

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMEL BİYOTEKNOLOJİ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA KÖK HÜCRE GEN EKSPRESYON  
PROFİLİ VE PROGNOSTİK ÖNEMİ**

**Sıdıka ÖZTOP**

**Danışman Öğretim Üyesi**

**Prof. Dr. Hakan AKBULUT**

**AĞUSTOS**

**2013**

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Sıdıka ÖZTOP

İmzası

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Hakan AKBULUT danışmanlığında, Sıdıka ÖZTOP tarafından hazırlanan bu çalışma 26/08/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hakan GÜRDAL *İmza* :

Üye : Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ *İmza* :

Üye : Prof. Dr. Hakan AKBULUT *İmza* :

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Kolorektal Kanserli Hastalarda Kök Hücre Gen Ekspresyon Profili Ve Prognostik Önemi

Sıdıka Öztop

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Hakan Akbulut

Kanser, günümüzde insan sağlığını tehdit eden en önemli ikinci sağlık sorunudur. Kolorektal kanser ise en yaygın kanser tiplerinden bir tanesidir. Kolorektal kanser insidansı artmasına rağmen tedavide başarı tam olarak sağlanamamıştır. Tedaviye direnç ve nüks kanser tedavisini etkisiz kılan en önemli iki faktördür. Özellikle kanser kök hücrelerinin bu süreçten sorumlu olabileceğinin anlaşılması, bu hücreleri son yıllarda önemli bir hedef haline getirmiştir. Kanser kök hücrelerinin karakterize edilmesi hız kazanmış ve kanser kök hücre belirteçleri belirlenmiştir. CD133, kolorektal kanser kök hücrelerini tanımlayan bir moleküldür. Yapılan bazı çalışmalar CD133'ün prognoz üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu verilere dayanarak tez çalışmamızda CD133 ekspresyonu ve prognoz arasındaki ilişki araştırılmıştır. Proje kapsamında 103 kolon kanseri FFPE tümör dokusunda ve 34 sağlıklı kolon dokusunda CD133 ekspresyon düzeyi qRT-PCR tekniği ile tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde edilen veriler ile hastaların klinikopatolojik ve tedavi seyirleri birlikte değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre, CD133 pozitifliği ile prognoz arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular CD133'ün klinik açıdan literatürde belirtilenin aksine farklı bir boyutu da olabileceği olasılığını gündeme getirmesi açısından ilginçtir.

2013, 66 sayfa

**Anahtar kelimeler:** kolon kanseri, kanser kök hücresi, gen ekspresyonu, prognoz

## **ABSTRACT**

M.Sc. Thesis

The Prognostic Significance Of The Expression Of The Stemness Genes In Patients With  
Colorectal Cancer

Sıdıka Öztop

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Hakan Akbulut

Cancer is the second most important health problem that threatens human health. Colorectal cancer is one of the most common cancers. Despite the increase in the incidence of colorectal cancer, treatment is not fully successful. Resistance and relapse are the two most important factors that decrease the success of the treatment. In recent years, cancer stem cell have become one of the main therapeutic targets in cancer research. There have been a lot of study to characterize the cancer stem cell and to define markers for those cells. The prominin, CD133, has been reported as a stem cell marker for colon cancer stem cells. In some studies CD133 has been reported as a prognostic factor. Taking into account the published data on CD133, we aimed to investigate the CD133 expression in archival colorectal cancer tissues and its prognostic significance. We determine the levels of CD133 expression by qRT-PCR technique in FFPE tumor tissues of 103 patients with colon cancer and adjacent colonic tissues of 34 patients. We compared the clinicopathological features of the patients with regard to CD133 expression. No significant differences in clinicopathological parameters were found in CD133 positive and negative patients. We did not find CD133 expression as a prognostic factor in this cohort of colorectal cancer. Though not significant, CD133 expression seems to be a favourable prognostic factor which is not compatible with previous published studies. Our findings may suggest a different aspect of CD133 expression in terms of prognosis.

2013, 66 pages

**Key words:** colon cancer, cancer stem cell, gene expression, prognosis

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana araştırma yapma olanağı sağlayan, tezimin her aşamasında bilgisi ve tecrübesiyle yol gösteren değerli tez danışmanım Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a,

Çalışmam süresince sevgisini, bilgisini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim ve bu yolda ilerlediğim sürece her zaman yanımda olmasını dileyeceğim çok değerli hocam Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a,

Deneyselerimde ihtiyaç duyduğum tüm olanakları sağlayan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarına, başta Prof. Dr. Aykut ÖZKUL ve Prof. Dr. Hakan GÜRDAL olmak üzere tüm Biyoteknoloji Enstitüsü ailesine,

Tez çalışmamdaki hastaların klinik verilerinin toplanmasında yardımları için Dr. Sezgin PEPELER'e, bu verilerden yararlanmama izin veren tez danışmanları Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a ve Prof. Dr. Murat TÖRÜNER'e,

FFPE dokularını sağlayan Prof. Dr. Arzu ENSARİ'ye, dokuları patolojik açıdan değerlendiren Doç. Dr. Berna SAVAŞ'a, pozitif kontrol arayışında değerli yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Duygu UÇKAN'a, Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na ve asistanı Blm. Uzm. Tülin ÖZKAN'a, desteği için Nalân AKGÜN'e,

Çalışmam süresince bilgisini ve deneyimini benimle paylaşan başta Blm. Uzm. Nevin BELDER olmak üzere Biyoteknoloji Enstitüsü Genombilim ailesinin değerli üyelerine,

Varlıklarıyla bana güç katan can dostlarıma,

Sevgisi ve desteğiyle her zaman yanımda olan biricik aileme, canım kardeşlerime ve buraya gelebilmemdeki en büyük destekçim kıymetli anneciğim Aynur ÖZTOP'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel çalışma yapabileceğimiz bu ortamı bize armağan ettikleri için Cumhuriyetimizin yüce kurucusu Mustafa Kemal ATATÜRK'e ve tüm devrim şehitlerimize minnettarım.

Bu tez çalışması 13L3330005 no'lu proje olarak Ankara Üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN .....	i
ONAY SAYFASI.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Kolorektal Kanser.....	3
2.1.1. Kolon Yapısı.....	3
2.1.2. Kolorektal Kanser Biyolojisi .....	5
2.1.3. Kolorektal Kanser İstatistikleri.....	6
2.1.4. Kolorektal Kanser Risk Faktörleri.....	7
2.1.5. Kolorektal Kanserde Tedavi Yaklaşımları .....	8
2.2. Kök Hücre .....	9
2.3. Kanser Kök Hücresi.....	11
2.4. Kolon Kanseri Kök Hücresi .....	14
2.5. Kolon Kanseri Kök Hücresi Sinyal Yolakları .....	15
2.5.1. Wnt sinyal yolağı.....	15
2.5.2. TGF- $\beta$ sinyal yolağı.....	17
2.5.3. Notch sinyal yolağı.....	18
2.5.4. Hedgehog sinyal yolağı .....	19
2.6. Kolon Kanseri Kök Hücre Belirteçleri .....	20

2.7. CD133.....	21
3. GEREKÇE VE AMAÇ .....	22
4. MATERYAL VE YÖNTEM .....	23
4.1. Materyal.....	23
4.2. Yöntem .....	25
4.2.1 RNA İzolasyonu .....	25
4.2.1.1 Parafine gömülü dokudan ticari kit ile total RNA izolasyonu.....	25
4.2.1.2 Hücre kültüründen ticari kit ile total RNA izolasyonu.....	26
4.2.1.3 Hücre kültüründen trizol ile total RNA izolasyonu.....	27
4.2.2. RNA kalite ve kontrol testlerinin yapılması .....	28
4.2.2.1 Saflık ve miktar tayini ölçümü .....	28
4.2.2.2. Agaroz jel elektroforezinde görüntüleme .....	28
4.2.2.3. AGILENT RNA 6000 nano assay analizi .....	29
4.2.3. RNA'dan cDNA sentezi .....	29
4.2.3.1. Eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu standartları için cDNA sentezi.....	30
4.2.4. Eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR).....	32
4.2.4.1. Standart dilüsyonların hazırlanması .....	32
4.2.4.2. cDNA'ların derin kuyulu plakaya aktarılması .....	33
4.2.4.3. Örneklerin derin kuyulu plakadan rt-pcr plakasına aktarımı.....	33
4.2.4.4. Probe master karışımının hazırlanması ve reaksiyonun kurulumu.....	34
4.2.4.5. Optimizasyon.....	35
4.2.4.6. PCR ürünlerinin görüntülenmesi .....	36
4.2.5. İstatistik .....	36
4.2.5.1. Real-time PCR analizleri .....	36
4.2.5.2. Sağkalım analizleri .....	36
5. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	37



5.1. Saflık ve Miktar Tayini Ölçüm Sonuçları .....	37
5.2. RNA İzolasyonu Sonuçları .....	38
5.3. AGILENT RNA 6000 Nano Assay Analizi Sonuçları .....	38
5.4. Eş Zamanlı Kantitatif PCR Sonuçları .....	39
5.5. Hasta Özellikleri ve Prognostik Değerlendirme .....	46
6. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	49
KAYNAKLAR .....	52
EKLER .....	58
EK1: Çalışılan tüm örneklerin saflık ve miktar tayini analizi sonuçları .....	58
EK2: AGILENT RNA 6000 Nano Assay Analizi Sonuçları .....	62
EK3: Etik Kurul Kararı .....	64
ÖZGEÇMİŞ .....	66

