya da 40 yaşından sonra yılda bir kolonoskopi yapılır.
- e. İnflamatuvar barsak hastalıklarında pankolit varsa hastalığın başlangıcından 8 yıl sonra kolonoskopi yapılır. Hastalık sadece sol kolonu tutuyorsa başlangıçtan 15 yıl sonra kolonoskopi yapılır.

## 2.1.9 TEDAVİ

Kolorektal kanserlerin tedavisi öncelikle cerrahidir. Kemoterapi ve radyoterapi diğer tedavi yöntemleridir. Bazı durumlar dışında tedavide ana amaç primer tümörün bölgesel lenf bezleriyle birlikte geniş olarak çıkarılmasıdır. Tümörün ince barsak, mide, mesane, uterus, vagina gibi organlara invazyonu rezeksiyon kararını değiştirmez. Uzak metastaz varlığında bile primer tümör çıkarılabilirse rezeksiyon yapılmalıdır. Tedavi tümörün lokalizasyonuna göre değişir.

Çekum ve çıkan kolon kanserleri: Sağ hemikolektomi yapılır.

Transvers kolon kanserleri: Genişletilmiş sağ hemikolektomi, genişletilmiş sol hemikolektomi veya transvers kolektomi yapılır.

Splenik fleksura ve inen kolon kanserleri: Sol hemikolektomi yapılır.

Sigmoid kolon: Sigmoid kolektomi veya sol hemikolektomi yapılır.

Rektum kanseri: Rektum kanserlerinde tedavi tümörün dentate lineden uzaklığı, evresi ve yayılım derecesi başta olmak üzere hastanın yaşı, genel durumu, vücut yapısı ve diferansiyasyon derecesine göre değişir.

Tedavi seçenekleri:

1. Low anterior rezeksiyon
2. Abdominoperineal rezeksiyon
3. Lokal eksizyon (Transanal eksizyon, transanal endoskopik mikrocerrahi, endokaviter radyasyon)
4. Fulgurasyon
5. Laser fotokoagülasyon
6. Kolostomi

Temel amaç tümörün sağlam sınırlarla çıkartılmasıdır. En fazla tartışma rektum kanserlerinde tedavi seçenekleri üzerine yoğunlaşmıştır. Sonuçta APR veya low anterior rezeksiyonun her ikisinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuçlar üzerine en etkili faktörler; uygulanan teknik ve cerrahın deneyimi olarak bulunmuştur (16,17). Diğer faktörler perforasyon oluşumu, obstrüksiyon, diferansiyasyon derecesi, lenfatik invazyon, perinöral invazyon varlığı, CEA yüksekliği, DNA anoploididir.

Komplikasyonlarda tedavi: Barsak tıkanıklığı veya perforasyon gibi acil durumlarda ayrıntılı testlerle ameliyat geciktirilmemelidir. Sağ veya sol tıkanmalarda rezeksiyon yapılmalı ve hastanın durumu izin veriyorsa anastomoz yapılmalıdır. Perforasyonlarda rezeksiyon + proksimal uç kolostomi + distal ucun kapatımı veya eksteriorizasyonu tercih edilebilir.

Nüks olgularda tedavi: Seçilmiş hastalarda cerrahi yararlı olabilir . Kemoterapi ve radyoterapi diğer seçeneklerdir..

Laparoskopi: Kolorektal kanserlerin tedavisinde laparoskopinin yeri tartışmalıdır (18).

## 2.2 TÜMÖR ANJİOGENEZİ

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiogenez, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilir.

Fizyolojik anjiogenez; embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde gözlenir. Proanjiojenik ve anti-anjiogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiogenez kontrol edilemez. İnflamatuvar hastalıklarda (artrit, kronik inflamasyon, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, psöriazis), çeşitli kanserlerde (meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom) ve göz hastalıklarında (yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, proliferatif retinopati) anjiogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır. Periferik arter hastalıklarında ve gecikmiş yara iyileşmesinde ise anjiogenezin yetersizliği söz konusu olmaktadır.

Anjiogenezin düzenlenme evreleri, pek çok büyüme faktörünün ve düzenleyici proteinin kontrolü altındadır. Henüz tüm anjiogenik etkileşimlerin niteliği açıklığa kavuşmamıştır. Yalnız şurası bir gerçektir ki, anjiogenik uyarıcılar ve anjiogenez inhibitörleri arasında var olan denge, normalde damarsal bileşenlerin sessiz (inert) halde kalmalarını sağlamaktadır. Anjiogenik uyarıların artışı ve anjiogenez inhibitörlerinin azalışı anjiogenezi başlatmaktadır. Anjiogenik ve antianjiogenik faktörler Tablo 2’de gösterilmektedir.

**Tablo 2. Anjiogenik faktörler ve anjiogenezi önleyen faktörler**

<b>Anjiogenik Faktörler</b>	<b>Anjiogenezi Önleyen Faktörler</b>
VEGF	Trombospondin- 1
PlGF (Plasental büyüme faktörü)	Anjiostatin
FGF (Fibroblast büyüme faktörü)	Endostatin
FGF-3 (Fibroblast büyüme faktör-3)	Vazostatin
FGF-4 (Fibroblast büyüme faktör-4)	VEGF inhibitörü
TGF- $\alpha$ (Transforme edici büyüme faktör- $\alpha$ )	Trombosit faktör-4 fragmanı
TGF- $\beta$ (Transforme edici büyüme faktör- $\beta$ )	Prolaktin derivesi
EGF (Epidermal büyüme faktör)	Restin
HGF (Hepatosit büyüme faktör)	Proliferinle ilgili protein
TNF- $\alpha$ (Tümör nekroz faktör- $\alpha$ )	İnterferon- $\alpha$ - $\beta$
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktör)	Anjiopoetin-2
GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)	Antitrombin-3 fragmanı
IL- 8 (İnterlökin-8)	İnterferon ile indüklenen protein 10

Yeni damar oluşumu, aşağıda belirtilen olayları kapsayan çok basamaklı bir süreçtir:

- a.** Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması
- b.** Endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü
- c.** Tübül oluşumu ve olgunlaşması, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi

**a. Bazal Membranın Proteolitik Enzimler Tarafından Yıkılması**

Anjiogenezi süreci damar endotelini döşeyen kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparan sülfat gibi proteoglikanlardan oluşan bazal membranın

proteolitik yıkımı ile başlar. Endotel hücreleri göç etmek ve çoğalmak üzere uyarıldığında membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelir. Normalde, endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka oluştururlar. Ancak anjiyogenez sırasında çoğalıp yayılma gösterirler. Normal, hastalıklı yada hasarlı dokularda üretilip salgılanan anjiogenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yolu ile geçer. Anjiogenik büyüme faktörleri, yakınındaki önceden var olan kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanırlar. Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin yıkımına neden olur. ECM'nin enzimatik yıkılımını, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme izler. Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçleri, plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metalloproteinaz (MMP) sisteminin işbirliği içinde aktive olmasını gerektirir.

#### **b. Endotel Hücrelerde Göçme ve Çoğalma**

Anjiogenik uyarı, proteolitik yıkım ile kısa bir süre sonra endotel hücrelerini aktive eder. Endotel hücreleri ekstraselüler matrikse göç eder ve çoğalır. Bu süreçte en etkili anjiogenik faktör VEGF'dir (19).

#### **c. Kapiller Oluşumu ve Damar Olgunlaşması**

Endotel hücre çoğalmasından sonra ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler proteolizin mutlaka lokal olarak inhibe edilmesi gerekir. Kapiller filizlenme oluşuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve bu sayede daha ileri yayılımı mümkün olur. Bazal membranın yıkılması endotel hücre göçüne ve filiz oluşumuna izin verir. Endotelin yol alması ve uzaması sırasında hücre içi ve hücreler arası boşlukta, sonunda kendilerinden damarların olduğu lümenler gelişir. Böylece, ekstraselüler matriks proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapillerler oluşur. Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membranı oluştururlar. Bu nedenle, endotel hücrelerinin yeni kapiller yapılar oluşturabilmeleri için birbirlerine ve ECM'e tutunma gereksinimi vardır. Damar olgunlaştıktan ve uygun anjiogenez ortaya çıktıktan sonra anjiogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Böylece denge oluşarak endotel hücreleri sessiz bir hale bürünür ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur .



Anjiogenez kavramının tarihçesine bakıldığında yaklaşık 100 yıl önce tümör içerisinde yeni damar gelişimlerinden bahsedildiği görülmektedir. Ancak bu dönemde tümör hiperemisi olarak adlandırılan bu durumun, tümör metabolitlerine bağlı basit bir dilatasyon olduğu düşünülmüştür. Daha sonraki dönemde, tümörün mevcut damarlarla mı beslendiği yoksa yeniden damarlanmanın mı olduğu tartışılmış, yeniden damarlanmayı kabul edenler bile bunun tümör gelişimi için gerekli olmadığını, basit bir reaksiyon olduğunu ileri sürmüşlerdir. 1939 yılında tavşanlarda yapılan bir araştırmada, yaralanma sonucunda oluşan yeniden damarlanmanın zamanla durduğu ve gerilediği, ancak bu yaraya tümör implantı yapıldığında tümör implantında damar gelişiminin giderek arttığı fark edilmiştir (20). 1945 yılında yapılan bir çalışmada ise, tümör implantındaki yeni damarların konakçı damarlardan köken aldığı belirtilmiştir (21). 1971 yılında Folkman "tümör gelişimi anjiogeneze bağımlıdır" diyerek anjiogenez konusunda asıl gelişimi başlatmıştır (22). 1980'li yılların ortalarında, bir araya getirilen bulgular gerçekten de tümörlerin anjiogenezi uyardığını kanıtlamıştır (23). Tümörün büyüklüğü  $0,5 \text{ mm}^3$ 'ün üstüne çıkınca tümörün beslenmesi anjiogeneze bağımlı iken,  $0,5 \text{ mm}^3$ 'den daha küçük bir tümör, oksijen ve gıdayı difüzyon ile alabilmektedir (24).

Tümörün büyümesi sırasında mikrodamarlar, tümöre besin, oksijen ve büyüme faktörleri sağlamak amacıyla sayıca büyük oranda artış gösterirler. Tümör anjiogenezinin düzenlenmesi normal fizyolojik anjiogeneze göre farklılık göstermektedir. Uyarıcılar ve inhibe ediciler arasındaki dinamik denge bozulmakta, bu dengenin bozulmasında ise tümör ve endotel hücreleri temel bir rol oynamaktadırlar. Bir yada birden fazla anjiogenik büyüme faktörü belirgin olarak aşırı eksprese olmadıkça, tümör büyümesinin olmayacağı gösterilmiştir (25,26). Anjiogenezi uyarmak için yalnızca anjiogenik faktörlerin artması yeterli olmayıp, tümörün anjiogenik özellik kazanması için anjiogenez inhibitörlerinin de azalması gereklidir (25,26).

Anjiogenezin tümörün yayılmasındaki rolünün yanı sıra metastazı kolaylaştırdığı varsayımını destekleyici, deneysel ve klinik kanıtlar bulunmaktadır (26,27). Bir tümör hücresi metastaz yapabilmek için, damar sistemine girmek, dolaşımında canlı kalabilmek, damar sisteminden dışarı çıkabilmek, hedef organda büyüebilmek ve anjiogenezi uyarmak gibi çeşitli bariyerleri aşabilmelidir. Deneysel çalışmalarda,

yeniden damarlanmadan önce, tümör hücrelerinin nadiren dolaşıma girdikleri gösterilmiştir. Tümör hücresi anjiogenik iken metastaz yaparsa, saptanabilir tümör oluşturma ihtimali daha fazladır. Metastatik kaskadın başında olduğu kadar sonunda da anjiogeneze ihtiyaç vardır. Tümör hücresi başarıyla metastaz yapmış olsa bile hedef organda hemen damarlanmayabilir ve mikroskobik düzeyde kalabilir. Klinik veriler metastatik özelliğin anjiogenezin şiddetine bağlı olduğunu göstermektedir (28,29).

### 2.3- NO•

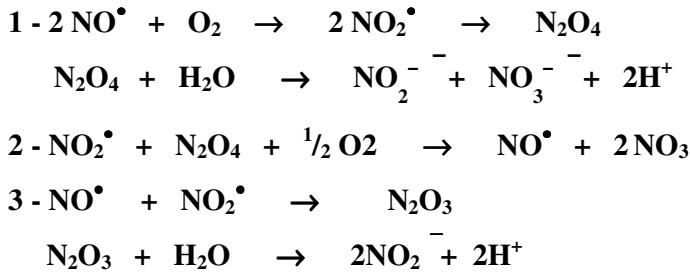
1980 yılında Furchgott ve Zawadski asetil kolin uyarısıyla endotel hücrelerince yapılan damar düz kasını gevşetici bir madde bildirdiler. Bu maddeye endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) adı verildi. 1987 yılında Palmer ve arkadaşları EDRF'nin bilinen biyolojik etkilerinde nitrik oksit (NO•) adlı bir gazın sorumlu olduğunu buldular (53-56).

NO•; suda ve yağda çözünebilir, kolaylıkla nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve nitrata (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) okside olabilen renksiz, stabl bir gazdır. Nitrojenin son yöründesindeki beş ve oksijenin son yörüngesindeki altı elektronun kovalent olarak katkısıyla oluşan yüksüz ve radikal özellikteki NO• molekülü üzerinde ortaklaşmamış bir adet elektron taşır. Bu elektron rezonans halindedir ve hem N (azot) hem de O (oksijen) atomuna aittir, bu özellik NO• molekülünün paramagnetik özellikli, yüksek reaktiviteye sahip bir radikal olmasına neden olur. NO•, üzerinde yük taşıyamaması nedeniyle, eğer hemen oksidoredüksiyona uğramazsa, hücreden hücreye hiçbir engelle karşılaşmadan kolaylıkla geçebilmektedir. Belli konsantrasyonları aştığında son derece toksik ve renksiz bir gazdır. Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO•, bilinen en düşük molekül ağırlıklı biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür. Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir.

İnsan organizmasının normal fizyolojisinde NO• molekülü, moleküler oksijen ve 4 tane kofaktör varlığında, L-argininin L-sitrüline dönüştürülmesi esnasında ürün olarak oluşur. Bu reaksiyon sitokrom p450 redüktaz homologu olan nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi ile katalizlenir ve ko-substrat olarak nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve oksijen kullanılır.

Kofaktörler ise; Hem, flavin amid adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>)'dir.

Atmosferdeki bakteriler, asit yağmurları, jetler, baca gazları, egzoz gazları ve tüten sigaralar, NO<sup>•</sup> ve diğer reaktif oksijen türlerini üreterek hava kirliliğine neden olabilirler. NO<sup>•</sup>'nun yukarıdaki açık formülünde görülen çiftlenmemiş elektronu, azot ve oksijen atomları üzerinde yer değiştirerek "**rezonans stabilitesi**" sağlar. NO<sup>•</sup> elektriksel olarak yüksüz olduğundan, reseptöre bağımlı olmayan yollarla kolayca membranlardan diffüze olabilir. Tüm bu özellikleri NO' ya ideal bir haberci molekül özelliği kazandırmaktadır. NO<sup>•</sup>, su ve oksijen varlığında, 3 – 20 saniye gibi çok kısa bir yarı ömre sahiptir; kolayca oksitlenir. Böyle bir ortamda NO<sup>•</sup>, aşağıdaki reaksiyonlarda ve tablo 3'de gösterildiği şekilde bir dizi nitrojen oksitlerine (NO<sub>x</sub>) dönüşebilir.



**Tablo 3- Nitrojen oksitleri (NO<sub>x</sub>)**

Sembol	İsim	Etki
NO <sup>•</sup>	Nitrik oksit	Serbest radikal
NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Nitrojen dioksit	Serbest radikal, Nitroze edici ajan
N <sub>2</sub> O	Nitröz oksit	Anestezik
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Dinitrojen trioksit	Nitroze edici ajan
N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Dinitrojen tetraoksit	Dimerik NO <sub>2</sub> <sup>•</sup> , nitroze edici ajan
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit	Asidik ortamda NO <sup>•</sup> oluşturur
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat	Stabil anyon

### 2.3.1- NO•'nun Etki Mekanizması

Hücrelerarası iletişimi sağlayan moleküller (hormonlar, nörotransmitterler, büyüme faktörleri vb.) bu etkilerini daha çok plazma membranındaki spesifik proteinlere bağlanıp, hücre içi cAMP miktarını artırarak gerçekleştirirler. Buna karşın NO•, üretildiği hücreden dışarı çıkarak, direkt hedef hücresi içine girer, hedef molekülüne bağlanır ve direkt yada enzim aktivitesini değiştirerek amaçlanan etkiyi oluşturur. NO•'nun karakterize edilmiş en önemli hedef molekülleri; Demir, kükürt ve oksijen türevi yapılarıdır. Makrofajlardaki NO•, tümör hücresi ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrolayarak antimikrobiyal ve antitümöral sitotoksik etki gösterir. Aynı mekanizmayla MET (mitokondriyal elektron transport) zinciri enzimlerinin aktivitesini azaltır. Yine NO•, tümör hücresindeki ribonükleotid redüktaz'ı inhibe ederek DNA sentezini engeller. NO• ferritinle reaksiyona girerek serbest demir salınımına yol açabilir, bu serbest demir de lipid peroksidasyonunu başlatabilir.

NO•'nun bir diğer hedefi sülfhidril (-S-H) gurubudur; S-H ile reaksiyona girerek S- nitrozilasyon yapabilir ve plazminojen aktivatörü gibi bazı enzimlerin katalitik fonksiyonlarını artırabilir. NO'nun önemli bir hedefi de süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ) molekülüdür. Bu ikisinin tepkimesiyle oluşan peroksinitrit ( $ONOO^-$ )'ten, nitrojen dioksit ( $NO_2^-$ ) ve hidroksil ( $OH^\bullet$ ) radikali oluşabilir. Peroksinitrit şekillenmesi ve aktivitesi, nitrotirozin residüleri'nin imminohistokimyasal olarak lokalizasyonlarının araştırılmasıyla takip edilebilir. Yapılan bazı araştırmalara göre peroksinitrit; aterosklerozis gelişmesindeki başlangıç oksidan moleküllerdendir ve aterom plakları çevresinde nitrotirozinin artan immün reaktivitesi mevcuttur (58). Yapılan immünhistokimyasal araştırmalarda nitrotirozinin özellikle; villusların vasküler endotelyumunda, vasküler düz kasların etrafında ve villöz stromada yoğunlaştığı bildirilmiştir (59).

NO• sentezlenmesini sağlayan NOS enzimi iki ana formda incelenmektedir. Üretilen NO•'nun fonksiyonu bu enzim türleri ile de bağlantılıdır.

### 2.3.2- NOS izoenzimleri

NOS temel olarak iki ana grupta incelenir.

#### 2.3.2.1- Yapısal (Constitutive) NOS (cNOS):

Bu izoformun ayırıcı özelliği, aktivitesinin  $Ca^{++}$ 'ya (ikincil haberci) bağımlı olmasıdır. İnsan vücudunda tespit edildikleri başlıca dokular şunlardır: damar endotel hücreleri, ürogenital sistem dokuları, santral ve periferik sinir sistemi nöronları, adrenal korteks ve medulla hücreleri, trombositler ve barsak interstiyumu. Hücre içi iyonize kalsiyumu artıran her türlü etkileşimde, kalsiyumun kalmoduline bağlanmasıyla oluşan kompleks ( $Ca^{++}$ /kalmodulin), cNOS'un aktifleşmesini sağlar ve  $NO^{\bullet}$  sentezlenir. Ancak kalsiyumu arttıran uyarı kesilince, hücre içi  $Ca^{++}$  da azalmaya başlar ve enzim aktivitesi ortadan kalkarak  $NO^{\bullet}$  sentezi durur. Bu yüzden bu izoform, normal biyolojik sistemlerde düşük miktarlarda  $NO^{\bullet}$  sentezler. cNOS ilgili hücrelerde daima mevcuttur fakat  $Ca^{++}$  düzeyi yükselinceye kadar inaktif durumdadır.

Yapısal NOS (cNOS) izoformları'nda kendi arasında iki kısımda incelenmektedir; Bunlar nNOS (nöronal) ve eNOS (endotelial)'tur.

**2.3.2.1.1- nNOS kaynaklı  $NO^{\bullet}$ 'nun bulunduğu yerler ve bilinen fonksiyonları:**  
Esas olarak sinir sisteminde bulunmakla beraber başka dokularda da tesbit edilmiştir.

**a) Merkezi sinir sistemi;**

- Nörotransmitter/nöromodulator olarak görev yapar. Bilinen en düşük molekül ağırlıklı organik nörotransmitterdir. Presinaptik uçtan salgılanan glutamat'ın etkisiyle (glutamat NMDA reseptörlerine bağlanır), postsinaptik uçtaki hücrenin NOS'u aktifleştirilir ve buradan sentezlenen  $NO^{\bullet}$  hedeflenen etkisini oluşturur.
- Sinapsların şekillenmesine yardımcı olur.
- Koku alma, görme, ağrıyı algılama, ve hafıza oluşması işlevlerinde rol oynar.

**b) Periferik sinir sistemi;**

- Nonadrenerjik nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak rol oynar.
- Solunum fonksiyonlarında, penil ereksiyonda, gastrointestinal sistem motilitesinde, mesane sfinkter işlevinde ve tüm bu organların kan basıncı ve akış hızının düzenlenmesinde rol alır.

**2.3.2.1.2- eNOS kaynaklı  $NO^{\bullet}$ 'nun sentezlendiği yerler ve bilinen fonksiyonları:**

- Düz kasları gevşeterek, kan basıncı ve akış hızını (dolayısıyla kalp kasılmasını) regüle eder.
- Trombositlerin, adezyon ve agregasyonlarını inhibe eder.
- Antiproliferatif etkisi vardır (endotel hücresi ve vasküler düz kas hücresinde).

### 2.3.2.2– Uyarılabilir (inducible) NOS (iNOS):

İlk olarak endotoksin ve sitokinler tarafından uyarılan makrofaj ve karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. Bu izoform aktivite için  $Ca^{++}$ 'a bağımlı değildir. Bunun nedeni enzimin kalmodulinle çok sıkı bağlanmış olması olabilir. Fakat, kalmodulinin buradaki rolü bilinmemektedir. iNOS başta makrofajlar (monosit, histiyosit, kupfer hücreleri vs.) olmak üzere polimorfonükleer lökositler, hepatositler, damar düz kası, damar endoteli, astrosit ve kondrositler tarafından üretilebilir. Enzim indüklendiği zaman  $NO^{\bullet}$  üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Özellikle non-spesifik immünitede önemli rol oynar. Bakteri, mantar, virüs, tümör hücreleri ve protozoonlara sitotoksik veya sitostatik etki oluşturur. İnflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda da rol oynadığı bildirilmiştir (57). iNOS hücre içinde genel yapıda mevcut değildir. Ancak bakteriyel ürünler ve sitokinler ile teması takiben, birçok doku ve hücre tipinde üretimi uyarılarak (transkripsiyonel indüksiyon: mRNA artışı) miktarı artırılır. cNOS ile iNOS'un özellikleri ve bazı önemli farklılıkları, tablo 4'de özetlenmiştir.

**Tablo 4- cNOS ile iNOS arasındaki farklılıklar**

Özellik	cNOS	iNOS
$Ca^{++}$ bağımlılığı	Var	Yok
$NO$ oluşum düzeyi	Pikomol	Nanomol
Uyarana yanıt	Ani	Geç
$NO$ üretim süresi	Kısa	Uzun
Glukokortikoidlerin etkisi	Etkilenmez	Uyarılması inhibe edilir

$NO^{\bullet}$ , fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda rol alan vazoregülasyon yapan ve hücrel toksisiteyi gösteren bir biyoregülatör moleküldür . Bunun yanı sıra damar

basıncının ayarlanmasından ve kan hücreleriyle endotel arasındaki etkileşimin düzenlenmesinden sorumludur .

#### 2.4- ET

İlk olarak 1988’de Nature dergisinde Yanagisawa ve ekibi tarafından ayrıntılı bir şekilde tanımlanan endotelinler bilim dünyasında büyük ilgi uyandırmıştır (38). Şu ana kadar bilinen en güçlü vazokonstriktör peptid olan endotelin-1 (ET-1) ilk kez kültürdeki domuz aortası endotel hücrelerinden elde edilmiştir (38,39). Ana endotelin kabul edilen ET-1 ile aynı peptid grubunda yer alan diğer endotelinler ise endotelin-2 (ET-2), endotelin-3 (ET-3) ve fare barsağından izole edilen endotelin- $\beta$  ya da diğer adıyla vazoaktif intestinal konstriktördür.

Tüm endotelinlerin genleri farklı doku ekspresyonuna sahiptir: ET-1 primer olarak endotel hücrelerinden, ET-2 böbrek ve intestinal epitelden ve ET-3 beyinden eksprese edilir. Fakat endotelinler ve reseptörleri, monositler ve makrofajlar gibi hareketli inflamatuvar hücrelerden de salgılanır. Bu hücrelerde nispeten daha düşük seviyelerde endotelin sentezi olur, fakat bu hücrelerdeki ET genleri hipoksi veya sitokinlerin salınımı gibi inflamatuvar stimuluslarda kolayca indüklenebilir.

Endotel hücresinde endotelinlere ait sekretuar granüllerin bulunmayışı, bunların hücre içinde depo edilmediğini çeşitli kimyasal ve mekanik uyarılara yanıt olarak hızla sentezlenip sekrete edildiklerini göstermektedir. Bu uyarılar arasında trombin, TGF- $\beta$ , interlökin-1 (IL-1) ve TNF gibi sitokinler, epinefrin, norepinefrin, anjiyotensin II, vazopressin, forbol esteri, kalsiyum ve kalsiyum iyonoforları (A 23187 ve iyonomisin), endotoksin, insulin ve hipoksi yer alır.

ET-1 sentezini inhibe eden maddeler arasında ise atrial natriüretik peptid (ANP), prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) ve NO<sup>•</sup> gibi vazodilatatörler, ET-3 ve vasküler düz kas hücresi kaynaklı inhibitör faktörler sayılabilir.

Normalde dolaşımdaki ET düzeyi çok düşük olup 0,3-3 pg/mL olarak verilmektedir. Plazma ET düzeylerinin aşırı artışını engelleyen ajanlar arasında en önemlileri olan ANP ve NO<sup>•</sup>, etkilerini cGMP üzerinden gösterirler. Bazı hallerde ise bizzat ET, bir negatif feedback mekanizması ile endotel hücresinden NO<sup>•</sup> ve/veya prostasiklin salınımını uyarır, bu maddeler de ET sentezini inhibe ederler.

Dolaşımdaki ET'lerin yarı ömrü 2 dakikadan kısadır. ET'lerin yıkıma uğradığı organlar akciğer, böbrek ve karaciğerdir. Yıkımda etkili enzim nötral endopeptidaz olup bu organların dışında vasküler düz kas hücresinde de bulunur.

ET reseptörleri tüm vücutta yaygın olarak yer alırlar. ET izopeptidlerine olan affinitelerine göre 3 ana gruba ayrılırlar:

1- ET<sub>A</sub> reseptörü (ET-RA): ET-1'e yüksek affinite gösterirler; affinite sıralaması: ET-1 > ET-2 > ET-3

2- ET<sub>B</sub> reseptörü (ET-RB): Non-selektif, affinite sıralaması: ET-1 = ET-2 = ET-3

3- ET<sub>C</sub> reseptörü (ET-RC): ET-3'e yüksek affinite gösterir.

ET<sub>A</sub> reseptörü, vasküler düz kas hücresi tarafından sentezlenir ve ET-1'in kasıcı etkisinden sorumludur. Bu tip reseptörler vasküler düz kas hücresi, böbrek ve kalpte bulunur .

ET<sub>B</sub> reseptörü ise tüm ET'lerle aynı oranda bağlanır, endotel hücresi, vasküler düz kas hücresi, karaciğer, böbrek, uterus ve santral sinir sisteminde yer alır. ET'lerin endotel hücresi yüzeyindeki ET<sub>B</sub> reseptörü ile etkileşmesi sonucu endotel hücresinden açığa çıkan NO<sup>\*</sup> ve PGI<sub>2</sub> vazodilatasyona yol açar. Vasküler düz kas hücresinde ise, hem A hem de B tipi reseptörler kontraksiyon ve vasküler düz kas hücresi proliferasyonuna yol açarlar.

ET<sub>C</sub> reseptörü ise en son keşfedilen reseptör tipi olup endotel hücresinde lokalizedir ancak memeli hücresinde varlığı gösterilememiştir.

ET-1 vazokonstriktör etkisini protein kinaz C aktivasyonu ve sitozolik kalsiyum artışı üzerinden gösterir. Reseptör-ET birleşmesini takiben, G proteinler de reseptöre bağlanarak fosfolipaz C'yi aktifler. Aktiflenmiş fosfolipaz C'nin etkisi ile ikinci haberciler olan IP<sub>3</sub> ve DAG sentezlenir. İlki sitozolik kalsiyum düzeyini artırırken, DAG ise protein kinaz C'yi aktifler. ET'ler vasküler düz kas hücresi, böbrek, hepatositler ve fibroblastlarda bu sinyal ileti yolu üzerinden etkili olurlar.

ET-1; vasküler düz kas hücresi, aorta, pulmoner arter, fibroblastlar, beyin kapiller endoteli, osteoblastlar, melanositler ve böbrek glomerul hücresi gibi pek çok hücrede DNA sentezini G-proteinler aracılığıyla uyarır, 1 nM konsantrasyonda ET-1, hücre kültüründe vasküler düz kas hücresi sayısını 2 kat artırır, otokrin büyüme faktörü gibi etki eder. DNA sentezi üzerine etki, ET-1 ve ET-2'de birbirine eşit, ET-3'de ise daha zayıftır. Endotelinler, büyüme faktörleri ve diğer damar kasıcı faktörlerle



etkileşim içindedirler. Bu faktörler arasında PDGF, EGF, TGF- $\alpha$  ve  $\beta$ , bFGF ve IGF (insülin benzeri büyüme faktörü) gibi damar düz kasının proliferasyon ve intimaya geçişini uyararak mitojen maddeler sayılabilir. ET ve diğer vazoaaktif peptidler ile büyüme faktörleri arasında varolan sinerjizmin spesifik mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Bilinen bir gerçek ise ET'lerin kendi mitotik etkileri düşük olduğu halde bunların diğer büyüme faktörlerinin etkileri üzerinde düzenleyici bir rol oynadıklarıdır (44). Endotelinler apoptozisi inhibe ederler, anjiogenezisi de uyarırlar (40). Ancak tümöre spesifik olarak, endotelinlerin kanserlere etkisi açık değildir (41).

## 2.5- IL-2

IL-2, 15400 molekül ağırlığında bir protein olup 133 aminoasitten meydana gelir ve 4. kromozom üzerinde bulunan bir genin ürünüdür. IL-2, T, B lenfositlerin ve natural killer (NK) hücrelerinin proliferasyonunu ve sitokin oluşumunu artırır. İstirahat halindeki T hücreleri, IL-2 mRNA'sı ihtiva etmez iken bu hücrelerin IL-2 meydana getirebilmeleri için antijen veya poliklonal T hücre aktivatörleri ile uyarılması gerekmektedir.

IL-2 daha çok CD4 hücrelerinden salgılanmakla birlikte CD8 hücreleri, medüller timositler ve büyük granüllü lenfositlerden de salgılanabilir. IL-2, IL-2 reseptörlerine (IL-2R) bağlanarak etki eder. Normal insan lenfositleri fitohemaglutin (PHA) ile uyarıldıktan 4 saat sonra IL-2 mRNA hücre içinde birikmeye başlar ve 12 saat içerisinde maksimal düzeye erişir ve daha sonra da aniden düşer. IL-2'nin yarı ömrü 1-2 saat kadar olduğundan IL-2 teşekkülü geçicidir. Ancak antijenle tekrar uyarıldıktan sonra yeniden IL-2 meydana gelir.

IL-2, T hücrelerinin proliferasyonunu sağlasa da bu etki istirahat halinde bulunan T hücrelerinde görülmez. T hücrelerinin IL-2'ye cevap vermesi için önce bir antijen veya mitojenle uyarılması gereklidir ve bu şekilde T hücresi G0 fazından G1 fazına girer. Bu sırada T hücresi yüzeyinde IL-2R'ü meydana gelir ve hücre aynı zamanda IL-2 salgılar. Meydana gelen IL-2 hücreye otokrin olarak etki ederek hücrenin proliferasyonuna neden olur. IL-2, T hücresi, B hücresi ve monositlerdeki spesifik reseptörlere bağlanarak etki gösterir. IL-2 monositler hariç diğer hücrelerin S fazına geçmesini sağlar, lenfokin salınımını stimüle eder ve makrofajların öldürücü

kapasitelerini, immunoglobulin yapımını, büyük granüllü lenfositlerin NK aktivitesini artırır ve anjiogenezise neden olur.

IL-2, normal konsantrasyonlarda, büyük granüllü lenfositlere etki ederek, bu hücrelerin proliferasyonunu, lenfokin salınımını ve fonksiyonlarını uyarır. IL-2 daha yüksek konsantrasyonlarda B lenfositlerinin antikor yapımını ve proliferasyonunu sağlar. Monosit ve makrofajlar normalde IL-2'ye karşı düşük affiniteli P55 Tac antijenlerine sahip olduklarından bu hücreler IL-2'ye pek duyarlı değildir. Monosit ve makrofajlar lipopolisakkarit veya gama interferon ile muamele edildikten sonra bu hücrelerde IL-2'ye karşı yüksek affiniteli reseptörler meydana gelir. Bu hücreler IL-2 ile etkileştikten sonra hücrelerin tümörosidal aktivitelerinde artma görüldüğü gibi, granulosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve GCSF genlerinde de aktivasyon oluşur.

IL-2, NK hücrelerinin büyümesini uyarır ve onların sitolitik fonksiyonlarını artırır. Bunu lenfokinle aktive edilmiş öldürücü (LAK) hücreler üreterek yapar. IL-2, diğer sitokinlerle sinerjik etkiyle NK hücreleri tarafından üretilen gamma interferon ( $\gamma$ -IFN) salgısını artırır. IL-2, intravenöz verildiği zaman yarı ömrü 3 ila 22 dakika arasında değişir. İntraperitoneal veya subkutan verilmesini takiben ise serum konsantrasyonu daha uzun süre yüksek kalır. İntravenöz olarak verilen yüksek dozları çeşitli sitokinlerin salgılanmasına neden olur; ve bu sitokinler vasıtasıyla endotel hücrelerine etki ederek, permeabilite artışına yol açar, sonuçta vasküler sızıntı sendromu oluşur. IL-2'nin bazı toksinlerle birleştirilmesinden sonra organizmaya verilmesi T hücreli lösemilerin tedavisinde faydalı olabilmekte ve bu özelliklerinden dolayı LAK hücreleri ile birlikte tümör tedavisinde kullanılmaktadır.

IL-2, endotel, intestinal epitelyumu ve sinir hücrelerini içeren normal dokularda tespit edilmiştir (45). IL-2 ve IL-2R'nün artan ekspresyonu, mide, böbrek ve spinocelluler kanserlerde (46), baş ve boyunun squamoz hücreli kanserlerinde (47), melanomalarda, nöroblastik tümörlerde (48) ve prostat kanserlerinde (49) tespit edilmiştir.

## **2.6- IL-18**

IL-18, önceleri  $\gamma$ -IF indükleyici faktör olarak biliniyordu (50). Molekül ağırlığı 24 kilodalton olan IL-18, aktive makrofajlar, kupfer hücreleri, keratinositler,

intestinal epitelyum hücreleri ve osteoblastlarda inaktif olarak üretilir. IL-18,  $\gamma$ -IF üretimini indükleyerek ve aktifleyerek tümör hücrelerine karşı immün savunmayı artırır.  $\gamma$ -IF'nu artırma kapasitesine ek olarak IL-18, NK ve T hücrelerinin sitotoksik etkilerini de artırır. Ayrıca bu hücrelerden TNF- $\alpha$ , interlökin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-8 ve NO gibi diğer proinflamatuvar mediatörlerin üretimini artırır. IL-18'in farelerde yapılan bir araştırmada, tümör anjiogenezini inhibe ederek, tümörogenezisi zayıflatarak ve tümör hücrelerinde apoptozisini indükleyerek anti-tümör etkiye neden olduğu bildirilmiştir (51,52).