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kolon ve rektum yapısı.....	3
Şekil 2.2 Kolon lümeni ve kript yapısı.....	5
Şekil 2.3 Kök hücrelerin sınıflandırılması.....	9
Şekil 2.4. Pluripotent ve Multipotent kök hücrelerin farklılaşması.....	11
Şekil 2.5. Kanserde Stokastik Model ve Hiyerarşik Model.....	12
Şekil 2.6. Kanser Kök Hücrelerinin Orjini.....	13
Şekil 2.7. Wnt/Beta katenin sinyal yolağı.....	16
Şekil 2.8. TGF-beta sinyal yolağı.....	17
Şekil 2.9. Notch sinyal yolağı.....	18
Şekil 2.10. Hedgehog sinyal yolağı.....	19
Şekil 5.1. İzole edilen RNA örneklerine ait temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	38
Şekil 5.2. AGILENT RNA 6000 Nano Assay Analizi Temsili Sonucu (beşinci çip).....	39
Şekil 5.3. CD133 geni qRT-PCR ürünlerini temsilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	40
Şekil 5.4. ACTB geni qRT-PCR ürünlerini temsilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	40
Şekil 5.5. Örnek 61 dâhil edilmediğinde elde edilen grafik.....	43
Şekil 5.6. Tüm CD133 pozitif örnekleri kapsayan grafik.....	43
Şekil 5.7. ACTB birinci plaka amplifikasyon eğrisi grafiğı.....	44
Şekil 5.8. ACTB ikinci plaka amplifikasyon eğrisi grafiğı.....	44

<b>Şekil 5.9.</b> CD133 birinci plaka amplifikasyon eğrisi grafiği.....	45
<b>Şekil 5.10.</b> CD133 ikinci plaka amplifikasyon eğrisi grafiği.....	45
<b>Şekil 5.11.</b> Tümör dokusunda CD133 durumuna göre hastalıksız sağkalım eğrisi.....	47
<b>Şekil 5.12.</b> Normal Kolon Mukozasında CD133 pozitif olan hastaların hastalıksız sağkalım eğrisi.....	48

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Kolon kök hücresi ve kolon kanseri kök hücresi belirteçleri.....	20
<b>Çizelge 4.1.</b> Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	24
<b>Çizelge 4.2.</b> cDNA sentez protokolünde birinci basamak bileşenlerinin miktarı.....	29
<b>Çizelge 4.3.</b> cDNA sentez protokolünde ikinci basamak bileşenlerinin miktarı.....	30
<b>Çizelge 4.4.</b> cDNA sentezi reaksiyon sıcaklıkları ve süresi.....	30
<b>Çizelge 4.5.</b> cDNA sentez protokolünde birinci basamak bileşenlerinin miktarı.....	31
<b>Çizelge 4.6.</b> cDNA sentez protokolünde ikinci basamak bileşenlerinin miktarı.....	31
<b>Çizelge 4.7.</b> cDNA sentezi reaksiyon sıcaklıkları ve süresi.....	31
<b>Çizelge 4.8.</b> Real-time ready single assay problemlerin özellikleri.....	32
<b>Çizelge 4.9.</b> Standart dilüsyonların hazırlanışı.....	33
<b>Çizelge 4.10.</b> Real-time PCR prob master bileşenlerinin miktarı.....	34
<b>Çizelge 4.11.</b> ROCHE LightCycler 480-384 kuyulu Plaka için RT-PCR programı.....	35
<b>Çizelge 5.1.</b> CD133 pozitif örneklerin Nano-drop ölçümü sonuçları.....	37
<b>Çizelge 5.2.</b> qRT-PCR ürünlerinin ortalama CP değerleri ve Pfaffl Metodu ile analiz sonuçları.....	42
<b>Çizelge 5.3.</b> Hasta özellikleri.....	46

## SİMGELER DİZİNİ

ACTB	Beta-actin
AFAP	Attenuated Familial Adenomatous Polyposis
AML	Acut Myeloid Leukemia
APC	Adenomatosis Poliposis Coli
ATOH1	Atonal Homolog 1
BÇ	Baz çifti
CACO-2	İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
CDNA	Complementer Deoksiribonükleik Asit
CP	Crossing Point
DKK1	Dickkopf-1 geni
E	Efficiency
EDTA	Etilendiamin tetraasetikası
ETOH	Etil alkol
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
FFPE	Formalin Fixed Parafine Embeded
GİS	Gastrointestinal Sistem
HES1	Hairy And Enhancer Of Split 1
HEYL	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like protein I
HH-GLI	Hedgehog Glioma
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
KDA	Kilo-Dalton

KKH	Kanser Kök Hyesi
KRK	Kolorektal Kanser
MRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NON-SCID	Non-Severe Combined Immunodeficiency
PROM1	Prominin 1
QRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
SH	Short hairpin
TA	Transit-amplifying
TBRI	Tumor Growth Factor Beta Receptor I
TBR II	Tumor Growth Factor Beta Receptor II
TGF- $\beta$	Tumor Growth Factor Beta
U87	İnsan Glioblastoma Hre Hattı

## 1. GİRİŞ

Kanser, günümüzde kardiyovasküler hastalıklardan sonra insan sağlığını tehdit eden en önemli sağlık sorunudur. Yükselen yaşam standartları, gelişen teknoloji ve sağlık imkânları ortalama yaşam süresini daha da uzatmıştır. Artan ömür uzunluğu insanların olumsuz çevre koşullarına maruz kaldığı süreyi arttırmanın yanında kanser gibi önemli bir sağlık sorununu da gündeme taşımıştır.

Kanser, genetik bir hastalık olmakla beraber oluşumu tek bir nedene bağlanamayan multifaktöriyel bir hastalıktır (1). Genomda oluşan mutasyonlar, beslenme biçimi, sigara kullanımı, hareketsiz yaşam, ultraviyole ışınlar, radyasyon ve uygun olmayan çalışma koşulları gibi hem çevresel hem genetik faktörler nedeniyle hücre siklusu bozulur. Hücrenin kontrolden çıkması ve sınırsız çoğalma yeteneği kazanması kanser olarak tanımlanır. Bir kanser hücrelerini tanımlayan altı özellik bulunmaktadır. Bunlar, büyüme sinyalleri oluşturabilme, büyümeyi durdurabilecek sinyallere duyarsızlaşma, programlanmış hücre ölümünden (apoptozis) kaçabilme, sınırsız bölünebilme, çoğalma potansiyeline sahip olma, anjiogenezi sürekli destekleyebilme, doku invazyonu ve metastaz yapabilme özellikleridir (2).

Sindirim sistemi kanserleri erkeklerde akciğer ve prostat, kadınlarda ise meme ve akciğer kanserlerinden sonra en sık rastlanılan kanserlerdir. Kolorektal kanserler (KRK) sindirim sistemi kanserleri içerisinde en sık rastlanılan tümörlerdir. Yaş, beslenme tarzı, kalınbağırsak polipleri, bazı bağırsak hastalıkları gibi çeşitli etmenlerin KRK oluşumuna neden olan risk faktörleri olduğu bugün kabul edilmektedir.

Erken tanı imkânlarının gelişmesine rağmen KRK tedavisinde tam başarı henüz sağlanamamıştır. Konvansiyonel tedavilere direncin ortaya çıkması, prognozda belirli bir iyileşme görülememesi, belirli bir süre sonra görülen nüksler ve metastazlar KRK tedavisinin hala çözüm bulunamamış problemleridir. Bu nedenle KRK tedavisi hem hasta hem hasta yakınları için maddi ve manevi ciddi sorumlulukları da beraberinde

getirmektedir. Bunun yanı sıra kanser tanı ve tedavisinde devlet tarafından karşılanan birçok test ve ilaç bulunmaktadır. Son derece pahalı olan bu tedavi sürecinde hastaların tedavilere birbirinden farklı yanıtlar vermesinin çeşitli genetik temellere dayandığı düşünülmektedir.

Tedavide karşılaşılan bu zorluklar bilim insanlarının kanser biyolojisine bakış açılarını da etkilemiş ve son yıllarda ciddi bir gündem oluşturan kanser kök hücresi (KKH) hipotezinin daha çok dikkate alınmasına neden olmuştur. Mevcut bu yaklaşımda, tümörün tamamen eradike edilebilmesi için bu kök hücreleri hedef alan tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada kanser oluşumundan sorumlu olduğu düşünülen KKH'nin moleküler belirteçlerini tanımlayarak kimliklendirme çalışmaları ciddi önem kazanmıştır.

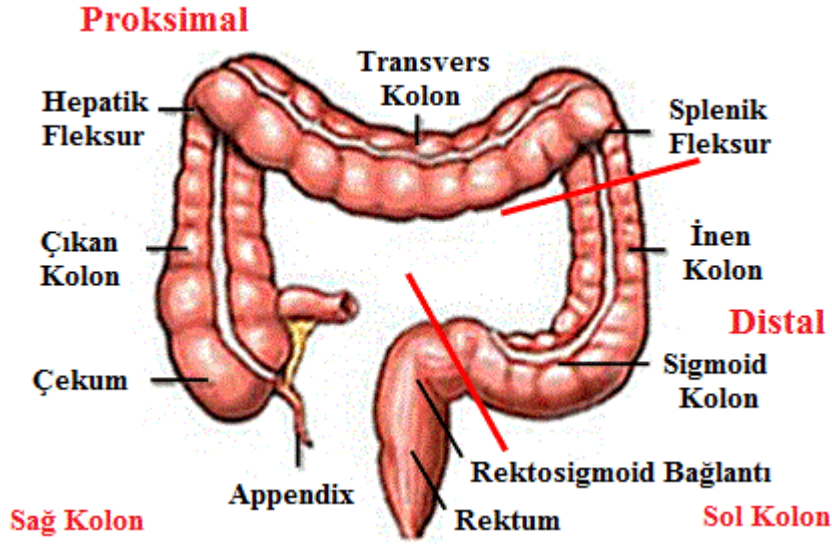


## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Kolorektal Kanser

#### 2.1.1. Kolon Yapısı

Kolorektal kanseri, kolon veya rektumda meydana gelmektedir. Kolon ve rektum gastrointestinal sistem olarak da adlandırılan sindirim sisteminin önemli bileşenleridir. Kolon ileoçekal kapak ile rektosigmoid köşe arasında kalan yaklaşık 150 cm'lik bir bölümdür. Şekil-1'de insana ait kolon ve rektum yapısı görülmektedir.