## 2.7- VEGF

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri ailesinin üyesi olan VEGF ailesi, endotel hücreleri için özgüdür ve önemli etkileri vardır (30). Vücutta hem fizyolojik olaylarda hem de tümör büyümesi ve yayılmasını da içeren patolojik birçok hastalıkta rol oynar. VEGF, 6. kromozomun kısa kolunda (6p12) lokalize, molekül ağırlığı 45 kDA olan bir sitokindir.

VEGF'nin seçici olarak endotel hücrelerinde mitojenik etki ile damar gelişimini uyarmasının yanı sıra morfogenez ve kemotaksiste de önemli roller üstlendiği bilinmektedir (30). Anti-apoptotik proteinlerin sentezinin artması veya anti-apoptotik sinyal yollarının aktivasyonu ile yeni damar oluşumunda yaşamsal rol oynar. VEGF; vasküler endotel hücreleri için potent bir mitojendir, ancak diğer hücre tipleri için mitojenik aktivitesi yoktur. Megakaryositler, VEGF'nin önemli kaynağıdır ve VEGF trombositlerin  $\alpha$  granüllerinde depo edilir. Bunun yanında VEGF, vücutta değişik hücrelerden ve tümör hücrelerinden salgılanır ve hemodinamik bir glikoproteindir. Yapılan araştırmalar göstermektedir ki; endotel hücreleri, lökosit, megakaryosit, ovaryum follikülleri, korpus luteum, akciğer alveolar hücreleri, renal glomerül visseral epitelyum hücreleri, kardiyak myositler, böbrek proksimal tübül hücreleri, adrenal korteksin tüm hücreleri, Leydig hücreleri, aktive makrofajlar, arteriyelleri çevreleyen fibroblastlar, bronşiyal ve koroid pleksus epitelyum hücreleri, hepatositler ve özellikle de malign tümör hücrelerinde (Karaciğer, mesane, böbrek, over, mide, kolon, beyin ve meme kanserleri) VEGF sentezlenmektedir (31,32,33).

VEGF'nin yedi üyesi vardır: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve PlGF.

VEGF-A, Human-VEGF olarak da isimlendirilir. VEGF-A'nın plasentasyonda sitotrofoblastların ve sinsisyotrofoblastların gelişiminde rol aldığı düşünülmektedir. VEGF-A geni, kromozom 6p21.3'teki lokalizasyonda kodlanmıştır.

VEGF-B, 167 aminoasitli bir proteindir ve vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1'e (VEGFR-1) bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmasında rol alır.

VEGF-C, 388 aminoasitten oluşur ve lenfanjiyogenezde rol oynar. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotel hücrelerde mitojenik etki yapar. VEGF-C'nin Kaposi sarkomunda önemli rol aldığı rapor edilmiştir (33,34).

VEGF-D, 334 aminoasitten oluşan ve VEGF-A'yla % 31 oranında aynı aminoasitler içeren bir proteindir. Bu da VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C gibi lenfanjiyogenezde rol alır (34).

VEGF-E'nin aminoasit dizilimi ise VEGF-A ile %25 oranında aynıdır. VEGF-E endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlar ve kan damarlarının geçirgenliğini artırır. VEGFR-1'e bağlanmayı başaramaz ama VEGFR-2'ye seçici bağlanarak etkisini gösterir.

PlGF, 152 aminoasitten oluşur ve VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir.

Vasküler endotel hücrelerinde VEGF'nin yüksek afinite gösterdiği 3 reseptör gösterilmiştir.

- 1- VEGFR-1/ Flt-1 (fms-like tyrosinekinase-1)
- 2- VEGFR-2/ Flk-KDR (kinase domain region-fetal liverkinase)
- 3- VEGFR-3/ Flt-4 (fms-like tyrosine kinase-4)

Tirozin kinaz reseptör ailesinden olan VEGF reseptörleri içinde anjiyogenez sürecinde en önemli rolü VEGFR-2/Flk/KDR reseptörü oynamaktadır. Alınan sinyali hücre içine ileterek hücre proliferasyonu ve kemotaksise neden olmaktadır. VEGF ailesi kan damarlarının yapılımasını ve damar geçirgenliğini VEGFR-1/Flt-1 ve VEGFR-2/Flk-KDR reseptörleri ile etkileşerek kontrol ederler. VEGFR-1 çözünür durumda olsa bile VEGF için yüksek affiniteye sahiptir. VEGFR-2, VEGF'nin mitojenik ve permeabilite etkisinde en önemli reseptördür. VEGFR-1 patolojik

anjyogenezi negatif yönde etkileyerek, VEGFR-2'nin proanjyojenik etkilerini azaltmaktadır. VEGFR-1 ve VEGFR-2 endotel hücreleri üzerinde bulunurken VEGFR-3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır. VEGF reseptörleri esas olarak endotel hücrelerinde eksprese olur ve hipoksi ve VEGF tarafından üretimi potansiyelize edilir (35). VEGFR-1, çözülebilir formda iken bile hem damarlardan hem de tümör hücrelerinden elde edilebilir.

VEGFR-2 bulunmayan farelerin endotel hücrelerinin farklılaşmadığı ve organize kan damarları üretmediklerini, VEGFR-1'den yoksun farelerde ise, endotel hücrelerinin farklılaştığı, ancak damarların büyük ve organize olmadığı gözlenmiştir. Her iki reseptörün eksikliği ise damarlanmayı ve embriyonik gelişimi önlemektedir (36).

**VEGF reseptörlerinin aktivasyonu;** VEGF'nin reseptörü ile birleşmesini takiben reseptöre G proteinleri de bağlanır ve fosfolipaz-C'yi aktifler. Aktiflenmiş fosfolipaz C'nin etkisi ile ikinci haberciler olan diaçilgliserol (DAG) ve inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>) oluşur. DAG, protein kinaz C'yi aktive eder. IP<sub>3</sub> de hücre içi kalsiyum seviyesini artırır, kalsiyum-kalmodulin kompleksi oluşturarak kalmodulin kinazları aktive eder. Bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinleri, bu kinazlar aracılığıyla, fosforile edilerek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferensiasyonunu sağlar. VEGF'nin reseptörlerine bağlanmasını, heparan sülfat proteoglikanları düzenlemektedir. Düşük heparin konsantrasyonu VEGF bağlanmasını artırırken, yüksek heparin konsantrasyonunun bağlanmayı azalttığı bildirilmiştir (37).

### **2.7.1. DNA Polimorfizmi**

Doğada, aynı türden organizmalar genellikle, bazı görünümleri ile farklıdırlar. Bu farklılıklar genetik olarak belirlenmiştir ve polimorfizm olarak isimlendirilmektedir. Polimorfizm, tüm birey düzeyinde (fenotip), proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin varyant formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomal polimorfizm) veya DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde görülebilir.

Tek nükleotid pozisyonundaki değişikliği (substitusyonlar, delesyonlar ve insersiyonlar) temsil eden tek baz çifti polimorfizmi ya da tek nükleotid

polimorfizmi (SNP) olarak tanımlanmaktadır. Bu polimorfizmlerin çoğu bialleliktir. Birçok SNP'nin kodlamayan genomik bölgelerde bulunmasına rağmen, önemli bir kısmını hastalıkla veya diğer fenotiplerle ilgili mutasyonlar teşkil etmektedir (107).

### **2.7.2 VEGF polimorfizmi**

VEGF geni 6p21.3 kromozomunda lokalize olup 8 eksondan oluşmaktadır, bu eksonların “alternatif splicing” ile VEGF protein ailesini oluşturur. Bu gende şimdiye kadar birçok polimorfizm tespit edilmiş olup bunların VEGF protein üretiminde varyasyonlara neden olduğu tespit edilmiştir. VEGF genindeki DNA varyasyonları VEGF üretimini veya aktivitesini değiştirebilir. Bu şekilde tümörlerin gelişiminde ve yayılmasında bireyler arasındaki farklılıkları açıklayabiliriz. VEGF gen polimorfizminin VEGF üretimi ile ilişkili olduğunu gösteren az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmaların sonuçları ise birbirleri arasında çelişki göstermektedir.

Verilen sonuçlara göre VEGF geninde fonksiyonel genetik varyasyon olmasının kolorektal kanser gelişimi ve progresyonuna katkıda bulunması mümkündür. Literatürde VEGF geninin tek nükleotid polimorfizmlerini (SNPs) ve bunların kolorektal karsinoma yatkınlıkla ilişkisini araştıran bazı çalışmalar mevcut olmasına rağmen çıkan sonuçlar oldukça çelişkilidir.

Örneğin Chae ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Kore halkında VEGF gen polimorfizmi (-634G>C rs2010963 ve 936 C>T rs3025039) ile kolorektal karsinomaya yatkınlık ve klinikopatolojik özellikleri arasındaki potansiyel ilişki değerlendirilmiştir. Bu çalışmada -634 G>C polimorfizminin GC ve CC genotipleri birlikte ele alındığında ve -634C/936C haplotipi ve -634G/936T haplotiplerine bakıldığında bunları taşıyan bireylerin kolorektal karsinomaya yakalanma riskileri düşük olduğu TT genotipindekiler ise kolorektal karsinom açısından agresif klinik özelliklerle bağlantılı olarak gözlenmiştir (105). Watson ve arkadaşları ise VEGF634G>C polimorfizmi için GG genotipinin anlamlı olarak serumda yüksek VEGF üretimine neden olduğunu göstermişlerdir (106).

Hofmann ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir vaka kontrol çalışmasında VEGF +936 C>T,-2578 C>A ve -634 G>C gen polimorfizmleri 427 kolorektal kanserli hasta ile aynı sayıda sağlıklı kontrollerde incelenmiştir. Sonuçta araştırılan

bu gen polimorfizmlerinin kolorektal kansere bireysel yatkınlıkla ilişkili olmadığı tesbit edilmiştir (103).

Sfar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise prostat kanserli hastalarda yapmış oldukları bir çalışmada fonksiyonel VEGF gen polimorfizmlerinin bir genetik marker olarak prostat kanserine yatkınlık ve hastalığın prognozu hakkındaki rolü değerlendirilmiştir. Çalışmaya 101 hasta ve 100 sağlıklı kontrol katılmıştır. 3 adet gen polimorfizmine bakılmıştır. Bunlar -1154 G>A, -634 G>C ve 936 C>T'dir. Sonuçlarda prostat kanseri riski açısından -1154 AA genotipinin anlamlı olmadığı ancak -1154 A allelinin yüksek tümör grade'i ile ilişkili olabileceği saptanmıştır. -634(GC+CC) kombine edilmiş genotipinin prostat kanseri riskini anlamlı derecede arttırdığı saptanmıştır. VEGF geninin -634C allelinin prostat kanserinin agresif bir fenotipiyle ve artmış histolojik grade ile ilişkili olduğu belirlenmiş. VEGF'nin -1154 A/-634 G haplotipinin artmış prostat kanseri riski ve yüksek tümör grade'i ile anlamlı bir ilişkisinin olmadığı anlaşılmıştır. Sonuçta VEGF genindeki genetik varyasyonların sadece prostat kanseri riski için değil tümör agresifliği açısından da rolü olabileceği belirtilmiştir (108).

Krippel ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada VEGF geninde sık görülen 936 C/T polimorfizminin VEGF nin plazma seviyesi ile ilişkili olduğu tesbit edilmiştir. Bu vaka kontrol çalışmasında bu polimorfizmin meme kanseri ile olan ilişkisi araştırılmıştır. VEGF genotipi 500 hastada ve 500 sağlıklı kontrolde tesbit edilmiş. 936 T allelini taşıyan kontrollerin hastalardan daha sık olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak 936 T allelini taşıyan sigara içmeyen postmenopozal kontrollerde bu alleli taşımayanlara göre anlamlı olarak düşük plazma VEGF seviyelerine rastlanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda VEGF 936 T allelini taşıyan kişilerde azalmış meme kanseri riski mevcut olduğu tesbit edilmiş ancak bu bulguyu doğrulayan daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (109).

Ayrıca çalışmalarda genetik polimorfizmlerin etnik gruplar arasında farklı olduğu gösterilmiştir. Çeşitli etnik gruplarda VEGF polimorfizmleri ve Kolorektal kanser arasındaki ilişkiyi netleştirmek için çeşitli çalışmalara ihtiyaç vardır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. MATERYALLER

Bu araştırma için gerekli olan kan ve doku örnekleri, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı servisinde yatan, kolorektal ca tanısı almış fakat henüz cerrahi ve medikal tedavi uygulanmamış, 44 kolorektal kanserli hastadan ve yaş olarak uyumlu 44 normal sağlıklı gönüllülerden alındı.

#### 3.2. KULLANILAN KİMYASALLAR, ARAÇ VE GEREÇLER

##### 3.2.1. Kimyasallar

Sodyum hidroksit (NaOH) (Riedel de Haen), Asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH) (Riedel-de Haen), Sülfanilamid (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S), N-Naftil etilendiamin (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>), sodyum nitrit (NaNO<sub>2</sub>), sodyum nitrat (NaNO<sub>3</sub>), sodyum tetraborat (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O), çinko sülfat (ZnSO<sub>4</sub>), glisin (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>COOH), sodyum dodesil sülfat (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S) (Sigma), Bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>), sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), kadmiyum, tiobarbuturik asit (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S), n-butanol (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O), piridin (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N), Sodyum klorid, Amonyum asetat (Merck), 1,1,3,3-tetrametoksipropan (CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>CH(OCH<sub>3</sub>) (Aldrich), Endotelin (ET), vasküler endotelyal growth faktör (VEGF), interlökin-2 (IL-2) ve interlökin-18 (IL-18) elisa kiti ise biosource firmasından sağlandı.

*Taq* DNA polimeraz enzimi (MBI Fermantas),

BsmFI restriksiyon endonükleazı(New England Biolabs),

NlaIII restriksiyon endonükleazı(New England Biolabs)

Primerler:VEGF 634G>C polimorfizmi için:

F5' -TTGCTTGCCATTCCCCACTTGA-3' ve

R5' CCGAAGCGAGAACAGCCCAGAA - 3';

VEGF936C>T polimorfizmi için:

F5' -AAGGAAGAGGAGACTCTGCGCAGAGC-3' ve

R5' -TAAATGTATGTATGTGGGTGGGTGTTGTTCACAGG-3' (The Midland certified reagent company inc.)

Akrilamid, Amonyum persülfat, Asetik asit, Bisakrilamid, Borik asit, Brom fenol mavisi, Etanol, Etidium bromid, EDTA, Formaldehit, Formamid, Gümüş



nitrat, Ksilen siyanol, Sodyum karbonat, TEMED, Tris baz, Proteinaz *K* enzimi (Sigma)

### **3.2.2. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler**

#### **3.2.2.1. DNA İzolasyon Çözeltileri**

##### **3.2.2.1.1 RBCL ( eritrosit parçalama solüsyonu) pH 7,4**

0.15 M NH<sub>4</sub>Cl

0.01 M KHCO<sub>3</sub>

0.01 M EDTA (pH 8,0)

##### **3.2.2.1.2 WBL ( beyaz hücre parçalama solüsyonu)**

0.1 M NaCl

0.025 M EDTA (pH 8,0)

##### **3.2.2.1.3 Amonyum asetat solüsyonu**

9.5 M NH<sub>4</sub>Ac ( sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirilir)

##### **3.2.2.1.4 TE tamponu (pH 8.0)**

10 mM Tris HCl

1 mM EDTA pH 8.0 (+20°C)

##### **3.2.2.1.5 SDS stok solüsyonu**

10% (w/v) SDS

0.2-0.45 µm membran ile filtre edilmiş

#### **3.2.2.2. Elektroforez Solüsyonları**

##### **3.2.2.2.1 Yükleme tamponları**

6 X agaroz jel yükleme tamponu

% 0.25 bromfenol mavisi

% 0.25 Xanal cyanol

% 30 gliserol

### **3.2.2.2.2 Etidyum bromür stok solüsyonu**

10 mg/ml etidyum Bromür

### **3.2.2.2.3 50X TAE**

2 M Tris-Asetat

0.05 M EDTA (pH 8,0)

### **3.2.2.2.4 5X TBE**

0.45 M Tris Borat

0.01 M EDTA (pH 8,0)

### **3.2.2.2.5 % 10'luk non-denatüre poliakrilamid jel solüsyonu (29:1 akrilamid: bisakrilamid)**

%10 Akrilamid-Bisakrilamid

1X TBE

Polimerizasyon için;

0.001 M amonyumpersülfat (APS),

% 0,1 TEMED ilave edildi.

### **3.2.2.3. Gümüş Boyama Solüsyonları**

10 X A solüsyonu: %5 asetik asit % 95 absolüt etil alkol

10 X B solüsyonu: %1 gümüş nitrat

C solüsyonu: 3 g NaOH, 0.02 g Boraks, %0,2 formaldehit

10 X D solüsyonu: 22,5 g Sodyum bikarbonat/ 1lt (opsiyonel)

### **3.2.3. Araç ve gereçler**

Otomatik mikropipetler 10 µl, 100 µl, 1000 µl'lik (Eppendorf Mastercycler)

Vortex (Nüve NM 110)

Hassas terazi (Sartorius BL2105)

Santrifüj cihazı (Nüve NF 800R)

Mikrosantrifüj cihazı (Eppendorf 5810R)

Uv/visible spektrofotometre (Shimadzu 1240)

Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 301)

Dijital pH metre (Crison GLP 22)

Sıcak su banyosu (Nüve BM 402)

Etüv (Nüve FN 800)

Mikroeliza cihazı (Elx 800)

Steril deney tüpleri (BD Vacutainer)

Thermocycler (Eppendorf Mastercycler)

Dikey elektroforez(BIORAD)

Yatay elektroforez(BIORAD)

Güç kaynağı (BIORAD Power Pac 3000)

UV transilimünatör (BIORAD)

Spektrofotometre (SHIMADZU)

CanoScan N670U (Canon)

Bilgisayar

## **3.3. METODLAR**

### **3.3.1. Numune alınması ve hazırlık işlemleri**

Hasta ve kontrollerin median venlerinden 10 ml kan alınarak, katkısız steril tüpe konuldu. Kan, pıhtılaştıktan hemen sonra bekletilmeden + 4 °C'de 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası, örneklerin süpernatant (üst) kısımları 5 ayrı eppendorfa konularak (gerekli tüm bilgiler eppendorf üzerine yazılarak) -80°C'de, saklandı. Numune toplama işlemi bittikten sonra -80 °C'deki örneklerden çalışılacak parametreye göre numune eppendorfları çıkartılarak oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı ve daha sonra analizler yapıldı. Ayrıca Gen polimorfizmi

çalışması için de hasta ve kontrol gruplarından EDTA'lı tüplere 10 ml kan daha alındı.