Şekil 2.1. Kolon ve rektum yapısı

(Referans (3)'ten değiştirilerek alınmıştır.)

Kolon “çekum” denilen bölgeden ileoçekal kapakçık denilen bir kapak ile ince bağırsağa bağlanmaktadır. Bu kapakçık kalın bağırsak içeriğinin ince bağırsağa kaçmasını önlemektedir. Embriyolojik olarak çekum, çıkan kolon ve transvers kolonun sağ yarısı midguttan gelişirken, transvers kolonun sol yarısı, inen kolon, sigmoid kolon, rektum ve anüs hindguttan gelişmiştir. İlk bölüm sağ kolon olarak adlandırılırken ikinci bölüm sol kolon olarak adlandırılmaktadır. Elde edilen birçok kanıt sağ kolon kanserlerinin sol kolon kanserlerinden daha kötü prognoza sahip olduğunu göstermiştir (4). Prognozdaki bu farklılığa proksimal ve distal kolon arasındaki embriyolojik, morfolojik, fizyolojik,

biyokimyasal, çevresel ve genetik farklılıkların sebep olabileceği düşünülmektedir (5). Kolon, Şekil 2.1.'de görüldüğü üzere 4 ana kısımdan oluşmaktadır.

1. **Çıkan kolon;** ince bağırsağın kalın bağırsağa bağlandığı yerden başlar ve sağ taraftan abdomene kadar uzanır.
2. **Transvers kolon;** sağ taraftan sol tarafa doğru vücut düzleminde yerleşmiş bulunan kolon bölgesidir.
3. **İnen kolon;** transvers kolonun sol tarafa ulaşan kesiminden aşağı doğru uzanan bölümüdür.
4. **Sigmoid kolon;** S şeklindeki kıvrımlı bir yapıya sahiptir ve kolonun rektuma bağlanan bölgesidir.

Kolon histolojisi incelendiğinde kolon duvarının 4 tabaka ile karakterize olduğunu görülmektedir. Bu tabakalar içten dışa doğru;

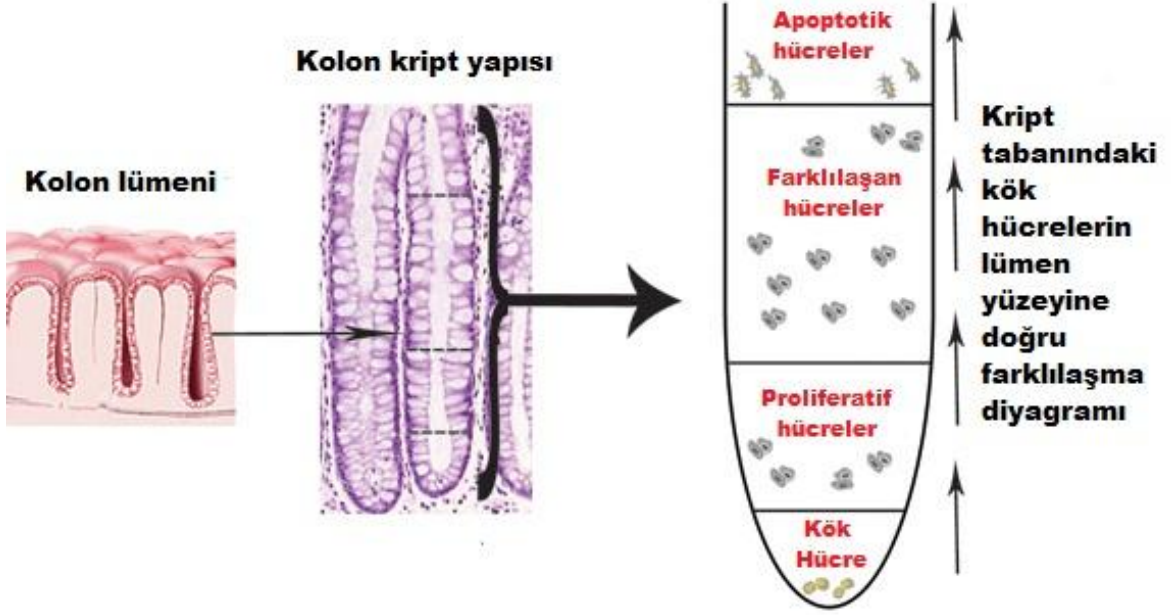
- Mukoza
- Submukoza
- Muskularis eksterna
- Seroza

olarak sıralanmıştır. En dışta bulunan mukozal yüzey emici ve salgılayıcı özellikteki basit kolumnar epitel ile kaplıdır. Emilim yüzeyin arttırmak amacıyla kıvrımlar oluşturarak bağ dokuya bağlanmaktadır. Kolonda yüzey alanını genişleterek daha etkili bir emilim sağlayan mikrovillusların bağırsak duvarının içerisinde kalan kısmı “Lieberkühn kripti” olarak adlandırılmaktadır Bu tüp şeklindeki yapılar olarak adlandırılmakta ve kolonun fonksiyonel birimlerini teşkil etmektedir (6). Bir kript yapısında yaklaşık 2000 hücre bulunmakta ve normal bir insan kolonu milyonlarca kript yapısından oluşmaktadır (7-10). Bir kript yapısında;

- Kolonosit hücreleri
- Goblet hücreleri
- Enteroendokrin hücreleri

olmak üzere üç çeşit epitel hücresi bulunmaktadır. Dördüncü kategoride olan Paneth hücreleri ise çıkan kolonda ya da belli hastalık koşullarında varlığını göstermektedir (11). Paneth hücreleri konak savunmasında kök hücreleri korumada önemli bir rol oynar. Kriptin

en üst bölümünü içeren 1/3'lük kısmında farklılaşmış hücreler (kolonositler, goblet hücreleri, enteroendokrin hücreleri) bulunurken 2/3'lük kısmında ağırlıklı olarak transit-amplifiyng hücreleri (TA hücreleri) bulunur. Kolon kök hücreleri ise kript tabanında her kript için tahminen 5-10 kök hücre şeklinde yer almaktadır (12).



Şekil 2.2 Kolon lümeni ve kript yapısı

(Referans (13)'ten değiştirilerek alınmıştır.)

### 2.1.2. Kolorektal Kanser Biyolojisi

Kolonik mukozadaki hücre proliferasyonu ve apoptozisde meydana gelen değişimler, hücrenin kontrolünü sağlayan ileri denetimlerin en aza inmesi ve dolayısıyla KRK riskinin artması ile sonuçlanmaktadır. Malignant fenotip oluşması için genomik instabilite ile karakterize edilen mutasyon birikimini kolaylaştıran genetik değişiklik gereklidir. (14, 15). Multifaktöriyel olan kanser gelişimi bu nedenle uzun bir süre ile birlikte birçok genetik değişimi gerektirmektedir. KRK 10 ile 15 yıl arasında uzun bir süreçte gelişmektedir (16, 17).

Kolon kanserinin majör histolojik tipi kolon duvarındaki epitel hücrelerden köken alan adenokarsinomadır ve tüm kolon kanserlerinin %90-95'ni oluşturmaktadır (18). Adenokarsinoma bağırsak duvarında mukus salgılayan epitel hücrelerinden gelişen kolloidal ya da müsinöz adenokarsinoma yaklaşık %17 oranında görülmektedir. Bu tip adenokarsinomda tümör içinde, hücre dışına salınan büyük miktarda mukus bulunmaktadır. %2-4 oranında görülen taşlı yüzük hücreli karsinomada ise mukus hücre içerisinde birikmektedir. Hücre içerisinde biriken mukus çekirdeği bir yöne iterek taşlı yüzük görünümü almasına neden olur. Epitelyal hücre kökenli nadir görülen diğer kanser tipleri ise skuamoz hücreli karsinoma ve adenoskuamoz karsinomadır (18).

Tümör tipik olarak kanserleşmemiş bir polip ile başlamaktadır. Kalın bağırsak veya rektumun iç yüzeyinde oluşan bağırsak iç duvarına ince veya kalın bir sapla bağlı olan ve bağırsak içine doğru büyüyen çıkıntılara “polip” denir. Bir polip kolon veya rektum hattı üzerinde büyüdükçe kanserleşebilir. Adenomların %10'undan düşük bir miktarı kanser geliştirmesine rağmen adenomatöz polip veya villöz adenomalar gibi belli çeşitteki polipler kanserleşmeye daha yakındır (19). Normal kolon epitelinden displastik kolon epiteline patolojik geçiş, adenomatöz polipin gelişimi ve sonunda invaziv KRK dönüşümü ile hastalık süreci gerçekleşmektedir.

### **2.1.3. Kolorektal Kanser İstatistikleri**

Kolon ve rektum kanseri dünyada en yaygın görülen üçüncü kanser tipidir (18). Kolon kanseri, rektum kanserinden daha sık görülmektedir. Sanayileşmiş ülkelerde kolon kanserinin rektum kanserine oranı 2:1 veya daha fazla iken gelişmekte olan ülkelerde bu oran birbirine benzerdir.

Amerika Birleşik Devletlerinde, cinsiyet temel alındığında KRK ölüme sebep olan en yaygın üçüncü kanser tipidir. American Cancer Society tarafından yayınlanan son verilere göre; 2013 yılında 102,480 yeni kolon kanseri ile 40,340 yeni rektal kanseri tanısı olacağı ve 50,830 kişinin KRK nedeniyle hayatını kaybedeceği öngörülmektedir (20). Türkiye'de

Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Daire Başkanlığı'nın 2007-2008 yılı verilerine göre, KRK görölme sıklığı açısından tüm kanserler içinde % 7,8 ile kadınlarda üçüncü ve % 7,5 ile erkeklerde dördüncü sırada yer almaktadır (21).