### 3.3.2. NO<sub>x</sub> (total nitrit + nitrat) ölçümü

NO<sup>•</sup>, biyolojik sistemlerde üretildikten sonra, 2–30 sn gibi çok kısa sürelerde nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve ardından nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)'a oksitlenir. Nitrat formu, NO<sup>•</sup> türevlerinin en kararlı yapısıdır.



Görüldüğü gibi stabil bir yapıda olmaması nedeniyle, nitrik oksidi direkt ölçmek oldukça zordur. Bu yüzden araştırmamızda, numunede bulunan nitratı nitrit formuna redükleyerek (kadmiyum redüksiyonu ile) ortamda bulunan toplam nitrit + nitrat formunu ölçtük. Bu iki formun toplamını ise NO<sub>x</sub> ile gösterdik. Sonuçta NO<sup>•</sup> kaynaklı ürünler olan NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub>'ün tamamı ölçülmüş oldu.

#### 3.3.2.1. Kullanılan reaktifler

**1- Çinko sülfat (ZnSO<sub>4</sub>) çözeltisi:** Çinko sülfat granülleri bidistile su ile çözülerek 75 mmol/L'lik konsantrasyona getirildi.

**2- Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi:** Sodyum hidroksit granülleri deiyonize su ile çözülerek 55 mmol/L'lik konsantrasyona getirildi.

**3- Glycine-NaOH çözeltisi:** Glycine granülleri deiyonize su ile çözülerek 200 mmol/L'lik konsantrasyona getirildi. Daha sonra 4 molar NaOH kullanılarak pH'sı 9,7'ye ayarlandı.

**4- Sülfanilamide:** 5 g sülfanilamide, 3 M sıcak HCl içerisinde eritilerek son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

**5- N-Naphthylethylene diamine (NED) çözeltisi:** 100 mg NED, bidistile su içinde çözdürülerek son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

**6- Griess reaktifi (1/1) :** Bir birim süfanilamid çözeltisi alınarak, bir birim NED çözeltisi ile karıştırıldı. Karışım deneyden önce taze olarak hazırlandı.

**7- Bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>) çözeltisi:** Bakır sülfat granülleri deiyonize su ile çözülerek 100 mmol/L'lik konsantrasyona getirildi.

**8- Sülfürik asit çözeltisi:** Sülfürik asit deiyonize su ile karıştırılarak 200 mmol/L'lik konsantrasyona getirildi.

**9- Sodyum borat (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) çözeltisi:** Sodyum borat granülleri deiyonize su ile çözülerek 10 mmol/L'lik konsantrasyona getirildi.

**10- Standart çözeltiler :** Stok sodyum nitrit ve nitrat çözeltileri (1mM) kullanılarak; 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µM konsantrasyonlarda standartları hazırlandı. Stok ve standartlar hazırlanırken çözücü olarak 10 mM sodyum borat (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) kullanıldı.

### **3.3.2.2- Deneyin yapılışı**

Kocaeli Üniversitesi Tıp fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı.

#### **3.3.2.2.1- Deproteinizasyon**

Araştırmamızda NO<sub>x</sub> ölçümünde numune olarak serum kullanıldı. Serum direkt deproteinizasyona tabi tutuldu. 0,25 ml numune üzerine, 0,5 mL çinko sülfat ve 0,5 mL sodyum hidroksit ilave edildi. Mikserle iyice karıştırıldı ve 5000 g de 15 dk santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası elde edilen süpernatant, redüksiyon işleminde kullanıldı. Sonuçta elde edilen deproteinize serum 5 kez dilue edilmiş oldu.

#### **3.3.2.2.2- Nitrat redüksiyonu**

Deneyimizin ikinci aşamasında numunelerimizde (serum) bulunan nitrat moleküllerinin nitrit haline redüksiyonunu gerçekleştirdik. Bunun için kadmiyum metodunu kullandık.

**Kadmiyum redüksiyonu:** Her numuneye yaklaşık 2 gram kadmiyum karşılık gelecek şekilde 100 numunelik 200 gram kadmiyum alınarak önce saf suda üç kez yıkandı ve steril temiz bir cam kaba kondu. Üzerine 200 ml 200 mmol/L'lik sülfürik asit çözeltisi eklendi. Karışım 24 saat karanlıkta bırakıldı. Süre tamamlanınca cam şişenin içindeki sülfürik asit boşaltıldı ve böylece kadmiyumların redüksiyonu sağlandı. Redüksiyona uğramış kadmiyumlar 2 defa deiyonize su ile yıkanarak

ortamda bulunabilecek bulaşıklar giderildi. Bu işlemler yapılırken olabildiğince hızlı hareket edildi ve kadmiyumun bu işlemler sırasında havayla temas etmemesi için en son yıkamada üzerine kadmiyum yüzeyini 1 cm geçecek şekilde deiyonize su bırakıldı. Böylece kadmiyum redüksiyonu tamamlandı.

**Kadmiyum aktivasyonu:** Kadmiyum redükte edildikten sonra hiç beklemeden cam kap içerisinde mevcut deiyonize su boşaltılarak, 200 mL 100 mmol/L bakır sülfat çözeltisi kadmiyum granülleri üzerine eklendi. Daha sonra cam şişe, kendi etrafında kibar bir şekilde döndürülerek (çalkalamadan) 15 dakika karıştırıldı. 15 dakika sonunda konulan bu bakır sülfat çözeltisi mavi renkten normal su rengine dönüştü. Bu dönüşüm aktivasyonun tamamlandığının bir göstergesi olarak kabul edildi. Kadmiyum aktive olduktan sonra kadmiyum üzerindeki sıvı boşaltılarak glisin-NaOH ile 2 kez yıkandı ve ortamda bulunabilecek bakır vs gibi bulaşıklar yok edildi. Son yıkamadan sonra kadmiyumun hava ile temasını (oksitlenmesini) engellemek için kadmiyum yüzeyini 1 cm geçecek şekilde üstte biraz glisin-NaOH bırakıldı.

**Çalışma:** Her numune için boş bir deney tüpüne aktive olmuş kadmiyumdan 2 gram koyduk. Daha sonra üzerlerine 1000 µL glisin-NaOH, 500 µL bidistile su ve deproteinize edilmiş numunelerden ve standartlardan 500 µL koyduk.

Deproteinizasyon sırasında 5 kez dilusyon yapmıştık. Bu aşamada da deproteinize numune 4 kez daha dilue edilmiş oldu. Sonuçta numunemiz toplam olarak 20 kez dilue edilmiş oldu.

Daha sonra tüpleri 1,5 saat boyunca ışık görmeyecek şekilde 10 dakika aralıklarla kibarca döndürerek numune içinde bulunan  $\text{NO}_3^-$ 'ün  $\text{NO}_2^-$ 'ye dönüşümünü sağladık. 1,5 saat sonra tüpleri 3000 g'de 3 dk santrifüj ettik..

**Griess reaksiyonu:** Ardından yeni deney tüplerine kadmiyum içinde bulunan ve santrifüj edilen numunelerin süpernatantından 1000 µL, griess reaktifinden de 1000 µL koyduk ve kapalı ışık görmeyen bir ortamda 30 dakika inkübe ettik.

Son olarak oluşan renkli solüsyonlar (numuneler ve standartlar) spektrofotometrede 545 nanometrede okunarak standart grafiği hazırlandı. Ardından numunelerin absorbanları kaydedildi ve standart grafiğinden faydalanılarak numunelerin

konsantrasyonları hesaplandı ve dilusyon faktörleriyle çarpılarak gerçek konsantrasyonlar bulundu. Sonuçta total nitrit ölçülerek, numunede bulunan NO<sub>x</sub> (nitrat + nitrit) konsantrasyonları bulunmuş oldu. Bu ölçüm de NO<sup>•</sup>'in bir göstergesi olarak kabul edildi . Konsantrasyonlar µmol/L olarak sunuldu.

### **3.3.3. ET ölçümü**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi merkez laboratuvarında mikroelisa yöntemiyle, Belçika'da üretilen Biosource marka hazır kit kullanılarak elx 800 cihazında çalışıldı. Konsantrasyonlar fentomol/ml olarak sunuldu.

### **3.3.4. VEGF ölçümü**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi merkez laboratuvarında mikroelisa yöntemiyle, Belçika'da üretilen Biosource marka hazır kit kullanılarak elx 800 cihazında çalışıldı. Konsantrasyonlar pg/ml olarak sunuldu.

### **3.3.5. IL-2 ölçümü**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi merkez laboratuvarında mikroelisa yöntemiyle, Belçika'da üretilen Biosource marka hazır kit kullanılarak elx 800 cihazında çalışıldı. Konsantrasyonlar pg/ml olarak sunuldu.

### **3.3.6. IL-18 ölçümü**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi merkez laboratuvarında mikroelisa yöntemiyle, Belçika'da üretilen biosource marka hazır kit kullanılarak elx 800 cihazında çalışıldı. Konsantrasyonlar pg/ml olarak sunuldu.

### **3.3.7. Periferik Kandan DNA İzolasyonu**

1. 10 ml periferik kan 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak üzerine 1:3 oranında eritrosit lizis tamponu eklendi. +4°C'de 20 dakika bekletilip, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

2. Örnek santrifüjden alınarak üzerindeki süpernatant atıldı. Pellet süspanse edildi ve üzerine 20 ml eritrosit lizis tamponu eklendi. Tekrar 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
3. Pelet tamamen süspanse edilip üzerine 500 µl SDS (%10'luk), 50µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9,4 ml WBL (White Blood-Cell Lysis) tamponu eklenerek 56°C'de gece boyu bekletildi.
4. İnkübasyon sonrası üzerine 4 ml Amonyum asetat (9.5M) eklenip iyice karıştırıldı. 20 dakika 4500 rpm'de santrifüj edildi.
5. Üstteki temiz kısım alınarak yeni bir falkon tüpe aktarıldı, pellet atıldı. Supernatantın üzerine 20 ml etanol eklendi ve DNA'nın toplanması beklendi. DNA alınarak bir eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 1ml % 70 etanol koyuldu. Maksimum hızda (13.200 rpm) 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Kurutma işlemi ile kalan alkol uçuruldu
6. Elde edilen DNA'nın miktarına göre 100–300µl kadar TE (Tris-EDTA, pH=8.0) tamponu eklenerek 56°C'de 1 saat bekletilerek +4°C'de muhafaza edildi.

### **3.3.8. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü**

1. Stok DNA tüpünden 1µl örnek alındı ve 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı.
2. Üzerine 99µl TE eklenerek 1/100 oranında sulandırıldı.
3. Örneğin spektrofotometrede 260 ve 280 nm ultraviyole dalgaboyunda absorpsiyon değerleri okundu.
4. DNA miktarı formüle göre hesaplandı:  
Konsantrasyon= 100 (sulandırma) x 50 (sabit) x OD 260= ng/µl DNA
5. OD 260/280 > 1,8 RNA, < 1,8 protein kontaminasyonu olarak değerlendirildi.

### **3.3.9 GENOTİPLEME**

Genotipleme alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lardan Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (Polymerase Chain Reaktion- Restriction Length Polymorphism (PCR-RFLP)) metodu ile yapıldı.



### 3.3.10. PCR

VEGF 634G>C polimorfizmi Sfar S ve ark. yayınladığı metod ile incelendi ve analiz yapıldı(108). PCR reaksiyonu için 100 ng genomic DNA, 10 pmol forward (F:5'-TTGCTTGCCATTCCCCACTTGA-3') ve reverse (R:5'-CCGAAGCGAG AACAGCCCAGAA-3') primerler kullanarak amplifiye edildi (108). PCR şartları: 96°C de 2 dk. denaturasyonu takiben 96°C 30sn, 61 °C'de 40sn. ve 72 °C'de 40sn. 35 döngü ve son olarak 72 °C'de 10dk. şeklinde yapıldı. Total miktarı 25µl olan PCR mix'i 10mM Tris-Cl (pH 8,8), 50 mM KCl, %0.08 Nonidet P40 ve 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP ve 1,0 U *Taq* DNA polimeraz (MBI Fermentas) içerecek şekilde hazırlandı.

VEGF 936 C>T polimorfizmi Sfar S ve ark. nın yayınladığı metod ile incelendi ve analiz yapıldı (108). PCR reaksiyonu için 100 ng genomic DNA, 10 pmol forward (F:5'-AAGGAAGAGGAGACTCTGCGCAGAGC-3') ve (R:5'-TAAATGTATGTATGTGGGTGGGTGTTGTCACAGG-3') primerler kullanarak amplifiye edildi. PCR şartları: 94°C de 4 dk. denaturasyonu takiben 94°C 1dk, 61 °C'de 1dk. ve 72 °C'de 1dk. 35 döngü ve son olarak 72 °C'de 8dk. şeklinde yapıldı. Total miktarı 25µl olan PCR mix'i 10mM Tris-Cl (pH 8,8), 50 mM KCl, %0.08 Nonidet P40 ve 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP ve 1,0 U *Taq* DNA polimeraz (MBI Fermentas) içerecek şekilde hazırlandı.

### 3.3.11 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezisi

Toplam 25µl hacimde gerçekleştirilen reaksiyondan kontrol amacı ile 5µl alınarak 6X agaroz yükleme tamponu ile karıştırıldı. %2'lik agaroz jele pUC-Mix (MBI) size markır ile birlikte yüklenen PCR ürünleri, 50 V akımda yaklaşık 1 saat yürütüldü. UV transilüminatörde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

### 3.3.12 RFLP

*BsmFI* restriksiyon enzim kesimi total olarak 15 µl olup 1X *BsmFI* tamponu (NE Buffer), 1U *BsmFI* enzimi, 5 µl PCR ürünü ve 6 µl steril distile su içerecek şekilde hazırlandı ve gece boyunca 65° C'de bekletilerek yapıldı. *NlaIII* restriksiyon enzim kesimi de total olarak 15 µl olup 1X *NlaIII* tamponu (NE Buffer), 1U *NlaIII* enzimi, 5 µl PCR ürünü ve 6 µl steril distile su içerecek şekilde hazırlandı ve gece

boyunca 37° C’de bekletilerek yapıldı. Kesim ürünleri %10’luk poliakrilamid jelde (29:1) yürütülüp, gümüş nitrat metodu ile boyanarak görüntülendi. Tarayıcı yardımı ile tüm görüntüler bilgisayara kaydedildi. VEGF 634G>C polimorfizmi için bantlar CC formu için 470bp, CG formu için 470bp, 274bp ve 196bp ve GG formu için 274bp ve 196bp olarak gözlemlendi. VEGF 936 C>T polimorfizmi için de bantlar CC formu için 208bp, 208bp, CT formu için 126bp ve 86bp ve TT formu için 126bp ve 86bp olarak gözlemlendi.

### 3.3.13. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektrofizi

35 cm x 10 cm ebatlarında hazırlanan jelin elektrofizi için dikey elektrofiz cihazı kullanıldı. Jelin kalınlığı 0,5 mm olarak ayarlandı. % 10’luk PAGE stok solüsyonuna sırası ile % 10’luk APS stoğundan % 1 hacim ve TEMED’den % 0,1 hacim ilave edilip 0,5 mm’lik cam aralığına döküldü. Polimerizasyonun tamamlanması için en az 1/2 saat beklendi.

Polimerizasyon sonrası camlar elektrofiz cihazına yerleştirildi, 1X TBE içeren yürütme tamponu ilave edildi. Örnekler jel kuyucuklarına yüklendi. Yükleme tamponu içinde bulunan ve elektrik alanda hareket eden brom fenol mavisi ve ksilen siyanol boyalarının yürüdükleri mesafe takip edilerek akım aşağıdaki çizelgelerde verildiği gibi ayarlandı. Çizelgelerde verilen süreler sonunda jel çıkartılarak gümüş boyama işlemine geçildi.

**Tablo 5: VEGF G634C ve VEGF C936T polimorfizmleri için poliakrilamid jel elektrofizi koşulları:**

Akım			PAGE (%)	Yürüme zamanı (dk)
mA	V	W		
~50	~150	20	10	30

### 3.3.14. Gümüş Boyama

Solüsyonlarda ve yıkamada kullanılan suyun kalitesi önemli olduğundan test edilmiş distile su kullanıldı. Elde hafif çalkalama ile aşağıdaki solüsyonlarda sıra ile bekletildi. C solüsyonu kullanımdan hemen önce hazırlandı. Sonraki solüsyonlara geçerken aralarda distile su ile bir kaç saniyelik kısa süreler ile yıkandı.

**A solüsyonu** (Asetik asit-etanol): 200 ml distile suya stok solüsyondan 10 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 5 dakika muamele edildi.

**B solüsyonu** (Gümüş nitrat): 200 ml distile suya stok solüsyondan 10 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 10 dakika muamele edildi.

**C solüsyonu** ( NaOH-Boraks-Formaldehit): 200 ml distile suya 2.5 gr NaOH ve 0.02 gr boraks ilave edildi ve jel bu solüsyona alındıktan sonra solüsyonun içerisine 1ml formaldehit ilave edilerek bantlar görülünceye kadar jel solüsyon içerisinde tutuldu.

**D solüsyonunu** (NaHCO<sub>3</sub>): 200 ml distile suya stok solüsyondan 20 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 5 dakika muamele edildi.

Distile suda yıkanan jel nemli olarak asetat arasına alındı ve naylon dosya poşeti içine alınarak hava alması engellenecek şekilde saklandı.

### 3.3.15. İstatiksel Analiz:

Biyokimyasal verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 12.0 paket programı kullanıldı. Verilerin normal dağılımına bakılarak T-Test ve Mann-Whitney-U testleri kullanıldı.