KRK vakalarının % 90'ı 50 yaş üzerinde iken; 80 yaş üzerinde bu oran erkekler için % 10'a, kadınlar için % 15'e kadar yükselmektedir. KRK'nin yaşam boyu görölme sıklığı % 2,4-5 civarındadır. Kişide var olan belli risk faktörleriyle bu oran yükselmektedir (22).

#### **2.1.4. Kolorektal Kansere Risk Faktörleri**

KRK kansere insidansı ve mortalite oranlarını azaltmak için hastalığı ortaya çıkaran risk faktörlerini belirlemek ve bu faktörleri elimine edici yönde koruyucu stratejiler geliştirmek giderek önem kazanmıştır.

Kolorektal kanserlerin %75'i sporadik (rastlantısal), %10'u kalıtsal ve %15'i ailesel olarak gelişmektedir (23). Tüm kolorektal kanserlerin % 2-5'ini kalıtsal Lynch Sendromu (Hereditere nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) oluştururken, yine tüm kanserlerin %1'ini kalıtsal olan ailesel adenomatöz polip (Familial adenomatous polyp, FAP) oluşturmaktadır (24).

KRK gelişim paternleri dikkate alındığında sporadik KRK için en önemli risk faktörü yaşdır (25, 26). Epidemiyolojik araştırmalar sonucunda; aile öyküsü, FAP, Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP), HNPCC, kolorektal polipler, ülseratif kolit, Crohn hastalığı gibi inflamatuvar bağırsak hastalıkları, beslenme tarzı, sigara kullanımı, hareketsiz yaşam biçimi, KRK insidansının yoğun olduğu bölgelere göç, kentleşme, obezite, uzun süreli alkol kullanımı gibi faktörlerin KRK gelişimi için yüksek risk taşıdığı belirlenmiştir (27-31).

### 2.1.5. Kolorektal Kanserde Tedavi Yaklaşımları

KRK tanısı alan hastaların tedavisi için en önemli belirleyici ölçüt hastalığın evresidir. Bu evrelendirme sonrası tedaviye cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi seçeneklerinden uygun olanı ile başlanılmaktadır. KRK tanısı evrelerine göre hastalık bölgeleri şu şekildedir:

- **Evre 0** : Kanseri ilk aşamadır (Karsinoma in situ)
- **Evre I** : Kolon veya rektum iç duvarının büyük bölümünde tutulum (mukoza ve submukoza) vardır.
- **Evre II** : Kanseri kolon veya rektum dokularının dışına ulaşmıştır ancak henüz lenf bezi metastazı yoktur.
- **Evre III** : Kanseri lenf bezine metastaz yapmıştır ancak vücudun diğer bölümlerine yayılımı mevcut değildir.
- **Evre IV** : Kanseri vücudun diğer bölgelerine metastaz yapmıştır.

Cerrahi tedavide amaç tümörün ve tümörlü bölgenin vücuttan uzaklaştırılmasıdır. KRK'de esas şifa sağlayan tedavi seçeneği cerrahidir. Hemen tüm evrelerde teknik olarak bir engel olmadığı sürece tümörlü dokuların tamamı çıkarılabiliyor ise önerilen tedavi cerrahidir.

Kemoterapi ilaç ile kanser hücrelerinin öldürülmesini amaçlayan sistemik bir tedavidir. Ancak kemoterapi tedavisinde sadece kanser hücreleri değil sağlıklı dokularda olumsuz etkilenmektedir.

Radyoterapi yüksek enerjili ışınlar ile kanser hücrelerinin yok edilmesini hedefleyen bölgesel bir tedavi yöntemidir. Erken evrelerdeki hastalarda ameliyat öncesinde veya sonrasında nüks olasılığını azaltmak amacıyla kullanılır.

Yukarıda sayılan yöntemler konvansiyonel tedavilerdir. Bu tedaviler ile erken evrede 5-yıllık yaşam oranları %80'lerin üzerindedir. Evre II hastalarda bu oran %60 evre IV hastalarda ise %10-20 arasında değişmektedir. Hedefe yönelik tedavilerde kanser hücrelerinin ihtiyaç duyduğu sinyaller veya proteinler hedef alınmakta ve kanser hücreleri

ihtiyaç duyduğu bu moleküllerden yoksun bırakılmaktadır. Bu şekilde geliştirilen hedefe yönelik ilaçlar arasında anjiogenez inhibitörü olan Bevacizumab kanserli bölgede yeni kan damarları oluşumu engelleyerek tümörün gelişimini engellemeye yardımcı olmaktadır.

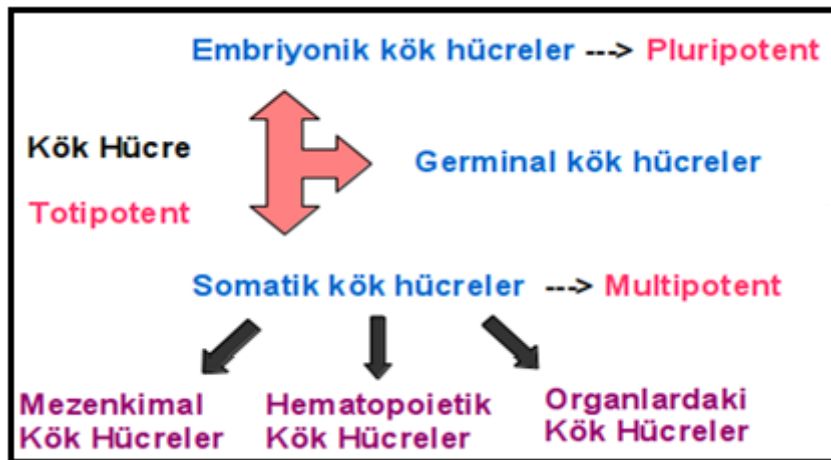
Kolorektal kanseri hastalarda nüks önemli bir sorundur. Hastalığın nüksetmesinde kemoterapiye dirençli kanser kök hücrelerinin önemli olduğu düşünülmektedir (32). Kanser kök hücrelerini hedefleyen tedaviler gelecekte önemli tedavi yaklaşımları arasına girmeye aday görünmektedir.

## 2.2. Kök Hücre

Canlı sisteminde çeşitli nedenlerle apoptoza uğrayan hücreler ile eş zamanlı olarak yeni hücrelerin oluşması sistemde dinamik bir denge oluşturmaktadır. Homeostazis olarak adlandırdığımız bu dengenin devamlılığını diğer hücrelerden farklı özellikler taşıyan “kök hücre” dediğimiz hücreler sağlar. Kök hücreleri diğer hücrelerden farklı kılan özellikleri;

- kendini yenileyebilme
- farklılaşarak olgun dokuları oluşturabilme
- homeostatik kontrol yeteneği

şeklinde ifade edilmektedir (33).



Şekil 2.3 Kök hücrelerin sınıflandırılması

Kök hücreler Şekil 2.3.'de görüldüğü gibi genel olarak farklılaşabilme yeteneklerine göre sınıflandırılmaktadır. Farklılaşabilme yeteneklerine göre kök hücreler; totipotent, pluripotent ve multipotent olarak sınıflandırılır (34).

**Totipotent hücreler;** embriyonun blastosit evresinin üçüncü gününde alınan hücrelerdir. Bu hücreler bir canlı vücudundaki tüm yapıları oluşturabilecek şekilde farklılaşabilir. Bu nedenle totipotensi özelliği taşıyan kök hücreler hücreler tek başına bir canlıyı yeniden oluşturabilir. Totipotent hücreler özelleşerek;

- ▲ embriyonik kök hücreleri
- ▲ germinal kök hücreleri
- ▲ somatik kök hücreleri

oluştururlar (35). Bu kök hücre çeşitleri de kök hücre özelliği taşımakla beraber, hiçbiri tek başına bir canlıyı tamamen oluşturamaz. Somatik kök hücreler;

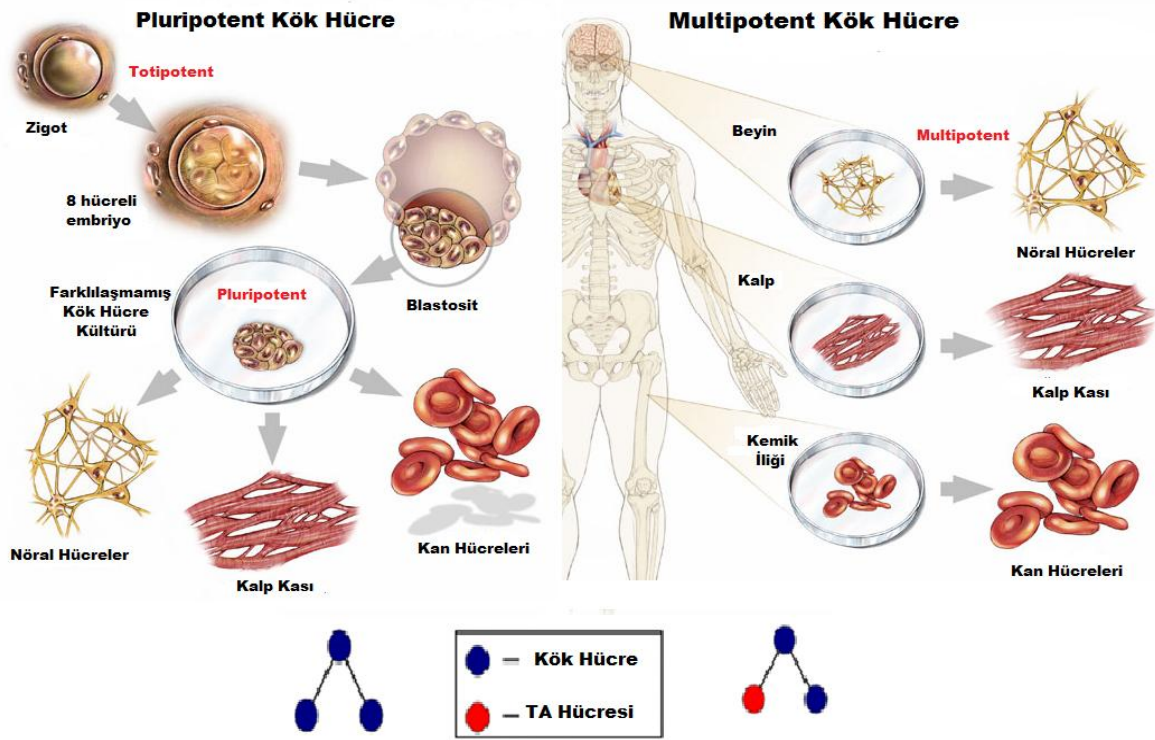
- ▲ mezenkimal kök hücreler
- ▲ hematopoietik kök hücreler
- ▲ organlardaki kök hücreler

olarak sınıflandırılmaktadır.

**Pluripotent kök hücre** özelliği embriyonik kök hücrelerde bulunmaktadır. Totipotensiden farklı olarak pluripotensi daha kısıtlı bir farklılaşma modeline sahiptir. Pluripotent kök hücreler sinir, kas ve epitel hücresi gibi farklı yapılara sahip hücrelere dönüşebilir.

**Multipotent kök hücre** özelliğini ise somatik kök hücreler göstermektedir. Multipotent özellikteki kök hücrelerin farklılaşması ise totipotent ve pluripotent karakterdeki hücrelere göre daha kısıtlıdır. Multipotent kök hücreler ancak buldukları dokulardaki hücre tiplerine farklılaşabilir.





Şekil 2.4. Pluripotent ve Multipotent kök hücrelerin farklılaşması

(Referans (36)'dan değiştirilerek alınmıştır.)

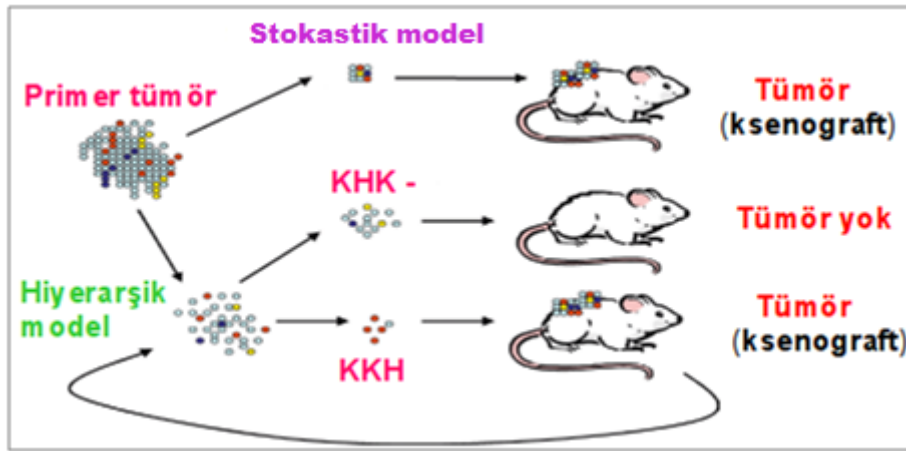
Kök hücreler köken aldıkları doku ve farklı dokuları oluşturabilme potansiyelleri dışında hücre bölünme mekanizmalarında da farklılık gösterirler. Hücre çoğalmasını sağlayan mitoz bölünmede sonuçta iki eş yavru hücre (**simetrik bölünme**) oluşmaktadır. Buna karşın kök hücrelerin bölünmesinde ise birbirinden farklı iki hücre (**asimetrik bölünme**) oluşmaktadır (Şekil 2.4.). Kök hücre bölünürken oluşacak yavru hücrelerden biri ana hücrenin kopyası iken diğer hücre kök hücrenin farklılaşarak oluşturduğu hücre tipidir (37). Kök hücrelerin normal bölünme süreci böyle işlerken kanser kök hücrelerinde simetrik bölünmenin olduğunu görülmüştür (38).

### 2.3. Kanser Kök Hücreleri

KKH kavramının temelleri 1855 yılında Alman bilim adamı Rudolf Virchow'a kadar uzanmaktadır (39, 40). Virchow; "Olgun dokularda dormant durumdaki embriyonik hücrelere benzer kanserli hücrelerin kendiliğinden kaynaklanmayan aktivasyonu"

kanserin ortaya çıkabileceğini” ifade etmiştir. Bu öneride kendiliğinden kaynaklanmayan aktivasyonlar; mutasyonları ifade ederken embriyonik hücelere benzer kanserli hücelere kanser kök hücreleri ile örtüşmektedir.

Virchow'dan sonra uzun bir süre bu konuda herhangi bir gelişme olmamıştır. 139 yıl sonra 1994 yılında Lapidot “insan akut miyeloid lösemi hücrelerinin immün sistemi baskılanmış farelerde lösemi oluşturduğunu göstererek” KKH hipotezini ispatlamıştır (41, 42).



Şekil 2.5. Kanserde Stokastik Model ve Hiyerarşik Model

(Referans (43)'ten değiştirilerek alınmıştır.)

Geleneksel kanser yaklaşımı “stokastik model” olarak ifade edilmektedir. Stokastik modelde; heterojen yapıda olan tümörden alınan herhangi bir hücre, bağışıklık sistemi baskılanmış bir canlıya verildiği takdirde yeniden tümör oluşturabildiği kabul edilmekte idi. Ancak yapılan çalışmalarda, uygun büyüme ortamı olan herhangi bir tümör hücresinin tümör oluşturma yeteneğinin düşük olduğu görülmüştür (44).

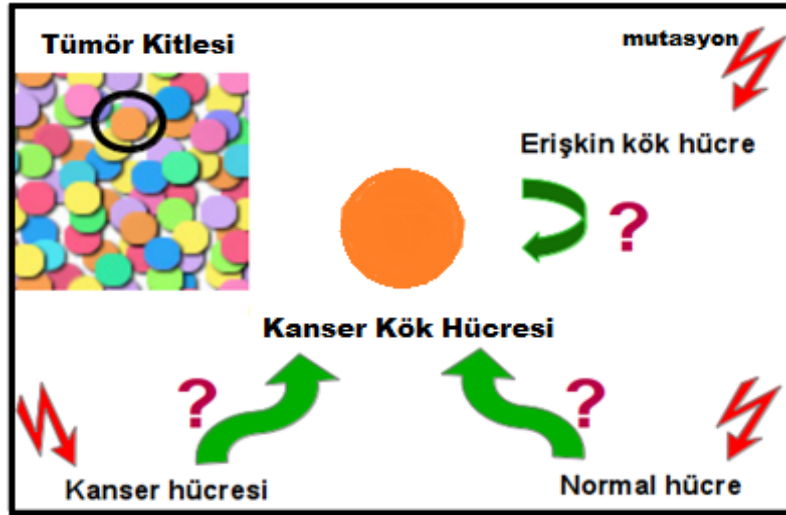
“Kanser kök hücresi modeli” veya diğer adıyla “hiyerarşik modelde” ise heterojen yapıdaki tümörde ancak az sayıdaki hücre çoğalma yeteneği taşımaktadır ve sadece bu hücreler yeni bir tümör oluşturabilmektedir (45). Şekil 2.5.'de görüldüğü üzere birincil tümör dokusu alınarak bu kitleden kanser KKH'si olduğu ve bölünebildiği düşünülen hücreler ve diğer hücreler, kanser kök hücresi yüzey antijenleri işaretlenerek akım

sitometri tekniği ile ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılan KKH'leri immün baskılanmış bir fareye (Non-Severe Combined Immunodeficiency Disease, Non-SCID), kök hücre içermeyen kitle ise başka bir Non-SCID fareye verilmiştir. Sonuçta KKH olduğu düşünülen hücrelerin verildiği farede tümör oluşumu gözlenirken diğer farede tümör oluşumu gözlenmemiştir. Bu veriler ile tümörün heterojen yapısı içerisinde çoğalabilme özelliğini sadece belli özellikler taşıyan ve sayıca tümör kitlesinde daha az olan hücrelerin üstlendiği görüşü ileri sürülmüştür (46).

KKH'ni tümör yapısındaki diğer hücrelerden ayıran özellikleri;

- Non-SCID fareye verildiğinde tümör oluşturabilme
- kendini yenileyebilme
- heterojen yapıdaki tümör kitlesinde diğer hücrelere farklılaşabilme
- kök hücre ile ilişkili genleri ifade edebilme
- konvansiyonel tedavilere direnç gösterme

şeklinde ifade edilebilir (47).



Şekil 2.6. Kanser Kök Hücresinin Orjini

KKH orijini hala net olarak bilinmemektedir. Tümörün heterojen yapısı içerisinde az sayıda bulunan bu hücrelerin;

- erişkin kök hücrelerin çeşitli mutasyonlar ile hücre döngüsü kontrolünden çıkarak

mı oluştuğu

- kanserleşmiş bir hücrenin geri mutasyonlarla kök hücre özelliği mi kazanmasıyla mı oluştuğu
- yoksa normal bir hücrenin mi mutasyonlarla kanser kök hücrelerini oluşturduğu

henüz net değildir. (42, 48)

KKH hipotezini destekleyen diğer bir yaklaşım ise kök hücrelerin sahip olduğu uzun ömür ve kendini yenileyebilme özelliğinin birleşimi sonucunda bu hücrelerde oluşan mutasyonların birikerek çoğalmasındır (49). Kanserin bir kök hücre hastalığı olarak değerlendirilmesinin bir diğer nedeni; hücrede uzun yıllar içerisinde oluşan genetik ve epigenetik değişikliklerin hücre yapısında genomik instabiliteye neden olduğu ve sınırsız bölünme ile bu özelliklerin yeni hücrelere de aktarıldığı görüşüdür. Böylece normal kök hücre zamanla biriktirdiği bu mutasyonların etkisiyle KKH olabilir hipotezi öne sürülebilmektedir(9, 50, 51).