VEGF gen polimorfizmi incelenmesi çalışmasının istatistiksel analizi ise Odds ratio, %95 güven aralığı ve  $\chi^2$  analizi, conditional logistic regression analizi kullanarak yapıldı. Hücre frekansları 5'ten az olduğunda gerçek metodlar kullanılarak risk oranları hesaplandı. Tüm analizler PC için SPSS 12,0 versiyonu kullanılarak yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. KONTROL VE HASTA GRUPLARININ SERUM NO, VEGF, ET, IL-18 VE IL-2 DEĞERLERİ

Tablo-6 . Kolorektal kanserli hastaların biyokimyasal analiz sonuçları

Hasta	NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	VEGF (pg/ml)	ET (fentomol/ml)	IL-18 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
1	100,0	486,37	0,95	39,55	33,36
2	141,5	476,29	0,57	66,78	16,47
3	104,0	264,02	10,1	242,48	32,94
4	109,5	190,67	5,48	89,87	22,89
5	191,0	411,14	10,6	155,29	16,39
6	171,5	165,92	6,15	167,03	23,44
7	101,0	74,55	3,99	104,21	23,07
8	99,5	226,69	6,79	134,95	27,65
9	169,5	199,70	3,48	115,01	24,37
10	97,5	262,66	8,17	152,77	28,24
11	156,5	160,91	6,38	123,60	24,94
12	157,5	116,94	4,39	85,86	24,19
13	154,0	278,66	6,05	93,06	50,51
14	171,0	282,62	5,44	76,52	34,21
15	154,0	99,95	2,41	155,84	21,61
16	136,0	206,53	3,25	104,57	28,24
17	140,0	188,75	6,15	167,41	20,90
18	152,5	117,24	9,39	152,14	25,70
19	191,0	147,51	9,30	155,84	20,90
20	160,5	446,59	10,7	167,41	22,34
21	111,0	254,28	13,1	90,55	11,71
22	145,0	129,88	12,4	95,06	22,52
23	111,0	220,69	3,75	114,57	28,25
24	146,5	187,79	7,01	89,19	18,13
25	143,5	99,64	7,96	72,98	28,65
26	154,5	231,05	5,59	90,55	16,96
27	107,5	97,47	7,69	93,26	17,62
28	141,0	333,03	3,46	78,83	27,75
29	214,0	327,09	4,31	72,98	11,56
30	103,5	143,48	5,84	74,33	28,24
31	150,5	473,30	5,08	84,23	21,34
32	132,5	176,64	0,94	85,58	21,61
33	150,5	412,93	6,38	135,13	13,18
34	158,5	341,71	6,79	72,98	28,24
35	135,0	285,16	7,25	71,20	17,62
36	185,0	142,55	1,38	84,08	20,90
37	183,5	101,50	4,76	52,24	22,34
38	129,0	300,23	7,96	75,19	18,13
39	118,0	182,68	8,55	152,77	12,58
40	194,0	98,40	1,76	76,58	41,72
41	100,5	87,80	16,8	53,28	14,24
42	167,5	397,46	31,4	63,12	12,88
43	173,0	99,95	11,2	78,83	11,85
44	110,5	126,82	34,2	123,69	13,94

Başka herhangi bir hastalığı olmayan, kolorektal kanser teşhisi konulmuş, toplam 44 hastadan alınan serum numuneleriyle yapılan analizlerin sonuçları yukarıda tablo 6'da toplu olarak özetlenmiştir.

**Tablo-7 . Sağlıklı kontrollerin biyokimyasal analiz sonuçları**

Kontrol	NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	VEGF (pg/ml)	ET (fentomol/ml)	IL-18 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
1	21,0	35,17	2,13	75,19	10,99
2	47,5	79,63	3,67	25,63	9,89
3	49,5	63,59	10,1	27,37	12,29
4	25,5	57,01	11,8	49,60	17,46
5	56,0	74,87	12,8	79,19	15,50
6	37,5	28,02	4,44	33,45	12,14
7	30,5	79,63	14,3	25,20	13,03
8	65,5	21,22	7,31	14,82	13,18
9	66,5	54,68	1,31	24,76	12,29
10	26,5	53,34	6,53	27,37	11,71
11	19,5	24,47	5,40	22,17	14,24
12	67,5	17,81	7,25	39,55	14,09
13	31,0	71,67	1,83	46,11	11,14
14	29,5	80,26	5,29	28,67	8,19
15	37,5	49,61	4,92	30,40	9,22
16	48,0	46,87	5,29	16,12	10,99
17	46,5	71,67	3,93	35,63	11,85
18	39,5	44,10	9,39	18,28	7,94
19	102,5	74,55	9,77	12,24	16,14
20	83,5	62,61	14,1	6,23	11,56
21	55,5	83,10	11,6	8,37	10,44
22	32,0	34,06	7,69	20,87	12,58
23	15,5	99,64	10,8	26,50	18,29
24	50,0	87,80	0,19	47,42	10,98
25	63,5	126,80	11,6	34,32	17,79
26	50,0	95,91	9,49	30,40	10,71
27	38,5	71,99	7,25	41,30	18,46
28	41,5	78,36	7,89	44,36	18,81
29	52,5	116,63	13,1	47,86	12,29
30	30,5	74,55	6,10	54,44	12,43
31	28,0	127,72	4,11	36,50	10,85
32	31,5	126,49	0,10	80,07	16,30
33	38,0	34,54	5,15	80,96	10,85
34	32,5	49,26	30,7	79,20	14,87
35	43,0	56,40	22,4	29,97	13,33
36	26,0	68,50	19,4	18,28	14,71
37	46,5	40,78	23,2	27,80	15,66
38	22,0	80,63	20,0	29,97	12,88
39	43,5	81,08	20,0	64,57	13,48
40	50,0	85,58	20,0	9,12	11,71
41	44,5	61,33	19,4	4,18	15,34
42	55,0	67,60	41,2	15,83	13,33
43	38,0	68,50	2,87	19,84	22,52
44	58,5	67,15	18,3	6,43	16,96

Başka herhangi bir hastalığı olmayan, yaş olarak uyumlu toplam 44 sağlıklı kişiden alınan serum numuneleriyle yapılan analizlerin sonuçlarını içeren veriler tablo 7’de toplu olarak özetlenmiştir.

#### 4.2. KONTROL VE HASTA GRUBUNDAKİ BİREYLERİN DESKRİPTİF İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME SONUÇLARI.

Araştırmamızdaki 2 grubun deskriptif istatistiksel değerlendirme sonuçları tablo 8 ve 9'da sunulmuştur.

**Tablo 8- Kolorektal kanserli hastaların deskriptif istatistiksel değerlendirme sonuçları**

HASTA	NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	IL-18 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	ET (fmol/ml)	IL-2 (pg/ml)
Hasta sayısı	44	44	44	44	44
Ortalama	143,7159	105,2589	228,528	7,6205	22,8255
Standart Deviasyon	30,4891	41,0881	119,147	6,5399	8,0171
Standart Hata	4,5964	6,1943	17,9621	0,9859	1,2086
Minimum	97,5	39,55	74,55	0,57	11,56
Maksimum	214,00	242,48	486,37	31,40	50,51

**Tablo 9- Sağlıklı kontrollerin deskriptif istatistiksel değerlendirme sonuçları**

KONTROL	NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	IL-18 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	ET (fmol/ml)	IL-2 (pg/ml)
Kontrol sayısı	44	44	44	44	44
Ortalama	43,5795	34,0123	67,617	10,7750	13,3957
Standart Deviasyon	17,2394	21,0877	26,9743	8,4601	3,0570
Standart Hata	2,5989	3,1791	4,0665	1,2754	0,4609
Minimum	15,50	4,18	17,81	0,10	7,94
Maksimum	102,50	80,96	127,72	30,70	22,52

### 4.3. ÇALIŞILAN PARAMETRELERİN ORTALAMALARI VE GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRILMASI; ANLAMLILIK TESTLERİ.

**Tablo 10- Hastalarla kontrollerin tüm parametrelerde karşılaştırılması**

GRUPLAR	NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	IL-18 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	ET (fmol/ml)	IL-2 (pg/ml)
<b>Hasta sayısı</b>	44	44	44	44	44
Ortalama	143,7159	105,2589	228,528	7,6205	22,8255
Standart	30,4891	41,0881	119,147	6,5399	8,0171
Deviasyon					
Standart Hata	4,5964	6,1943	17,9621	0,9859	1,2086
Minimum	97,5	39,55	74,55	0,57	11,56
Maksimum	214,00	242,48	486,37	31,40	50,51
<b>Kontrol sayısı</b>	44	44	44	44	44
Ortalama	43,5795	34,0123	67,617	10,7750	13,3957
Standart	17,2394	21,0877	26,9743	8,4601	3,0570
Deviasyon					
Standart Hata	2,5989	3,1791	4,0665	1,2754	0,4609
Minimum	15,50	4,18	17,81	0,10	7,94
Maksimum	102,50	80,96	127,72	30,70	22,52
Asymp. Sig (2-tailed)	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,054	P=0,000
<b>Anlamlılık</b>	<b>p&lt;0,05 Anlamlı</b>	<b>p&lt;0,05 Anlamlı</b>	<b>p&lt;0,05 Anlamlı</b>	<b>p&gt;0,05 Anlamsız</b>	<b>p&lt;0,05 Anlamlı</b>

Kolorektal kanserli hastalar ile kontrol grubu T test ile karşılaştırıldığında serum NO, IL-2, IL-18 ve VEGF seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (p<0,05). ET açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

**Tablo 11- Serum NO• düzeylerinin hasta alt grupları ve kontrollerde birbirleriyle karşılaştırılması**

NO (µmol/L)	n	Ortalama	Std Dev.	Std. Hata	Anlamlılık
Kontrol	44	43,58	17,24	2,60	<b>P&lt;0,0001</b>
Evre 1-2	21	157,73	62,03	13,22	Anlamlı
Kontrol	44	43,58	17,24	2,60	<b>P&lt;0,0001</b>
Evre 3-4	23	141,35	29,48	6,15	Anlamlı
Evre 1-2	21	157,73	62,03	13,22	<b>P&gt;0,05</b>
Evre 3-4	23	141,35	29,48	6,15	Anlamsız

**Tablo 12- Serum IL-18 düzeylerinin hasta alt grupları ve kontrollerde birbirleriyle karşılaştırılması**

IL-18 (pg/ml)	n	Ortalama	Std Dev.	Std. Hata	Anlamlılık
Kontrol	44	34,01	21,08	3,17	<b>P&lt;0,0001</b>
Evre 1-2	21	101,01	37,51	8,00	Anlamlı
Kontrol	44	34,01	21,08	3,17	<b>P&lt;0,0001</b>
Evre 3-4	23	109,55	43,8	9,14	Anlamlı
Evre 1-2	21	101,01	37,51	8,00	<b>P&gt;0,05</b>
Evre 3-4	23	109,55	43,8	9,14	Anlamsız

**Tablo 13- Serum VEGF düzeylerinin hasta alt grupları ve kontrollerde birbirleriyle karşılaştırılması**

VEGF (pg/ml)	n	Ortalama	Std Dev.	Std. Hata	Anlamlılık
Kontrol	44	67,62	26,97	4,06	<b>P&lt;0,0001</b>
Evre 1-2	21	179,47	95,06	20,74	Anlamlı
Kontrol	44	67,62	26,97	4,06	<b>P&lt;0,0001</b>
Evre 3-4	23	273,32	123,04	25,66	Anlamlı
Evre 1-2	21	179,47	95,06	20,74	<b>P&lt;0,05</b>
Evre 3-4	23	273,32	123,04	25,66	Anlamlı



**Tablo 14- Serum IL-2 düzeylerinin hasta alt grupları ve kontrollerde birbirleriyle karşılaştırılması**

IL-2 (pg/ml)	n	Ortalama	Std Dev.	Std. Hata	Anlamlılık
Kontrol	44	13,4	3,05	0,46	<b>P&lt;0,0001</b>
Evre 1-2	21	24,5	6,6	1,37	Anlamlı
Kontrol	44	13,4	3,05	0,46	<b>P&lt;0,0001</b>
Evre 3-4	23	20,7	9,1	1,94	Anlamlı
Evre 1-2	21	24,5	6,6	1,37	<b>P&gt;0,05</b>
Evre 3-4	23	20,7	9,1	1,94	Anlamsız

Kontrol grubu ile evre 1-2 ve evre 3-4 subgrupları ayrı ayrı karşılaştırıldığında VEGF, IL-2, IL-18 ve NO parametrelerinde her iki subgrupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseklik tesbit edilmiştir (P<0,0001). Subgrupların kendi arasındaki karşılaştırmasında sadece VEGF parametresinde evre 1-2'ye göre evre 3-4'te anlamlı derecede yükseklik tesbit edilmiştir. Bu sonuçlara göre kolorektal kanserli hastalarda serum VEGF düzeyindeki artışın tümör evresi artışıyla doğru orantılı olduğunu düşünmekteyiz.

#### **4.4 VEGF gen polimorfizminin değerlendirilmesi :**

VEGF geni ile kolon kanseri arasındaki ilişkiyi inceleyen bu çalışmamızda PCR-RFLP yöntemi ile VEGF polimorfizmi bakımından 44 kolorektal kanser vakasının ve 43 kontrolün genotiplemesi yapıldı. İstatistiksel analize göre her iki polimorfizim için de hastalarla kontroller arasında allelik ilişki bulunamadı (VEGF G-634-C için  $\chi^2 = 2.956$ , df=2, P= 0.228; VEGF C-936-T için  $\chi^2 = 1.453$ , df=2, P= 0.484). Buna göre VEGF G-634-C polimorfizmi olan hastalarda genotip dağılımı %45,5 GG, %38,6 GC, %15,9 CC ve kontrollerde ise %27,9 GG, %53,5 GC, %18,6 CC olarak bulundu. Allelik frekanslar G alleli için; hastalarda %65, kontrollerde %55, C alleli için de; hastalarda %35, kontrollerde %45 olarak hesaplandı. Bunların beklenen oranları da G alleli için; hastalarda %60, kontrollerde %60, C alleli için de; hastalarda %40, kontrollerde %40 olarak hesaplandı. VEGF C-936-T polimorfizmi olan hastalarda ise genotip dağılımı %81,4 CC, %16,3 CT, %2,3 TT ve kontrollerde

ise %70.5 CC, %25.0 CT, %4.5 TT olarak bulundu. Allelik frekanslar C alleli için; hastalarda %83, kontrollerde %90, T alleli için de; hastalarda %27, kontrollerde %10 olarak hesaplandı. Bunların beklenen oranları da C alleli için; hastalarda %86, kontrollerde %86, T alleli; hastalarda %14, kontrollerde %14 olarak hesaplandı. Buna göre bu iki polimorfizmin kolorektal kanser oluşumunda bağımsız olarak risk oluşturmadığı bulundu.

**Tablo 15. VEGF G-634-C gen polimorfizminin hasta ve kontrol gruplarına göre genotip dağılımları:**

			VEGF G-634-C			Toplam
			GG	GC	CC	
Gruplar	Kontrol	Gözlenen	12	23	8	43
		Beklenen	15.8	19.8	7.4	43.0
		%	%27.9	%53.5	%18.6	%100,0
	Hasta	Gözlenen	20	17	7	44
		Beklenen	16.2	20.2	7.6	44.0
		%	%45.5	%38.6	%15.9	%100,0
Toplam		Gözlenen	32	40	15	87
		Beklenen	32.0	40.0	15.0	87.0
		%	%36.8	%46.0	%17.2	%100,0

**Tablo 16. VEGF C-936-T gen polimorfizminin hasta ve kontrol gruplarına göre genotip dağılımları:**

			VEGF C-936-T			Toplam
			CC	CT	TT	
Gruplar	Kontrol	Gözlenen	35	7	1	43
		Beklenen	32.6	8.9	1.5	43.0
		%	%81.4	%16.3	%2.3	%100,0
	Hasta	Gözlenen	31	11	2	44
		Beklenen	33.4	9.1	1.5	44.0
		%	%70.5	%25.0	%4.5	%100,0
Toplam		Gözlenen	36	18	3	87
		Beklenen	66.0	18.0	3.0	87.0
		%	%75.9	%20.7	%3.4	%100,0

**Tablo 17. Hasta ve kontrol gruplarına göre VEGF G-634-C gen polimorfizminin allellik dağılımı:**

<b>Allelik Frekanslar (VEGF G-634-C)</b>			
		<b>Hasta (%)</b>	<b>Kontrol (%)</b>
<b>G alleli</b>	<b>Gözlenen</b>	65.00	55.00
	<b>Beklenen</b>	60.00	60.00
<b>C alleli</b>	<b>Gözlenen</b>	35.00	45.00
	<b>Beklenen</b>	40.00	40.00

**Tablo 18. Hasta ve kontrol gruplarına göre VEGF C-935-T gen polimorfizminin allellik dağılımı:**

<b>Allelik Frekanslar (VEGF C-936-T)</b>			
		<b>Hasta (%)</b>	<b>Kontrol (%)</b>
<b>C alleli</b>	<b>Gözlenen</b>	83.00	90.00
	<b>Beklenen</b>	86.00	86.00
<b>T alleli</b>	<b>Gözlenen</b>	27.00	10.00
	<b>Beklenen</b>	14.00	14.00

## 5. TARTIŞMA

Kolorektal kanserler gastrointestinal sistemin en sık görülen kanseridir. Kolorektal kanserler, erkeklerde akciğer ve prostat, kadınlarda ise akciğer ve meme kanserinden sonra en sık görülen kanserlerdir. Erken tanı ve tedavi yöntemlerinin gelişmesi ile kolon kanserlerinden ölüm oranları giderek azalmaktadır.

Prognozla yakın ilişkili faktörler; tümörün barsak duvarındaki penetrasyon derinliği, bölgesel lenf bezlerinin tutulumu ve uzak metastaz varlığıdır. Beş yıllık sağ kalım oranları hastalık evrelendirmesinin prognostik önemini açıkça ortaya koymaktadır. En iyi sağ kalım evre 1 dedir, hastaların %90 dan fazlası 5 yıl yaşar. Evre 2 de bu rakam %60-80 arasına kadar düşer. Lenf bezi metastazı olanlarda (Evre 3) beş yıllık sağkalım oranı %20-50 arasındadır. Olumsuz prognostik etkisi olan diğer faktörler; tümörün kötü histolojik farklılaşma göstermesi (müsin üreten tümörler ile taşlı yüzük hücreli tümörlerde prognoz kötüdür), kanserin venöz ve perinöral invazyonu, barsak perforasyonu, yüksek CEA ve anöploid nükleustur.

Yukarıdaki bulguların ışığında; kolon kanserinin, tek bir hastalık olmayıp, farklı seyir ve prognozlara sahip, farklı patolojik süreçlerin birleşimi şeklinde ortaya çıkan kompleks bir klinik tablo olduğunu söyleyebiliriz. Uzun süreli sağ kalım, yalnızca erken tanıyla değil tümörün biyolojik davranışı ve malignite potansiyeli ile de belirlenmektedir. Klinik anlamda tanı için erken kavramı, gerçekte biyolojik olarak hiç de erken olmayabilir.