KKH'nin varlığı hakkında bu kadar görüşe karşın elbette bu hipotezi desteklemeyen görüşlerde vardır. Kelly ve arkadaşları myc onkogenini ifade eden transgenik fareden nakledilen 10 tane akut miyeloid lösemi (AML) hücrelerinin radyasyon uygulanmamış konjenik farelerde tümör gelişimi için yeterli olduğunu AML transplantasyonu modellerinde göstermiştir (52). Bu çalışma verileri sonucunda Kelly ve arkadaşları, insan kanser hücrelerinin Non-SCID fareye verildiği ksenotransplantasyon çalışmalarında insan ve fare mikroçevresindeki farklılıklar nedeniyle ancak çok az sayıda insan tümör hücrelerinin ortama adapte olabilmek kanser oluşturabileceği ve bunların kanser kök hücreleri diye nitelendirilemeyeceği görüşünü öne sürmüştür.

#### **2.4. Kolon Kanseri Kök Hücreleri**

Lapidot'un yaptığı çalışma sonrası birçok kanser türünde KKH tanımlama çalışmaları başladı ve çeşitli solid tümörlerde KKH'leri tanımlandı (53). Kolon KKH'si ise ilk kez

2007 yılında birbirinden bağımsız iki araştırmacı Ricci-Vitiani ve O'Brien tarafından tanımlanmıştır. (54, 55). O'Brien ve arkadaşları çok az sayıda CD133 pozitif insan kolon kanseri başlatıcısı hücreyi (1/262) renal kapsül içerisinde Non-SCID fareye verdiğiinde tümör oluştururken diğer hücrelerden 17,000 tanesini verdiğiinde ancak tümör oluşabildiğini göstermiştir (54). Ricci-Vitiani ve arkadaşları ise kolon kanserinde tümörojenik hücrelerin sadece % 2,5 gibi çok az bir kısmında yüksek CD133 ekspresyonu olduğunu bildirmiştir. Vitiani; Non-SCID farenin deri altına CD133+ hücreler verdiğiinde tümör oluşurken CD133 negatif hücreler verdiğiinde tümör oluşmadığını göstermiştir (55).

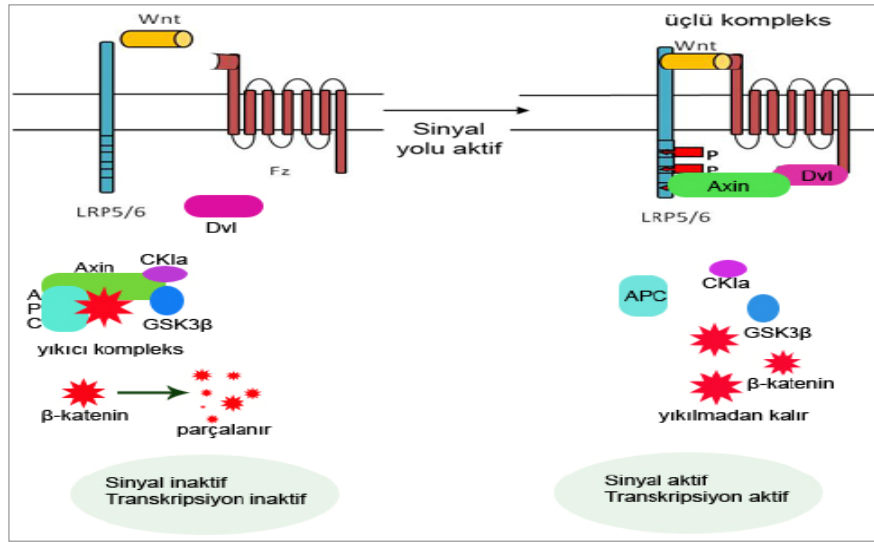
## **2.5. Kolon Kanseri Kök Hücresi Sinyal Yolakları**

Birçok sinyal yolağı özellikle de Wnt/Beta katenin, notch, ve Hedgehog büyümenin devamlılığı ve KKH'sinin fonksiyonel bütünlüğünde önemli bir rol oynar (56). KKH'lerinde normalde kontrol altında olan birçok onkogen aktifleşirken tümör baskılayıcı genler genellikle baskılanmıştır. (57).

### **2.5.1. Wnt sinyal yolağı**

Wnt sinyal yolağı epitelyal kök hücrenin kendini yenilemesinin regülasyonunda önemli bir rol oynar (58, 59). Yolağın bozulması kolon kanseri dâhil pek çok kanser türünde izlenmektedir (60, 61). Organizmalarda üç çeşit Wnt sinyal yolağı tanımlanmıştır (62). Bu yolaklar şunlardır:

- ♣ Wnt/Beta katenin yolağı (Canonical Wnt yolağı)
- ♣ Non-Canonical Wnt yolağı
- ♣ Wnt/kalsiyum yolağı



**Şekil 2.7.** Wnt/Beta katenin sinyal yolağı

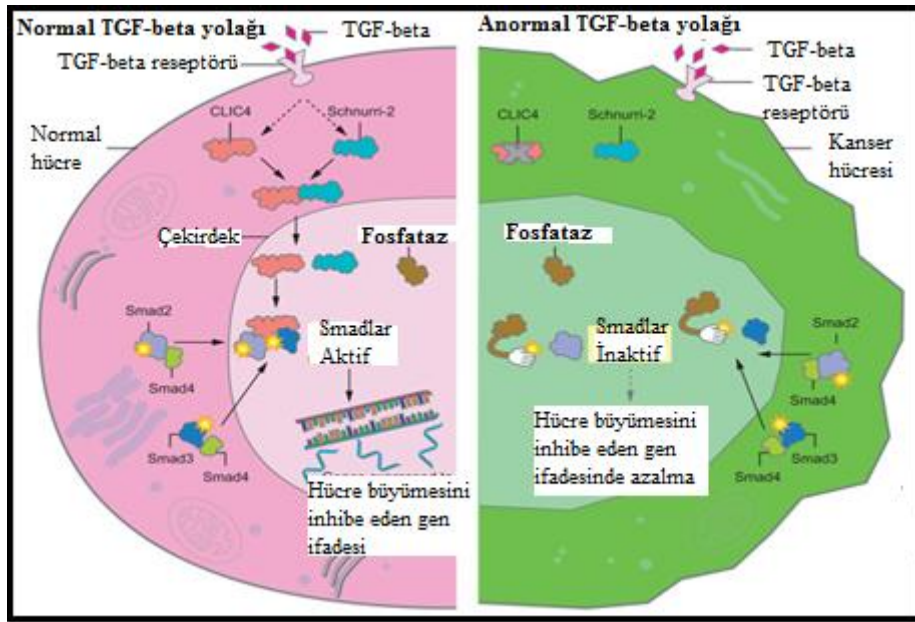
(Referans (63)'den alınmıştır.)

Wnt sinyalleri hem hücrenin kaderini belirlemek için Canonical Wnt yolağı ile hem de hücre hareketi ve doku polaritesini kontrol eden Non-Canonical Wnt yolağı ile uyumludur ve bu iki yolak birbirinden farklı ligandlar ile aktive edilir (64, 65). Wnt sinyal bileşenleri kript boyunca mevcuttur, aktif Wnt sinyalleri kript tabanında bulunan kök hücrelerin kendini yenileyebilmesi için hayati öneme sahiptir (66). Bu yolağın blokajı TCF4'te oluşan bir delesyon veya Wnt yolağının antagonisti olan Dickkopf-1'in (DKK1) aşırı ekspresyonu epitelyal hücre kaybı ve intestinal doku yapısının bozulmasıyla sonuçlanır (67).

Yolağın biyokimyasal yapısı Şekil 2.7.'de görülmektedir. Ligand reseptörüne bağlanmadığı zamanlarda hücre içerisinde oluşan kompleks, hücrede bulunan beta-katenin proteinini proteozomlara yönlendirir ve burada parçalanmasını sağlar. Ancak ligandın reseptöre bağlanması veya hücre içerisinde oluşan kompleks bileşenlerinde oluşan bir mutasyon sonucu, kompleksin kurulamaması beta-kateninin hücrede birikmesi ile sonuçlanır. Hücrede miktarı artan protein çekirdeğe geçer ve burada çeşitli transkripsiyon faktörlerinin transkribe olmasını sağlayarak hücrenin normal işleyişini bozar (63). Wnt sinyal bileşenlerinin fonksiyon kaybının, KRK patogenezinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (68). Adenomatosis Poliposis Coli (APC) geninin mutasyonla indüklenmiş inaktivasyonu ya da beta-kateninin aktive edici mutasyonu tüm KRK hastalarında bildirilmiştir (69).

## 2.5.2. TGF- $\beta$ sinyal yolağı

Tümör büyüme faktörü beta (Tumor growth factor-beta, TGF- $\beta$ ) sinyal yolağı insan kanserlerinde en çok değişime uğrayan yolaklardan birisidir (70). Bu yolak hücrede; hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre göçü, apoptosiz, kök hücre farklılaşması ve işlevi üzerinde etkilidir (56).



Şekil 2.8. TGF- $\beta$  sinyal yolağı

(Referans (71)'ten değiştirilerek alınmıştır.)