Bugüne değin kolorektal kanser için pek çok etkili tedavi modeli geliştirilmiştir. Ancak, her tedavi stratejisi kolorektal kanserli hastaların bir kısmı için etkili olmuştur. Bu nedenle, hastalığın doğal öyküsünü önceden tahmin edebilen, en elverişli tedavi stratejisini saptamaya izin veren ve hastalığın geleceğini değerlendirebilen prognostik faktörleri ortaya koymak çok önemlidir. Ayrıca benzer histopatolojik özelliklere sahip kolon karsinomlarının farklı klinik davranışlarını anlayabilmek, mortalite ve morbiditeyi azaltmak için yeni prognostik faktörler araştırılmaktadır.

Bu nedenle biz de, kolorektal karsinomlu hastalarda evresine göre, serum NO, IL-2, IL-18, VEGF ve ET konsantrasyonlarını ölçtük ve bu parametrelerin tanı, tedavi ve takipte bir prognostik faktör olup olmadıklarını araştırdık.

**IL-18**, bilindiği gibi,  $\gamma$ -IFN indükleyici faktördür. Ek olarak; T hücrelerin proliferasyonu, NK hücrelerin sitotoksik aktivitesinin arttırılması, NK ve T hücrelerinden GM-CSF sekresyonunu uyarması gibi değişik biyolojik fonksiyonlarda da rol alır .

Antitümöral yanıtta, makrofajlar tümör hücreleriyle ilk karşılaşan immün hücrelerdir ve tümör hücrelerini fagosite ederler. Bir süre sonra tümör antijenleri makrofaj yüzeyinde belirir. Yardımcı T hücreleri makrofaj yüzeyine çıkan tümör antijenini tanıyarak bağlanır. Bu bağlanma makrofajlardan IL-1 ve TNF- $\alpha$ , yardımcı T hücrelerinden de IL-2 ve  $\gamma$ -IFN salgılanmasını stimüle eder. IL-2 ve  $\gamma$ -IFN'da T ve yardımcı T hücrelerinin proliferasyonunu, ayrıca NK hücrelerin çoğalmasını ve sitotoksik aktivitesinin arttırılmasını uyarır. NK hücreleri, tümör antijenini taşıyan tüm hücreleri, makrofajlar da dahil, yok etmeye çalışır. Bu durumda, IL-18'in antitümöral yanıtta katkıları beklenen bir süreçtir. Zaten serum IL-18 düzeylerinin, kanser patogeneziyle ilişkili olduğu ve hastaların klinik sonuçlarına etki edebileceğini öne süren raporlar mevcuttur (60,61,62).

Araştırmamızda kolon kanserli hastaları lenf nodu metastazı (Evre 3) ve uzak metastaz (Evre 4) yapıp yapmamalarına göre EVRE 1-2 ve EVRE 3-4 olarak iki alt gruba ayırdık.

Çalışmamızda, kolorektal kanserli hastalarda serum IL-18 seviyesini kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulduk (**Hasta: 105,2589 Kontrol: 34,0123 p=0,000**).

Tümör evrelemelerine göre oluşturulan alt grupları, kontrol grubuyla ayrı ayrı kıyasladığımızda, iki alt grubun da serum IL-18 düzeyleri açısından kontrol grubuna göre yüksek olduğunu tespit ettik ( $p<0,0001$ ).

Ardından alt grupları kendi aralarında karşılaştırdığımızda serum IL-18 düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık olmadığını gözlemledik ( $p>0,05$ ). Bu sonuçlar ışığında, bizim çalışmamıza göre, kolon kanserli hastalarda serum IL-18 düzeyleri artmaktadır fakat bu artış tümör evresi artışından etkilenmemektedir diyebiliriz.

Bizim çalışmamıza benzer şekilde, IL-18 ve kanser arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma vardır. Mesela Taniguchi ve arkadaşları, akut ve kronik lösemili hastalarda, serum IL-18 seviyesinin, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış

gösterdiğini tespit etmişlerdir ve serum IL-18 seviyesinin, hematolojik malignensilerin tedavi ve takibinde kullanılabilecek sensitif bir belirteç olabileceğini önermişlerdir (61).

Yine farklı bir çalışmada Tokubo ve arkadaşları, non-hodgkin lenfomalı hastalarda serum IL-18 seviyesini kontrollere göre yüksek bulmuşlar ve IL-18'in yeni bir prognostik belirteç olması gerektiğini ileri sürmüşlerdir (60).

Kawabata ve arkadaşları, mide kanserinde, cerrahi öncesi serum IL-18 seviyesinin önemli bir prognostik belirteç olabileceğini ve tüm evrelerde yüksek serum IL-18 düzeyleri olan hastaların sağ kalım süresinin, düşük serum IL-18 seviyeli hastalara göre daha kısa olduğunu tespit etmişlerdir (63).

Merendino ve arkadaşları, karaciğer ve kemik metastazı olan meme kanserli hastalarda serum IL-18 seviyesinin kontrol grubuna göre daha yüksek seviyelerde olduğunu göstermişlerdir (64).

Tasaki ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmaya göre kolorektal kanserli hastalarda serum IL-18 miktarında artış gözlenmektedir. IL-18 salınımındaki artışın T helper hücre tip 1(Th1) bağışıklık yanıtının ortaya çıkmasına neden olarak güçlü antitümör etkiler gösterdiğini belirtmişlerdir (65). Yukarıdaki tüm bu araştırmalar bizim çalışmanın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Pages ve arkadaşları ise, kolon kanserinde erken safhada, IL-18 lokal üretiminin azalmasının ve immün hücre aktivasyonunun bozulmasının tümör büyümesine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (62). Bu çalışmadaki IL-18 düşüklüğü, aslında bizim sonuçlarımızla çelişmemektedir, çünkü bizim araştırmamızdaki hastalar tümörün orta ve ileri evrelerini de kapsamaktadırlar. Bu bulgular, malignensi gelişirken başlangıçta henüz bilemediğimiz biyokimyasal etkileşimlerle doku IL-18 seviyesinin düştüğünü ve bunun tümörün gelişmesini hızlandırdığını, ardından organizmanın buna yanıt olarak antitümöral etkisi bilinen IL-18'i uyararak kompansasyona çalıştığını düşündürmektedir.

Bu sonuçlar, kolon kanserli hastalardaki serum IL-18 düzeyi artışının kolon kaynaklı tümör hücrelerinin yok edilmesi için immün sistemin geliştirdiği savunma mekanizmalarından biri olan IL-18 indüksiyonu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Bu artış kolon kanserine spesifik değildir. Bu durum

malignansilerde IL-18'in genel bir prognostik faktör olmasını destekleyici bulgulardır.

Serumda total nitrit ölçümü, **NO** radikal oluşumu için bir belirteç olarak kullanılabilir. Çünkü NO süratle nitrite ( $\text{NO}_2$ ) ve o da hemoglobin tarafından kısa sürede ( $> \%95$  saatte) nitrata ( $\text{NO}_3$ ) okside olur. NO'in oluştuğu anda ölçülmesi neredeyse imkansızdır. Bu yüzden NO'in bir göstergesi olarak total  $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$  ölçülmelidir. Bizim araştırmamızda ortamdaki  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ 'e redükte edildi ve sonuçta total nitrit ( $\text{NO}_2$ ) ölçümü yapıldı. Bu  $\text{NO}_2$ , ortamda bulunan  $\text{NO}^*$  radikalinin bir göstergesi olarak kullanıldı.

Çalışmamızda, kolon kanserli hastalarda serum NO seviyesini kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulduk (**sırasıyla Hasta: 143,7159 Kontrol: 43,5795 p=0,000**).

Tümör evrelemelerine göre oluşturulan alt grupları, kontrol grubuyla ayrı ayrı kıyasladığımızda, iki alt grubun da serum NO düzeyleri açısından kontrol grubuna göre yüksek olduğunu tespit ettik ( $p<0,0001$ ).

Ardından alt grupları kendi aralarında karşılaştırdığımızda serum NO düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık olmadığını gözlemledik ( $p>0,05$ ). Bu sonuçlar ışığında, bizim çalışmamıza göre, kolorektal kanserli hastalarda serum NO düzeyleri artmaktadır fakat bu artış tümör evresi artışından etkilenmemektedir diyebiliriz.

Elimizdeki bu veriler, kolorektal kanserli hastalardaki serum NO konsantrasyonu artışının primer tümörün oluşumundan kaynaklandığını gösteriyor. Bilindiği gibi, NO fizyolojik konsantrasyonlarda organizmanın pek çok farklı normal biyokimyasal süreçlerinde (vasodilatasyon, nörotransmisyon vb.) görev alan bir moleküldür. Fakat fizyolojik konsantrasyonların altındaki ve üstündeki değerleri, pek çok patofizyolojik tabloyla (tümörögenезis, anjiogenезis ve apoptozisin indüksiyonu vb.) ilişkilidirler (67). Bu özelliklerinden dolayı serum NO konsantrasyonun tümör patofizyolojisiyle ilişkilendirilmesi beklenen bir süreçtir. Fakat tümörögenезisde yüksek bulunan NO düzeyleri araştırmacılar tarafından farklı farklı yorumlanmıştır. Mesela Cui ve arkadaşları NO'in, apoptozisi uyatarak tümör büyümesini ve metastazı önleyebildiğini (68), diğer yandan ise Nathan C. ve ayrıca Leibovich ve arkadaşları, artmış NO aktivitesinin, DNA hasarına yol açarak, immüsupresyonu indükleyerek,

vazodilatasyon ve anjiogenez yaparak tümör büyümesini ve metastazı ilerletebileceğini yayınlamışlardır (69,70).

Hazar ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada kolon kanserli hastaların serumlarında NO düzeyinin arttığı tesbit edilmiş ve yine bizim çalışmamızda da olduğu gibi bu artış düzeyinin hastalığın evresiyle ilgili olmadığı anlaşılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda NO'in kolon kanseri patogeneğinde etkili olduğu belirlenmiştir. Standart kemoterapiye ilave olarak NOS inhibitörlerinin tedaviye eklenmesinin kolon kanseri tedavisinde faydalı olacağını ileri sürmüşlerdir (71).

Rao ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ayrıca Helmuth ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada da kolon tümörlü hastaların serumlarında NO seviyelerinin arttığı tesbit edilmiştir. Kolon kanserinin medikal tedavisinde selektif iNOS inhibitörlerinin rolü olabileceği düşünülmektedir (72,73).

Lagares Garcia ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir doku çalışmasında kolon kanserli hastalarda iNOS aktivitesinin arttığı saptanmıştır ancak bizim çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada tümör çapı, lenf nodu metastazı ve uzak organ metastaz durumuyla pozitif bir korelasyon tesbit etmişlerdir (74).

Kojima ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir doku çalışmasında da artmış iNOS düzeyleri ve NO ürünlerinde artış tesbit edilmiştir. Bu artışın tümöre bağlı immüsupresyona katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (75).

Moochhala ve arkadaşlarının yapmış oldukları doku çalışmasında ise NOS düzeylerinin kolon tümörlü hastalarda azaldığı tesbit edilmiştir (76).

Bilindiği gibi, NO organizmada geniş bir hücre yelpazesinde (damar endoteli, nöronlar, trombositler, karaciğer hücreleri, böbrek hücreleri, immün sistem hücreleri vb.) üretilir. Kolon karsinomlu hastalarda yapılan çalışmalara göre, tümör dokusunda ciddi bir makrofaj infiltrasyonu vardır (77). Bize göre bu hastalardaki NO artışının kaynağı, ağırlıklı olarak bu makrofajlardan iNOS aracılığıyla üretilen NO'dur. Çünkü organizmada başta makrofajlarda olmak üzere immün sistem hücrelerinde ağırlıklı olarak bulunan iNOS, özellikle TNF- $\alpha$  aracılığıyla indüklenerek



makrofajlarda yüksek düzeyde NO üretme kapasitesine sahiptir. Üstelik iNOS indüklendiğinde, NO üretimi, cNOS'daki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce devam edebilir (57). Dolayısıyla makrofajlar, tümör hücrelerinden ve vücuttaki diğer hücrelerden daha fazla seviyelerde NO üretebilirler ve NO sentezinin ana kaynağıdır (69). Makrofajlardaki bu yüksek miktardaki NO, yüksek enerji gereksinimi ve metabolizması olan tümör hücresindeki Fe-S taşıyan enzimleri nitrolayarak antitümöral sitotoksik etki gösterir. Aynı mekanizmayla mitokondriyal elektron transport zinciri enzimlerinin aktivitesini azaltır. Yine NO, tümör hücresindeki ribonükleotid redüktaz'ı inhibe ederek DNA sentezini engeller.

Yukarıdaki doku ve serum çalışmalarında görüldüğü gibi, temelde hepsi bizim; kolon kanserli hastalarda serum NO seviyesi artar şeklindeki sonucumuzu desteklemektedirler. Fakat NO artışının tümör çapı, lenf nodu ve uzak metastaz durumlarından etkilenmediği durumuyla ilgili sonuçları, bizimle ve kendi aralarında farklılık göstermektedir.

Bize göre, kolon kanserli hastalardaki serum NO artışı, tümör hücrelerine karşı immün yanıtta makrofajların tümör dokusuna aşırı miktarda infiltrasyonu ve iNOS aracılığıyla uzun süre üretilen NO' in bu antitümöral etkiye katkı sağlamasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca kolon kanserli hastalarda serum NO artışı, tümör çapı, lenf nodu ve uzak metastaz durumlarından etkilenmediği için, NO'in tümör anjiogenezinde etkin bir rolü olmadığını düşünmekteyiz.

**VEGF**, birçok insan tümöründe, anjiogenez gelişimi için gerekli olan güçlü bir mitojendir . Bilindiği gibi, anjiogenez, yeni kapillerlerin gelişimi, tümör büyümesi ve metastazında önemli bir rol oynar. Bu yüzden kolon kanserinde, prognoz ve metastaz için kritik bir belirteç olduğuna inanılan VEGF'nin değerlendirilmesi önemlidir.

Kolon kanserli hastalarda tümör dokusundan VEGF salınımının direkt olarak tümör içi mikrodamar dansitesiyle korele olduğunu ve tümör anjiogenez kapasitesini artırdığını ve bu yüzden tümör belirteci veya prognostik faktör olarak kullanılabileceğini öneren çalışmalar vardır (80,81).

Yaptığımız makale taramalarında, kolon kanseri ile VEGF arasındaki ilişkiyi anlatan araştırmaların büyük çoğunluğunun doku çalışması olduğunu tespit ettik.

Bilindiği gibi dolaşımdaki VEGF'nin kaynağı netice itibarıyla çeşitli dokulardaki hücrelerdir. Hücrelerden sızan VEGF serumda belli bir düzey oluşturur. Yani doku çalışmalarındaki veriler indirekt olarak serumla da ilişkilidir (82). Ancak pratikte doku çalışması, serum çalışmasına göre, hasta için uzun ve zahmetli bir süreçtir. Çünkü doku çalışması invazivdir ve ayrıca araştırmacının bireysel yeteneğinden etkilenebilir. Bu nedenle tümör dokusunun uygunsuz bölgesinden VEGF çalışılabilmesi gibi dezavantajları da olabilir. Tedaviye cevabın izlenmesi ve relaps için hastanın takibi açısından tekrar doku VEGF çalışması neredeyse imkansızdır, bu yüzden relaps ve takip için doku VEGF seviyesi uygun bir belirteç olarak kullanılamaz. Bu nedenlerden dolayı bu sitokin dolaşımdaki seviyelerinin araştırmalara dahil edilmesi gereksinimi oluşmaktadır ve yapılan araştırmalar serum VEGF seviyesinin potansiyel olarak ümit verici bir aday belirteç olacağını düşündürmektedir (80,81,83,84).

Çalışmamızda, kolon kanserli hastalarda serum VEGF seviyesini kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulduk (**sırasıyla Hasta: 228,528 Kontrol: 67,617 pg/ml; p=0,000**).

Tümör evrelemelerine göre oluşturulan alt grupları, kontrol grubuyla ayrı ayrı kıyasladığımızda, iki alt grubun da serum VEGF düzeyleri açısından kontrol grubuna göre yüksek olduğunu tespit ettik ( $p<0,0001$ ).

Ardından alt grupları kendi aralarında karşılaştırdığımızda serum VEGF düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık olduğunu gözlemledik ( $p<0,05$ ). Bu sonuçlar ışığında, bizim çalışmamıza göre, kolon kanserli hastalarda serum VEGF düzeylerinin arttığını ve bu artışın tümör evresi artışıyla doğru orantılı olduğunu söyleyebiliriz.

Solid tümörün gelişimi sürecinde, başlangıçta, büyüyen tümörler, besinlerin tümör hücresi içine alınmasında ve metabolik atıkların hücre dışına atılmasında, difüzyon yolunu kullanabilirler. Ancak difüzyon mekanizması, lezyonun belirli bir boyutun üzerinde ( $0,5 \text{ mm}^3$ ) büyümeye devam etmesini desteklemeye yeterli olmamaktadır (85). Bu durumda avasküler tümör dokusunun progresyonu için neovaskülarite gereksinimi ortaya çıkar. Bu nedenle anjiogenik aktivitenin arttırılması için VEGF ve hipoksi gibi bazı anjiogenik stimuluslar tümör dokusunun büyümesi için devreye girerler (85).

Tsai ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmaya göre kolorektal kanserli hastaların serum VEGF düzeylerinde sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir artış tesbit etmişlerdir. Ayrıca VEGF artış düzeyinin hastaların tümör evreleriyle pozitif korelasyon gösterdiğini tesbit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada VEGF nin tamamlayıcı bir tümör marker olarak kullanılması önerilmektedir. Bizim çalışmamızdaki bulgularımız da bu çalışmadaki bulgularla uygunluk göstermektedir (86).

Abdou ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir doku çalışmasında ise VEGF nin erken dönemdeki kolorektal karsinomlu hastalarda arttığı, tümörün progresyonuyla VEGF düzeyinin azaldığını belirlemişlerdir. Bu çalışmadaki bulgular bizim çalışmamızla uygunluk göstermemektedir. Yine aynı çalışmada mast hücrelerini de içeren enflamatuvar hücrelerin kolorektal karsinom anjiogenezinde rol aldıklarını ileri sürmüşlerdir (87).

Logan ve Collins in peritoneal yüzey metastazı bulunan kolorektal tümörlü hastalarda yapmış oldukları bir doku çalışmasına göre ise ortalama VEGF düzeyleri ile hastaların surveyleri arasında negatif bir korelasyon olduğunu tesbit etmişlerdir (88).

Guba ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada da kolorektal tümörlü hastaların VEGF düzeyleri yüksekliğinin metastatik hastalık ve kötü prognozla korele olduğunu tesbit etmişlerdir ve kolorektal kanserli hastalarda anti VEGF tedavi stratejilerinin önemine dikkat çekmişlerdir (89).

Cascinu ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada kolorektal kanserli hastalarda VEGF ekspresyonunun arttığını bu artışın tümör evresiyle korele olduğu ancak VEGF ekspresyonunun intraabdominal metastazda karaciğer metastazına oranla daha belirgin arttığı saptanmıştır (90).

Bizim araştırmamızın sonuçları, tümör dokusunun hücre sayısı ve kitlesi arttıkça hücrelerin metabolizması açısından difüzyon mekanizmasının yetersizleşeceğini ve VEGF aracılı neovaskularizasyonun gelişerek tümör hücrelerinin gereksinimlerinin karşılanmaya çalışıldığını kuvvetle desteklemektedir.

Tüm bu veriler ve bizim araştırma bulgularımız, genel olarak kolon kanserli hastalarda doku ve serumda VEGF'nin arttığını kuvvetle desteklemektedir. Fakat bu artışın tümör evresi ile ilişkisi, araştırmalara göre farklılık göstermektedir. Bu konuda ileri araştırmalar gerekmektedir.

VEGF gen polimorfizmini araştırdığımız çalışmamızda ise hasta popülasyonunda kontrollere göre VEGF plazma değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmasına rağmen ( $p < 0,0001$ ) sayının çok az olması nedeniyle bu plazma değerleri ile genotipler arasında korelasyon kurulamamıştır.

Bu çalışmada VEGF genin VEGF G634C (rs2010963) ve VEGF C936T (rs3025039) polimorfizmleri ile kolon kanseri arasındaki ilişki incelenmiştir. Sonuç olarak bu iki polimorfizmin kolon kanserine yatkınlık sağlayan bağımsız risk faktörleri olmadığı bulunmuştur (VEGF G-634-C için  $\chi^2 = 2.956$ ,  $df=2$ ,  $P= 0.228$ ; VEGF C-936-T için  $\chi^2 = 1.453$ ,  $df=2$ ,  $P= 0.484$ ). Ayrıca hastalarda -634C ve -936T alleleri için allelik frekanslar sırasıyla %35 ve %27 olarak, kontrollerde de -634C ve -936T için sırasıyla %45 ve %10 olarak bulunmuştur.

VEGF ya da VEGF'nin tüm ailesinin tüm üyelerinin genlerindeki DNA varyasyonları VEGF üretimini veya aktivitesini değiştirebileceğinden bu varyasyonlar tümörlerin gelişiminde ve yayılmasında bireyler arasındaki farklılıklar yaratabilir. VEGF gen polimorfizminin kolon kanseri ile ilişkisini araştıran az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmaların sonuçları oldukça çelişkilidir.

Chae ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Kore halkında -634 G>C polimorfizminin GC ve CC genotipleri birlikte ele alındığında ve -634C/936C haplotipi ve -634G/936T haplotiplerine bakıldığında bunları taşıyan bireylerin kolorektal karsinomaya yakalanma risklerinin düşük olduğu TT genotipindekilerin ise kolorektal karsinom açısından agresif klinik özelliklerle bağlantılı olduğu gözlenmiştir (105). Kore halkında yapılmış diğer bir çalışmada da 634GC ve CC genotipindeki hastaların sağkalım süresi GG genotipindekilere kıyasla daha fazla olduğu ve 936CT veya TT genotipindeki hastaların da CC genotipindekilere kıyasla daha kötü prognoza sahip oldukları gösterilmiştir (104).

Watson ve arkadaşları da VEGF 634G>C polimorfizmi için GG genotipinin anlamlı olarak serumda yüksek VEGF üretimine neden olduğunu göstermişlerdir (106).

Hofman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise VEGF G634C ve VEGF C936T polimorfizimleri ile kolorektal kanser arasında ilişki olmadığı bulunmuştur (103).

Çalışmaların çelişkili sonuçları çalışmalarda kullanılan hasta ve kontrol sayısının çok farklı olması ve etnik kökenlerin aynı olmaması ile açıklanabilir. Ayrıca VEGF geninde birçok SNP'nin bulunması ve çalışmalarda farklı SNP'lere bakılması da bu konuda henüz kesin bir sonucun bulunmamasını açıklamaktadır.

Sonuç olarak hasta sayısının az olması ile birlikte bu çalışmada elde edilen bulgular Hofman ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonuçları ile uyum göstererek VEGF G634C ve VEGF C936T gen polimorfizimlerinin kolon kanserine yatkınlık sağlayan bağımsız risk faktörleri olmadıklarını göstermektedir

**IL-2**, T ve B hücrelerin büyümesi ve differansiasyonu için gerekli olan ve NK hücrelerinin sitolitik fonksiyonunu arttıran lenfositotrofik bir hormondur; ayrıca birçok lenfoid olmayan hücrelerin proliferasyonunda da rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca IL-2, endotel, intestinal epitelyumu ve sinir hücrelerini de içeren normal dokularda da tespit edilmiştir .

Çalışmamızda, kolon kanserli hastalarda serum IL-2 seviyesini kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulduk (**sırasıyla Hasta: 22,8255 Kontrol: 13,3957 pg/ml; p=0,000**).

Tümör evrelemelerine göre oluşturulan alt grupları, kontrol grubuyla ayrı ayrı kıyasladığımızda, iki alt grubun da serum IL-2 düzeyleri açısından kontrol grubuna göre yüksek olduğunu tespit ettik ( $p<0,0001$ ).

Ardından alt grupları kendi aralarında karşılaştırdığımızda serum IL-2 düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık olmadığını gözlemledik ( $p>0,05$ ). Bu sonuçlar ışığında, bizim çalışmamıza göre, kolon kanserli hastalarda serum IL-2 düzeyleri artmaktadır fakat bu artış tümör evresi artışından etkilenmemektedir diyebiliriz.

Genel olarak, malignensilerde yapılan doku çalışmalarında IL-2 ekspresyonu bizim çalışmamızda olduğu gibi yüksek tespit edilmiştir. Örneğin mide, böbrek ve spinosellüler kanserleri (91), baş-boyun squamoz hücre karsinomları (92), melanomalar, nöroblastik tümörler (93) ve prostat kanserleri (94) gibi aktif büyüyen tümörlerde IL-2 ve IL-2R'nün artmış ekspresyonu olduğunu ve artan IL-2 ekspresyonunun tümör hücre büyümesini stimüle ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca IL-2'nin, hücre siklusunun mitoz fazında daha çok bulunduğunu ve bu nedenle hızlı mitoz gösteren tümöral hücrelerde normal hücrelere göre daha fazla IL-2 bulunduğunu gösteren araştırmalar vardır (91,92).

Baier ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir doku çalışmasında normal mukozadaki IL-2 seviyesine göre kolon tümör hücrelerinde anlamlı IL-2 seviyesi düşüklüğü gözlenmiştir. Bunu Th-1 hücrelerine bağlı spesifik immün cevabın baskılanması sonucunda olduğu kanaatine varmışlardır (95).

Berghella ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir serum çalışmasında kolon tümörlü hastaların serumlarındaki IL-2 düzeyi sağlıklı bireylerin serum IL-2 düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek tesbit edilmiştir. Çalışmanın bu kısmı bizim çalışmamızla uyumludur. Ancak bu çalışmada bizim çalışmamızın aksine IL-2 düzeyinin tümör çapı, lenf nodu metastaz durumu ve uzak metastaz durumu ile pozitif korelasyon gösterdiği tesbit edilmiştir (96).

Caporale ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir araştırmada da, IL-2'nin lokoreyonel uygulanmasının murine kolon karsinomasında gerilemeyi sağladığı gösterilmiştir (97). Yapılan başka bir araştırmada da, IL-2'nin sistemik uygulanmasının metastatik murine renal karsinomasında gerilemeyi sağladığı gösterilmiştir (98); muhtemelen bu etkisini  $\gamma$ -IF, TNF- $\alpha$  ve IP-10 (human interferon indükleyici protein) gibi antianjiogenik ürünleri indükleyerek yapmaktadır. Bu bulgular bazı araştırmacıların, endojen IL-2'nin hücre proliferasyonunu stimüle ettiği, eksojen IL-2'nin ise proliferasyonu inhibe ettiği, sonucuna varmalarına yol açmıştır (99). Ancak bunun patofizyolojisi halen net değildir.

Yukarıdaki sonuçlardan da anlaşıldığı gibi kolon kanserli hastalarda IL-2 çalışmalarında değişik sonuçlar elde edilmektedir. Serum IL-2 ve kolon kanseri arasındaki ilişkiyi daha iyi açıklamak için daha ileri ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bilinen en güçlü vazokonstriktör peptid olan **endotelinin** kanserdeki rolüne, giderek artan bir ilgi vardır. Araştırmalara göre 3 tip ET (ET-1, ET-2 ve ET-3) ve 3 tip ET reseptörü (ET-RA, ET-RB ve ET-RC) vardır. Araştırmamızda kolon kanserli hastalarda serumda total ET seviyesini ölçerek aralarındaki ilişkiyi değerlendirdik.

Sağlıklı kontrol grubu ile kolorektal kanserli hastalar arasında serum ET seviyesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık (**sırasıyla Hasta: 7,6205 Kontrol: 10,7750 pg/ml; p>0,05**).

Bu sonuçlar bize, serum ET seviyesinin, kolorektal kanser patofizyolojisi ve dolayısıyla kliniği üzerine gözle görülür bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Serum ET seviyesinin kolorektal kanserli hastalarda arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Eberl ve arkadaşlarını yapmış olduğu çalışmada Endotelin 1 tümör hücrelerinde otokrin/parakrin Growth factor olarak veya antiapoptotik faktör olarak görev aldığı tespit edilmiştir. Endotelin reseptör antagonistlerinin insan kolon kanser hücrelerinde proapoptotik ve antiproliferatif etki gösterdiklerini tespit etmişlerdir (100). Asham ve arkadaşlarının çalışmasında kolorektal kanserli hastalarda endotelin1 düzeylerindeki artış tespit edilmiştir ve endotelin reseptör A antagonizması ile tümör büyümesinin yavaşlatılabileceği saptanmıştır (101).

Arun ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmaya göre ise özellikle hepatik metastazı bulunan kolon kanserli hastalarda ET-1 düzeylerinde artma gözlenmiştir. Bu yüzden plazma büyük ET-1 düzeyleri hepatik metastazı olan hastaları erken dönemde saptamak için potansiyel tümör markırı olarak değerlendirilebileceğini önermişlerdir (102).

Yukarıdaki bahsedilen çalışmaların sonuçları, bizim sonuçlarımız ile uyumluluk göstermemektedir. Fakat NO'nun ET-1 sentezini inhibe ettiğini (42) göz önünde bulundurursak bizim araştırmamızda tespit edilen yüksek seviyelerdeki NO'nun ET seviyelerinin artmasını engellediğini düşünmekteyiz. Literatürde ET-kolon kanseri ilişkisini araştıran çalışmalar henüz yetersizdir. Sonuçta kolon kanseri ile serum ET seviyesi arasındaki ilişkiyi açıklamak için daha ileri ve geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Kolorektal kanserli hastalarda serum IL-18 seviyesi sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir. Bu durum IL-18'in,  $\gamma$ -IFN'u indükleyerek immün sistem hücrelerini harekete geçirip tümör hücrelerini yok etmeye çalışmasından kaynaklanmaktadır.

IL-18 seviyesindeki bu yükselme ile tümörün evresi arasında istatistiksel olarak bir ilişki saptanmamıştır. Bu durum oluşan tümör hücrelerinin farklılaşması, tümörün büyümesi ve anjiogenez kapasitesi üzerine serum IL-18 seviyelerinin prognostik bir belirteç olarak kullanılamayacağını düşündürmektedir. Fakat IL-18, kolorektal kanser tanısında, tedavide (antitümöral etkisinden dolayı) ve hatta tedavi takibinde kullanılabilir.

2. Kolorektal kanserli hastalarda serum NO seviyesi sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir. Bu durum tümör hücrelerini yok etmek için tümör dokusunda artan makrofajlarda ve diğer immün hücrelerde, TNF- $\alpha$ 'nın iNOS'u indükleyerek NO üretmesinden ve NO'in tümör hücrelerini apoptozise uğratarak antitümöral etkiye katkı sağlamaya çalışmasından kaynaklanmaktadır.

NO seviyesindeki bu yükselme ile tümörün evresi arasında istatistiksel olarak bir ilişki saptanmamıştır. Bu durum, oluşan tümör hücrelerinin farklılaşması, tümörün büyümesi ve anjiogenez kapasitesi üzerine, serum NO seviyelerinin prognostik bir belirteç olarak kullanılamayacağını düşündürmektedir. Fakat kolorektal kanser tanısında ve en azından tedavinin takibinde bir belirteç olarak kullanılması düşünülebilir.

3. Kolorektal kanserli hastalarda serum IL-2 seviyesi sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir. IL-2 seviyesindeki bu yükselme ile tümörün evresi arasında istatistiksel olarak bir ilişki saptanmamıştır. Bu durum oluşan tümör hücrelerinin farklılaşması, tümörün büyümesi ve anjiogenez kapasitesi üzerine serum IL-2 seviyelerinin prognostik bir belirteç olarak kullanılamayacağını düşündürmektedir. Fakat IL-2, kolorektal kanser tanısında, tedavide (antitümöral etkisinden dolayı) ve hatta tedavi takibinde kullanılabilir.

4. Serum ET seviyesi açısından, kolorektal kanserli hastalarla sağlıklı kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur. Ayrıca kolorektal kanserli



hastalarda serum ET seviyesi ile tümörün evresi arasında da bir ilişki saptanamamıştır.

**5.** Kolorektal kanserli hastalarda serum VEGF seviyesi sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir. Bizim araştırmamızdaki bulgularımıza göre tümör evresi arttıkça serum VEGF seviyesi de istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmektedir. Dolayısıyla VEGF seviyesindeki bu yükselme ile tümörün çapı, lenf nodu metastazı ve uzak organ metastazı durumu arasında istatistiksel olarak bir ilişki saptanmıştır. Bu yüzden serum VEGF seviyelerinin kolorektal kanserli hastalarda klinik tanı ve nükslerde bir tümör belirteci olarak ve ayrıca hastalığın kliniği hakkında bilgi veren bir prognostik faktör olarak da kullanılabilmesinin önerilebileceği kanaatindeyiz.

**6.** Kolorektal kanserli hastalarda VEGF gen polimorfizmi araştırıldığında çalışmamızda elde edilen bulgular VEGF G634C ve VEGF C936T gen polimorfizimlerinin kolon kanserine yatkınlık sağlayan bağımsız risk faktörleri olmadıklarını göstermektedir. Biyokimyasal ve genetik sonuçların korele edilmesi için daha geniş popülasyonlu çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bu önerileri aydınlatmak ve netleştirmek için daha ileri ve geniş kapsamlı araştırmalara gereksinim vardır.

## 7. ÖZET

**Giriş:** Kolorektal kanser gastrointestinal sistemin en sık görülen kanseridir. Kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında meme kanserinden sonra ikinci sıradadır. Erkeklerde ise akciğer ve prostat kanserinden sonra üçüncü sıradaki en sık ölümcül kanserdir. Araştırmamızın temel amacı; kolorektal kanserli hastalarda anjiogenezle ilişkisi bulunan NO, IL-2, IL-18, ET ve VEGF parametrelerinin kantitatif olarak ölçülerek, tümör evreleri ile ilişkilerinin ve etkileşimlerinin incelenmesidir. Ayrıca VEGF gen polimorfizminin kolorektal kanser ile ilişkili olup olmadığının belirlenmesi de amaçlanmıştır.

**Metod:** Bu çalışmada, kolon kanserli 44 hastada ve 44 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubunda serum IL-18, IL-2, VEGF, ET ve NO seviyeleri ölçüldü. Ayrıca bu kişilerde VEGF geninin VEGF G634C ve VEGF C936T polimorfizimleri incelendi.

**Sonuçlar:** Kolon kanserli hastalarda serum IL-18, VEGF, IL-2 ve NO seviyeleri kontrollere göre anlamlı derecede daha yüksekti ( $p<0,05$ ). Fakat, serum ET seviyeleri kolon kanserli hastalarda ve kontrol grubunda benzer bulundu.

Tümör evrelemelerine göre oluşturulan alt grupları (EVRE 1-2 ve EVRE 3-4) kendi aralarında karşılaştırdığımızda ise evre 1-2 alt grubuna göre evre 3-4 alt grubunda anlamlı derece serum VEGF düzeyinin arttığı tesbit edildi ( $p<0,05$ ). Diğer parametrelerde alt gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

VEGF G634C ve VEGF C936T gen polimorfizimleri incelendiğinde kolon kanserine yatkınlık sağlayan bağımsız risk faktörleri olmadıkları görüldü (VEGF G-634-C için  $P= 0.228$ ; VEGF C-936-T için  $P= 0.484$ ).

Sonuç olarak; serum IL-18, VEGF, IL-2 ve NO seviyeleri kolorektal kanserli hastaların tanısında ve hatta tedavinin takibinde faydalı bir belirteç olabilir, bununla beraber serum VEGF seviyesi kolorektal kanserli hastalarda prognozu öngeren bir tümör belirteçi olarak kullanılabilir. Bu sonuçları netleştirmek için uzun süre takibli daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca VEGF gen polimorfizminin kolorektal kanserle ilişkili olup olmadığının belirlenmesi için daha geniş hasta sayısına sahip çalışmaların yapılması da gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Kolorektal kanser, VEGF, IL-18, NO, ET, IL-2 , Polimorfizm, Bağlantı

## 8. ABSTRACT

**Introduction:** Colorectal cancers are most common cancers of the gastrointestinal system. After breast cancer colorectal cancers are most common cause of cancer death in women. Likewise after lung and prostate cancer colorectal cancers are most common cause of cancer death in men. The aim of the present study was to investigate the association between serum NO, IL-2, IL-18, ET and VEGF levels and tumor stages. Additionally association between VEGF gene polymorphisms and colorectal cancer was studied.