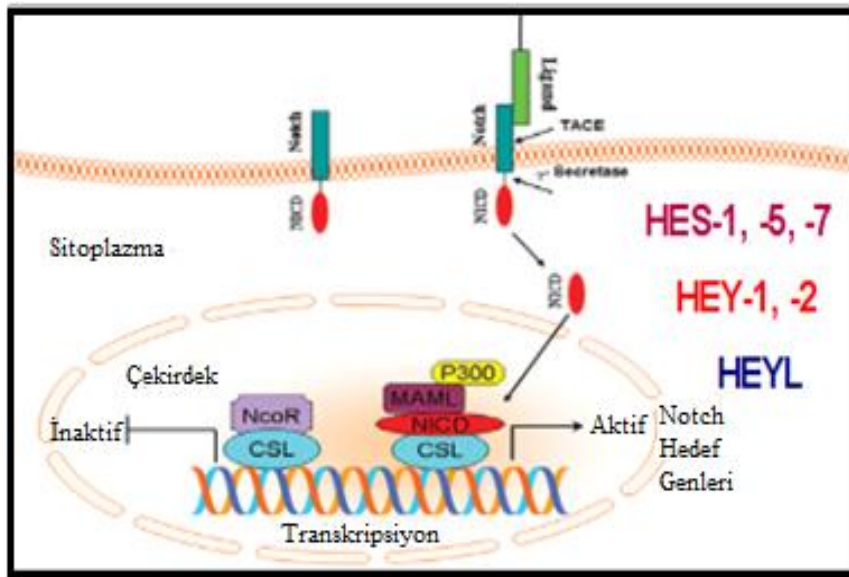
TGF- $\beta$  sinyal yolağının biyokimsyasal mekanizmasında, reseptör ve ligandın etkileşimi ile hücre içerisinde bulunan bileşenlerinin oluşturduğu komplekse dayanan bir sistem söz konusudur (Şekil 2.8.). Bu sistemde ligand ve reseptör bağlantısı kurulduğunda ve hücre içi komplekslerin oluşmasında bir sorun yoksa hücre bölünmesi inhibisyonunu sağlayan kontrol genleri ifade edilebilir ancak yolakta herhangi bir bileşende mutasyon olduğunda inhibisyonu sağlayan sistem bozulur. Normal intestinal epitelyumda hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozisin uyarılması TGF- $\beta$ 'nın görevlerindedir (56). Ancak birçok KKK'de TGF- $\beta$ 'nın tümör baskılayıcı etkisinden kaçma ve TGF- $\beta$  kaynaklı büyüme inhibisyonuna dirençli hale gelme meydana gelmektedir (72). Kolorektal kanserlerin yaklaşık % 80'i TGF- $\beta$  tip II reseptörde (TBR11) oluşan çerçeve kayması



mutasyonu ile ilişkilidir (73). Ayrıca TBRI, Smad4, Smad2 yapılarında da KRK hastaları için mutasyonlar bildirilmiştir (74).

### 2.5.3. Notch sinyal yolağı

Kanser kök hücreindeki yollardan birisi de notch sinyal yolağıdır. Proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis üzerinde etkili olan bu yolak diğerlerinden farklı olarak kök hücrelerde ve gelişim sırasında hücrenin kaderini belirlemektedir (56, 75).



Şekil 2.9. Notch sinyal yolağı

(Referans (76)'ten değiştirilerek alınmıştır.)

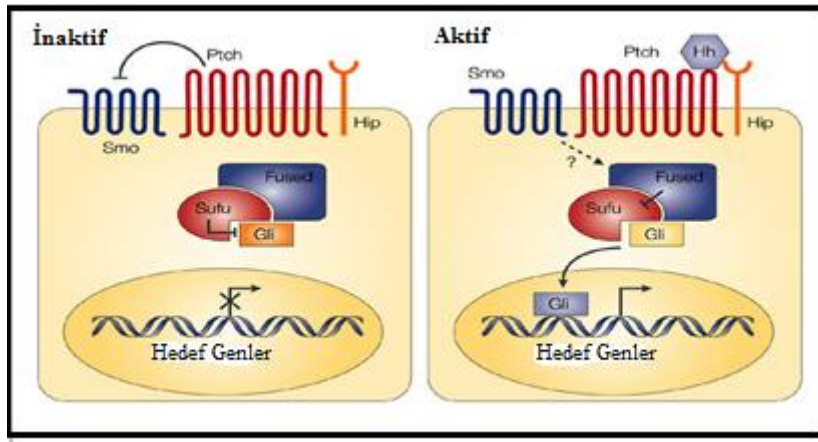
Şekil 2.9.'da gösterilen notch yolağının biyokimyasal mekanizmasında, diğer yollarda olduğu gibi ligand reseptör ilişkisi ve hücre içi bileşenlerin aktif olduğu bir yapı söz konusudur. Ligand ve reseptör yapısı sorunsuz kurulduğunda sistem aktif hale gelerek hedef genlerin transkripsiyonu gerçekleştirilmektedir. Bu hedef genlerin en önemlileri; HES-1, -5, -7, HEY-1, -2 ve HEYL'dir (77). Notch yolağı ifadesinin KRK kök hücrelerinde, KRK hücre hatlarına kıyasla 10-30 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Notch1 ve HES1 ekspresyonu KRK'de önemli derecede artmış iken farklılaşmamış epitel hücrelerinde normal düzeylerde olduğu gözlemlenmiştir. Küçük moleküllü inhibitörleri ve short hairpin (Sh) RNA knockdown kullanarak yapılan çalışmalar bu yolağın kanser kök hücrelerini;



hücre döngüsü kinaz inhibitörü p27 ve transkripsiyon faktörü ATOH1'i baskılayarak apoptozdan koruduğunu göstermiştir (78).

#### 2.5.4. Hedgehog sinyal yolağı

Hedgehog yolağı proliferasyon, hücre göçü, farklılaşma, metastaz ve KKH fonksiyonlarının düzenlenmesi üzerinde etkilidir (79) .



Şekil 2.10. Hedgehog sinyal yolağı

(Referans (80)'den değiştirilerek alınmıştır.)

Yolağın biyokimyasal mekanizması Şekil 2.10.'da gösterilmiştir. Ligand reseptör ilişkisinin yanı sıra hücre içinde oluşan kompleksinde belirleyici olduğu yolakta sinyal yolağının açık veya kapalı olmasıyla hedef genlerin transkripsiyonu sağlanmaktadır (80). Değişik kanser türlerinde yapılan çalışmalar, bu yolağın KKH'ni regüle ettiğini desteklemektedir (81). HH-GLI kolon KKH'sinin, karsinomanın tüm aşamalarında çoğalma ve varlığını sürdürmesi için çok büyük önem taşır (56). İleri ve metastatik KKK hastalarında HH-GLI ekspresyonunda bir artış olduğu ve metastatik olmayan KKK hastaları ile karşılaştırıldığında bu artışın HH-GLI yolağı aktivitesine bağımlı olduğu bildirilmiştir (82).

## 2.6. Kolon Kanseri Kök Hücre Belirteçleri

KKH'si hipotezi kansere yeni bir yaklaşım getirmiştir. Eğer tümör oluşumunu sağlayan KKH'leri ise tümör kitlesi içerisinde sadece bu hücrelerin hedef alınması tümörün yok edilebilmesini sağlayabilir. Ancak KKH'leri, normal kök hücrelerde var olan çeşitli genleri de ifade ettiği için burada önemli olan normal kolon kök hücresinde ifade edilmezken kolon KKH'sinde ifade edilen genleri bulabilmek, yani kanser kök hücresini kimliklendirebilmektir. Çizelge 2.1.'de kolon hücrelerinde ve kolon KKH'lerinde belirteç olarak belirlenen genlerin listesi bulunmaktadır. Listede gösterilen her gen birbirinden farklı görevler üstlenmektedir. Sinyal yolları, ilaç direnci, telomerazı etkileme gibi çok farklı olaylarda etkin olan bu genlerden hangisinin etkin bir tedavi hedefi olacağı konusunda hala çalışmalar devam etmektedir.

**Çizelge 2.1.** Kolon kök hücresi ve kolon KKH'si belirteçleri

<b>Kolonik KH ve Kolon Kanseri KH Tanımlayan Markırlar</b>		
	<b>Markır</b>	<b>Hücresel Fonksiyonu</b>
<b>Normal Kök Hücre</b>	Msi-1	RNA binding protein
	Hes-1	Transkripsiyonel repressor
	EphB reseptörleri	Hücre yüzey reseptörü
	Bmi-1	Policomb repressor protein
	Lgr-5	Wnt hedef geni
	ALDH1A1	Enzim
	DCAMKL1	Kinaz
<b>Kolon Kanseri Kök Hücre</b>	CD133	CRC'da düşük sağkalım, zayıf prognoz, uzak metastaz ilişkili
	CD44	Hyalüronikasit reseptörü
	CD24	Hücre adezyon molekülü
	CD166	Transmembran glikoproteini
	CD29	Hücre adezyon molekülü
	EpCAM	Epiteliyal hücre adezyon molekülü
	ALDH1A1	Enzim
	Msi-1	RNA binding protein
	Bmi-1	Policomb repressor protein
	Lgr-5	Wnt hedef geni
	OCT4	Transkripsiyon faktörü
	Sox2	Transkripsiyon faktörü
	c-Myc	Transkripsiyon faktörü
	ATP binding cassette protein	İlaç taşıyıcı

(Referans (83)'den değiştirilerek alınmıştır.)