**Methods:** In this study, we measured serum IL-18, IL-2, VEGF, ET, and NO levels in 44 patients with colorectal cancer and 44 healthy controls. Also we investigate VEGF G634C (rs2010963) and VEGF C936T (rs3025039) polymorphisms of VEGF gene in these groups, using a PCR-RFLP method.

**Results:** Serum levels of IL-18, VEGF, IL-2 and NO were significantly higher in patients with colorectal cancer when compared to controls ( $p < 0,05$ ). Serum ET levels were found to be similar in colorectal cancer patients and healthy controls. When we compare the two subgroups constituted by tumor stages (STAGE 1-2 and STAGE 3-4) with each other, VEGF values were significantly higher in stage 3-4 group than stage 1-2 group ( $p < 0,05$ ). No significant difference was found between subgroups with regard to other parameters. We found that investigated VEGF G634C and VEGF C936T polymorphisms were not associated with colorectal cancer. ( $P = 0.228$  for VEGF G-634-C;  $P = 0.484$  for VEGF C-936-T)

**Conclusion:** Serum levels of IL-18, VEGF, IL-2 and NO may be a useful marker in diagnosis of patients with colorectal cancer. Additionally we consider that serum VEGF levels can be used as a tumor marker to predict prognosis of colorectal cancer. However, larger studies with long-term follow-up are necessary to clarify this hypothesis. Additionally further studies with larger population are needed to determine association between VEGF gene polymorphism and colorectal cancer.

Key words: Colorectal cancer, VEGF, IL-18, NO, ET, IL-2, Polymorphism, Association

## 9. KAYNAKLAR

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics .*CA Cancer J Clin* 1999; **49**:8-31.
2. Correa P, Haenszel W. The epidemiology of large-bowel cancer. *Adv Cancer Res* 1978; **26**:1-141.
3. Fuchs CS, Giovannucci E, Colditz GA et al. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Eng J Med* 1994; **331**:1669-74.
4. Vasen HFA, Wijnen JT, Menko FH, et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996; **110**:1020-7.
5. Desai DC, Neale KF, Talbot IC, et al. Juvenile polyposis. *Br J Surg* 1995; **82**:147.
6. Spigelman A, Murray V, Phillips R. Cancer and the Peutz-Jeghers Syndrome. *Gut* 1989; **30**:1588.
7. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, et al. Ulcerative colitis and colorectal cancer: a population based study. *N Eng J Med* 1990; **323**:1228-33.
8. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, et al. Increased risk of large bowel cancer in Crohn's Disease with colonic involvement. *Lancet* 1990; **336**:357-9.
9. Rosen P, Fireman Z, Figer A, et al. Colorectal tumor screening in women with a past history of breast, uterine, or ovarian malignancies. *Cancer* 1986; **57**:1235-9.
10. Kalble T, Tricker AR, Friedl P, et al. Ureterosigmoidostomy: Long-term results ,risk of carcinoma ,and etiological factors for carcinogenesis. *J Urol* 1990;**144**:11104.
11. Otchy DP, Nelson H. Radiation injuries of the colon and rectum. *Surg Clin North Am* 1993; **73**:1017-35.
12. Shelton AA, Wong WD. Colorectal cancer. In Current Surgical Therapy, Cameron SL (ed). St Louis, Mosby,1999; 217-228.
13. Schrock TR. Large intestine. In Surgical Diagnosis and Treatment. Way LL (ed). Connecticut, Appleton&Lange. 1994; 644-692.
14. Williams NS. Colorectal cancer: Epidemiology, Aetiology, Pathology, Clinical Features and Diagnosis. In Surgery of the Anus, Rectum and Colon, Williams NS, Keighley MR(Eds), WB Saunderss Company, 1993; Vol 1,Chapter 29:830-886.

15. Holliday HN, Hardcastle JD. Delay in diagnosis and treatment of symptomatic colo-rectal cancer. *Lancet* 1979; i: 309.
16. Porter GA, Soskolne CL, Yakimets WW, Newman SC. Surgeon-related factors and outcome in rectal cancer. *Ann Surg* 1998; **227**:157-67.
17. Gordon PH. Malignant neoplasms of the colon. In Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum and Anus . Gordon PH, Nivatvongs S(eds), QMP, St.Louis, 1999; 575-718.
18. Tomita H, Marcello PW, Milsom JW. Laparoscopic surgery of the colon rectum. *World J Surg* 1999; **23**:397-405.
19. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;**9**:669-676.
20. Ide AG, Bake NH, Warren SL. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol* 1939;**42**:891–899.
21. Algire GH, Chalkey HW, Legallais FY, Park H. Vascular reactions of normal and malignant tumours in vivo. *JNCI* 1945;**6**:73–85.
22. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;**285**:1182-1186.
23. Chodak GW, Haudenschild C, Gittes FF, Folkman J. Angiogenic activity as a marker of neoplastic and preneoplastic lesions of the human bladder. *Ann Surg* 1980;**192**:762-771.
24. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;**3**:401- 410.
25. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000;**21**:505-515.
26. Fernandez PM, Rickles FR. Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr Opin Hematol* 2002;**9**:401-406.
27. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 2003;**22**:6549-6556.
28. Manders P, Beex LV, Tjan-Heijnen VC, Geurts-Moespot J, Van Tienoven TH, Foekens JA, Sweep CG. The prognostic value of vascular endothelial growth factor

in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy. *Br J Cancer* 2002;**87**:772-778.

29. Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signalling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control* 2002;**9**:36-44.

30. Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochemical Pharmacology* 2004;**68**:1017-1021

31. Yamaguchi R et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998;**28**:68-77

32. Monacci W et al. Expression of vascular permeability/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am j Physiol.* 1993;**264**:995-1002.

33. Zachary I et al. Signalling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001;**49**:568-581

34. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 2000;**26**:561-569

35. Kliche S et al. VEGF receptor signaling and endothelial function. *JUBMB Life* 2001;**52**:61-66

36. Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1(Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* 2001;**33**:409-420

37. Dvorak HF et al. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;**146**:1029-1039

38. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;**332**:411-5

39. Yanagisawa M, Masaki T. Molecular biology and biochemistry of endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 1989;**10**:378-8.

40. A. Bagnato, F. Spinella; Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrinol. Metab* 2002;**14**:44-50.

41. Bell KM, D.J. Chaplin; The effect of oxygen and carbon dioxide on tumor cell endothelin-1 production. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998;**31 (Suppl. 1)**;537-540.

42. Lüscher TF. The endothelium as a target and mediator of cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest* 1993;**23**:670-85
43. Yeh YC, Burns ER, Yeh J, Yeh HW. Synergic effects of ET-1 and TGF alpha or EGF on DNA replication and G1 to G0 phase transition. *Biosci Rep* 1991;**11**:171-80
44. Hahn WA, Resink TJ, Kern F, Bühler FR. Peptide vasoconstrictors, vessel structure and vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;**22(Suppl 5)**:37-43
45. Azzorone B, Potin-Clemenceau C, Krief P, Rubinstein E, Jasmin C, Scudeletti M, Indiveri F. Are interleukin-2 and interleukin-15 tumor promoting factors for human non-hematopoietic cells? *Eur Cytokine Netw* 1996;**7**:27-36.
46. Lin WC, Yasumura S, Suminami Y, Sung MW, Nagashima S, Stanson J, Whiteside TL. Constitutive production of IL-2 by human carcinoma cells, expression of IL-2 receptor, and tumor cell growth. *J Immunol* 1995;**155**:4805-4816.
47. Reichert T, Watins S, Stanson J, Johnson JT, Whiteside TL. Endogenous IL-2 in cancer cells: a marker of cellular proliferation. *J Histochem* 1998;**46**:603-611.
48. Ridings J, Macardle PJ, Virad RW, Byard RW, Skinner J, Zola H. Cytokine receptors by solid tumours. *Therapeut Immunol* 1995;**2**:67-76.
49. Royuela M, De Miguel MP, Bethencourt FR, Fraile B, Arenas MI, Paniagua R. IL-2, its receptors, and bcl-2 and bax genes in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostates: immunohistochemical comparative analysis. *Growth Factors* 2000;**18**:135-146
50. Okamura H, Tsutsui T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995;**378**:88-91.
51. Park CC, Morel JC, Amin MA, Connors MA, Harlow LA, Koch AE. Evidence of IL-18 as a novel angiogenic mediator. *J Immunol* 2001;**167**:1644-1653.
52. Margaret N, Xiuling X, Franck B. A critical role for interleukin-18 in primary and memory effector responses to listeria monocytogenes that extends beyond its effects on interferon gamma production. *J Exp Med* 2001;**194**:343-354.
53. Edwards AD. The pharmacology of inhaled Nitric oxide. *Arch Dis Child* 1995;**72**:F127-130
54. Furchgott RF, Zawadzki JV. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature* 1980;**288**:373-6.

55. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;**327**:524-6
56. Palmer RM, Ashton DS, Moncada J. Vascular Endothelial Cells Synthesize Nitric Oxide from L-Arginin. *Nature* 1988;**333**:664-6
57. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993;**268** (17):1231-35.
58. Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, Draski DV.: Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994;**375**:81-8.
59. Myatt L, Rosenfield RB, Eis ALW. Nitrotyrosine residues in placenta: Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertension* 1996;**28**:488-93.
60. Takubo T, Kumura T, Nakao T, et al. Comparative study on complete remission rate and overall survival in three groups classified based on the serum interleukin-18 level in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Acta Haematol* 2000;**104**:220-2.
61. Taniguchi M, Nagaoka K, Kunikata T, et al. Characterization of antihuman interleukin-18 interferon-gamma-inducing factor monoclonal antibodies and their application in the measurement of human IL-18 by ELISA. *J Immunol Methods* 1997;**206**:107-13.
62. Pages F, Berger A, Lebel-Binay S, et al. Proinflammatory and antitumor properties of interleukin-18 in the gastrointestinal tract. *Immunol Lett* 2000;**75**:9-14.
63. Kawabata T, Ichikura T, Majima T, et al. Preoperative serum interleukin-18 level as a postoperative prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001;**92**:2050-5.
64. Merendino RA, Gangemi S, Ruello A, et al. Serum levels of interleukin-18 and sICAM-1 in patients affected by breast cancer: preliminary considerations. *Int J Biol Marker* 2001;**16**:126-9
65. Tasaki K, Yoshida Y, Maeda T, Miyauchi M et al. Protective immunity is induced in murine colon carcinoma cells by the expression of interleukin-12 or interleukin-18, which activate type 1 helper T cells. *Cancer Gene Ther.* 2000 Feb;**7(2)**:247-54



66. Pages F, Berger A, Henglein B, et al. Modulation of interleukin-18 expression in human colon carcinoma: consequences for tumor immune surveillance. *Int J Cancer* 1999;84:326-30.
67. Ohshima H, Baitsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 1994;305:253-264.
68. Cui S, Reicher JS, Mateo RB, et al. Activated murine macrophage induces apoptosis in tumour cells through nitric oxide dependent or independent mechanisms. *Cancer Res* 1994;54:2462-7.
69. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6:3051-64.
70. Leibovich S, Polverini P, Harlow TW, et al. Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginine/nitric oxide synthase dependent effector mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4190-4.
71. Hazar B, Polat G, Bagdatoglu O, et al. The role of fibronectin and nitric oxide (NO) in gastrointestinal cancers. *Hepatogastroenterology*. 2005 Jan-Feb;52(61):119-22.
72. Rao CV et al. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat Res*. 2004 Nov 2;555(1-2):107-19
73. Hellmuth M, Paulukat J, Ninic R et al. Nitric oxide differentially regulates pro- and anti-angiogenic markers in DLD-1 colon carcinoma cells. *FEBS Lett*. 2004 Apr 9;563(1-3):98-102
74. Lagares-Garcia JA, Moore RA, Collier B Nitric oxide synthase as a marker in colorectal carcinoma. *Am Surg*. 2001 Jul;67(7):709-13
75. Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *J Surg Oncol*. 1999 Apr;70(4):222-9
76. Moochhala S, Chhatwal VJ, Chan ST Nitric oxide synthase activity and expression in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 1996 May;17(5):1171-4

77. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, et al. Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: A molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. In: Moncada S, Higgs EA (eds) Nitric oxide from L-arginine: A Bioregulatory System: Proceedings of the symposium on biological importance of nitric oxide. Amsterdam: *Excerpta Medica* 1990;189-223.
78. Lancaster J. *Nitric oxide, principles and actions*. Copyright by Academic Press. Inc. 1996. California/USA.
79. Ishwarlal, Jialal. And Sridevi, Devaraj. Low density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996;**42:4**:498-506
80. Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ at al. Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma. *Br J Cancer*. 2003 Jul 21;**89(2)**:420.
81. Miyoshi C, Ohshima N at al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression regulates angiogenesis accompanying tumor growth in a peritoneal disseminated tumor model. *In Vivo*. 2001 May-Jun;**15(3)**:233-8
82. Cressey R, Wattananupong O, Lertprasertsuke N, Vinitketkumnien U. Alteration of protein expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) from soluble to cell-associated isoform during tumourigenesis. *BMC Cancer* 2005;**5**:128.
83. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;**19**:1207-25.
84. Yamamoto Y, Toi M, Kondo S, Matsumoto T. Concentrations of VEGF in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 1996;**2**:821-6.
85. Jiang C, Agarwal R, Lu J. Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, Silymarin: inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;**276**:371-378.
86. Tsai WS, Changchien CR, Yeh CY at al. Preoperative plasma vascular endothelial growth factor but not nitrite is a useful complementary tumor marker in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2006 Jun;**49(6)**:883-94

87. Abdou AG, Aiad H, Asaad N at al. Immunohistochemical evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in colorectal carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2006 Dec;**18(4)**:311-22
88. Logan-Collins JM, Lowy AM, Robinson-Smith TM at al. VEGF expression predicts survival in patients with peritoneal surface metastases from mucinous adenocarcinoma of the appendix and colon. *Ann Surg Oncol.* 2008 Mar;**15(3)**:738-44
89. Guba M, Seeliger H, Kleespies A at al. Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2004 Nov;**19(6)**:510-7
90. Cascinu S, Graziano F, Catalano V at al. Vascular endothelial growth factor and p53 expressions in liver and abdominal metastases from colon cancer. *Tumour Biol.* 2003 Mar-Apr;**24(2)**:77-81
91. Lin W C, Yasumura S, Suminami Y, Sung MW, Nagashima S, Stanson J, Whiteside TL. Constitutive production of IL-2 by human carcinoma cells, expression of IL-2 receptor, and tumor cell growth. *J Immunol* 1995;**155**:4805-16.
92. Reichert T, Watkins S, Stanson J, Johnson JT, Whiteside TL. Endogenous IL-2 in cancer cells: a marker of cellular proliferation. *J Histochem Cytochem* 1998;**46**:603-611.
93. Ridings J, Macardle PJ, Virad RW, Byard RW, Skinner J, Zola H. Cytokine receptor by solid tumors. *Therapeut immunol* 1995;**2**:67-76.
94. Royuela M, De Miguel MP, Bethencourt FR, Fraile B, Arenas MI, Paniagua R. IL-2, its receptors, and bcl-2 and bax genes in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostates: immunohistochemical comparative analysis. *Growth Factors* 2000;**18**:135-46.
95. Baier PK, Wolff-Vorbeck G, Eggstein S at al. Cytokine expression in colon carcinoma. *Anticancer Res.* 2005 May-Jun;**25(3B)**:2135-9
96. Berghella AM, Pellegrini P, Del Beato T at al. The significance of an increase in soluble interleukin-2 receptor level in colorectal cancer and its biological regulating role in the physiological switching of the immune response cytokine network from TH1 to TH2 and back. *Cancer Immunol Immunother.* 1998 Jan;**45(5)**:241-9
97. Caporale A, Brescia A, Galati G at al. Locoregional IL-2 therapy in the treatment of colon cancer. Cell-induced lesions of a murine model. *Anticancer Res.* 2007 Mar-Apr;**27(2)**:985-9

98. Wigginton JM, Komschlies KL, Back TC, Franco JL, Brunda MJ, Wiltrou RH. Administration of IL-2 and pulse IL-2 and rapid and complete eradication of murine renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;**88**:38-43.
99. Reichert T, Nagashima S, Kashii Y, Stanson J, Gao G, Doy QP, Whiteside TH. IL-2 expression in human carcinomas cell lines and its role in cell cycle progression. *Oncogene* 2000;**19**:514-25.
100. Peduto Eberl L, Bovey R, Juillerat-Jeanneret L at al. Endothelin-receptor antagonists are proapoptotic and antiproliferative in human colon cancer cells.*Br J Cancer*. 2003 Mar 10;**88**(5):788-95
101. Asham E, Shankar A, Loizidou M at al. Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *Br J Cancer*. 2001 Nov 30;**85**(11):1759-63
102. Arun C, Swift B, Porter KE at al. The role of big endothelin-1 in colorectal cancer. *Int J Biol Markers*. 2002 Oct-Dec;**17**(4):268-74
103. Hofmann G,Langsenlehner U,Renner W at al.Common single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and colorectal cancer risk.*J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 May;**134**(5):591-5. Epub 2007 Oct 16.
104. Kim JG,Chae YS at al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with colorectal cancer.*Clin Cancer Res*.2008 Jan1;**14**(1):62-6.
105. Chae YS,Kim JG at al.Association of Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic Charecteristics of colorectal cancer.*J Korean Med Sci* 2008;**23**:421-7.
106. Watson CJ,Webb NJ,Bottomley MJ at al.İdentification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene:correlation with variation in VEGF protein production.*Cytokine* 2000;**12**:1232-5
107. Collins, F.S., Guyer, M.S., Charkravarti, A., (1997). Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science*. **278**(5343): 1580-1.
108. Sfar S, Hassen E, Saad H, Mosbah F, Chouchane L.Association of VEGF genetic polymorphisms with prostate carcinoma risk and clinical outcome. *Cytokine*. 2006 Jul;**35**(1-2):21-8. Epub 2006 Sep 5. Erratum in: *Cytokine*. 2006 Nov;**36**(3-4):199-200.

109. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, Paulweber B, Haas J, Samonigg H. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer*. 2003 Sep 10;**106(4)**:468-71.