## 2.7. CD133

İnsan prominin-1 geni (PROM1, CD133) hücre yüzeyinde bulunan 115 kilo daltonluk (kDa) bir 5'-transmembran glikoproteini eksprese eder. Bu gen dördüncü kromozom üzerinde 4p15.32 lokasyonunda bulunmaktadır. Tümör dokusuyla kıyaslandığında normal kolon dokusunda daha az eksprese edilir (54). CD133'ün fonksiyonu net olarak bilinmemesine rağmen endotelial progenitor hücreler, hematopoietik kök hücre, fetal beyin kök hücresi, embriyonik epitelyum, prostatik epitelyal kök hücre ve miyojenik hücreler olmak üzere birçok farklılaşmamış epitel hücresinde eksprese edildiği bulunmuştur (84-90). Ayrıca retinoblastoma, lösemi, beyin kanseri, yumurtalık kanseri ve hepatoselüler karsinomada CD133 pozitifliğine dayalı izolasyon, tümör başlatıcı hücreleri ortaya çıkarmıştır (86, 91-94).

Kolon kanserinde de Ricci-Vitiani ve O'Brien CD133 pozitifliğine dayarak kolon KKH'lerini izole etmişlerdir.(54, 55) Todaro ve arkadaşları CD133 pozitif hücrelerin insan kolon kanserinde yaklaşık %2 oranında olduğunu göstermiştir (95). CD133 molekülünün kolon KKH'si belirteci olduğu verisine dayanarak çalışmamızda tümör dokularında kolon kanser kök hücreleri, CD133 ekspresyonu varlığı ile korele olarak değerlendirilmiştir.

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Kanser tedavisinde son yıllarda bireysel tedavi yaklaşımları ön plana çıkmaya başlamıştır. Klasik tedavi yöntemleri ile hastaların önemli bir kısmında nüks izlenmektedir. KRK'li hastalarda adjuvan tedaviler ancak hastaların yaklaşık %6'sında mutlak yarar sağlamaktadır. Tedavilerin hangi hastalarda etkili olabileceğini belirleyen bir belirteç ise ne yazık ki bulunmamaktadır. Kanser nüksünde özellikle KKH'lerinin sorumlu olabileceğinin anlaşılması bu hücreleri son yıllarda önemli bir hedef haline getirmiştir. KKH'lerinin yüzey özelliklerine göre tanımlanmasındaki zorluklar ile özellikle insanlarda tümör hücre izolasyonuna olanak sağlayabilecek yeterli taze doku bulunmasındaki zorluklar yeni arayışları gündeme getirmiştir. Hastalara ait arşivdeki tümör dokularından kök hücre özelliklerini belirleyen gen ifadelerinin saptanması bunlardan biridir.

Bu projenin amacı; KRK kök hücresi moleküler belirteçlerinden bir tanesi olan CD133'ün çalışmamız dâhilindeki hasta örnekleminde ekspresyon düzeyini belirleyerek hastaların prognozu üzerindeki etkisini araştırmaktır. Böylece ilgili genin hastalarda ekspresyon düzeyine bakılarak olası prognoz tahminleri ile tedaviyi şekillendirebilmek ve elde edilen sonuçlara göre bu belirtecin bir kanser tedavi hedefi olup olmayacağını belirleyebilmek mümkün olabilecektir.

Bu çalışmada özellikle erken evre kolon kanserli hastalarda adjuvan tedaviden yarar görebilecek bir hasta grubunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Böylece hastaların cevap alamayacağı tedavilerle zaman kaybetmesinin ve/veya etkisiz tedavilerden olumsuz etkilenmesinin önüne geçilebilecektir. Kanser hastalığında, hastaların tedavi süresince yaşadıkları klinik zorluklar göz önüne alındığında, etkin ve olumlu yanıt alınabilecek tedavinin en kısa sürede uygulanmasının son derece önemlidir. Bunların yanı sıra pahalı olan kanser ilaçlarının tedaviden yarar görebilecek uygun hastalarda kullanılmasıyla sağlık bütçesinde oluşan kayıpların da önüne geçilebilecektir. Ayrıca çalışmada elde edilecek sonuçların, kanser kök hücresi hedefli spesifik tedaviler için hedef gen veya hedef gen gruplarını saptamada bir basamak oluşturabileceğine inanıyoruz.

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. Materyal

Bu çalışma, kolorektal tanısı almış hastalardan alınan formalinle fikse edilmiş parafine gömülü (Formalin Fixed Parafin Embedded, FFPE) tümör dokuları ve FFPE sağlıklı kolon dokuları üzerinde yürütülmüştür. Çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji kliniğinde takip ve tedavileri yapılan erken evre kolon kanserli toplam 103 hasta retrospektif olarak alınmıştır. Çalışmada 103 KRK'li hastanın tümörlü kolon dokuları ile aynı gruptan rastgele seçilen 34 hastanın tümör içermeyen sağlam kolon dokuları kullanılmıştır. Çalışmaya daha önce Tıbbi Onkoloji ve Gastroenteroloji kliniklerinde ortak olarak Prof. Dr. Hakan AKBULUT danışmanlığında yürütülen bir çalışmanın hasta grubu dâhil edilmiştir. Bu tez çalışması bir önceki çalışmanın (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 3 Mayıs 2010 tarihli ve 10-157 karar numarası ile onay alan ve Prof. Dr. Hakan AKBULUT'un danışmanlığında yürütülen "Kolorektal kanserlerde VİT D reseptör ekspresyonunun evre ile ilişkisi ve prognoz üzerine etkisi" başlıklı proje) bir parçası niteliğindedir.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda her hasta örnekten 10 µm kalınlığında 4 kesit alınmıştır.

Pozitif kontrol olarak CD133 pozitif U87 insan glioblastoma hücre hattı (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'nun ekibinden sağlanmıştır) kullanılmıştır. Standart dilüsyonları oluşturmak için CD133 pozitif CaCo-2 insan kolon adenokarsinoma hücre hattı (Hacettepe Üniversite Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden Sayın Prof. Dr. Duygu UÇKAN'nın ekibinden sağlanmıştır) kullanılmıştır.

Bu araştırma projesi kapsamında kullanılan kimyasallar ve kitler Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.1.** Çalışmada kullanılan kimyasallar

Malzeme Adı	Marka	Katalog No	Kullanım Amacı
Ksilen	Codex Carlo Erba	392603	RNA İzolasyonu
RNeasy FFPE Kit	QIAGEN	73504	RNA İzolasyonu
RNeasy Mini Kit	QIAGEN	74104	RNA İzolasyonu
TriPure Isolation Reagent	ROCHE	1667157	RNA İzolasyonu
Agarose	PeqGold	35-1030	Jel Elektroforezi
Agarose	BioShop	AGA001.100	Jel Elektroforezi
ssRNA Ladder	NEB	N0362S	Jel Elektroforezi
20 bç DNA Ladder	O'Range	SM1323	Jel Elektroforezi
RNA Loading Dye	NEB	B0363S	Jel Elektroforezi
5X Green GoTaq Flexi Buffer	Promega	M891A	Jel Elektroforezi
10X TBE	Zeydanlı	DZTBE10	Jel Elektroforezi
AGILENT RNA 6000 Nano Kit	AGILENT	5067-1511	Bütünlük Tayini
AGILENT RNA 6000 Ladder	AGILENT	5067-1529	Bütünlük Tayini
Transcriptor HighFidelity cDNA Sentez Kiti	ROCHE	5081955001	cDNA Sentezi
RealTime Ready Catalog Assay Prom1	ROCHE	5532957001	qRT-PCR
RealTime Ready Catalog Assay ACTB	ROCHE	5532957001	qRT-PCR
FastStart Essential DNA Probe Master	ROCHE	6402682001	qRT-PCR
Absolute Ethanol	MERCK	1070174000	Çok amaçlı
Kloroform	MERCK	1024451000	RNA İzolasyonu
İzopropanol Alkol	MERCK	1096341000	RNA İzolasyonu
Safe-Red	ABM	G108-R	Jel Elektroforezi
RNaseKiller	5 PRIME	2500080	Sterilizasyon

## 4.2. Yöntem

### 4.2.1 RNA İzolasyonu

#### 4.2.1.1 Parafine gömülü dokudan ticari kit ile total RNA izolasyonu

FFPE dokulardan total RNA izolasyonunda QIAGEN RNeasy FFPE RNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

1. Mikrosantrifüj tüpü içindeki doku örneği üzerine 1 ml Ksilen eklendi. 37 °C'deki ısı bloğunda 20 dakika inkübasyona bırakıldı. (Stuart Block Heater SBH200D/3)
2. Maksimum hızda (13,500 rpm) 4 dakika oda sıcaklığında (15-25 °C) santrifüj edildi. (Hettich Zentrifugen Mikro 22)
3. Süpernatant atılarak bu işlem iki kez tekrarlandı.
4. Pelletin üzerine 1 ml %100'lük etil alkol eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
5. Daha sonra santrifüj edilip süpernatant atılarak 4. ve 5. basamaklar 2 kez tekrarlandı.
6. Son santrifüjden sonra süpernatant EtOH kalıntısı kalmayacak şekilde atıldıktan sonra etanolün tamamen buharlaşması için 37 °C'de 10 dk inkübe edildi.
7. EtOH buharlaştırıldıktan sonra tüpe 240 µl Buffer PKD eklendi ve 10 saniye vortekslendi. (IKA MS1 MiniShaker)
8. 10 µl Proteinaz K eklenerek ve hafifçe pipetleme ile karıştırıldı.
9. 56 °C'de 15 dk inkübasyonu takiben 80 °C'de 15 dk inkübe edildi.
10. Örnekler 3 dk buzda bekletildikten sonra 15 dk 13,500 rpm'de santrifüj edildi.
11. Süpernatant pellete dokunulmadan dikkatli bir şekilde yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
12. Toplam örnek hacminin 1/10'u kadar DNase Booster Buffer (25 µl) ve 10 µl DNase I stok solüsyonu eklendi. Tüp aşağı yukarı çevrilerek karıştırıldı ve çok kısa süreli santrifüjleme yapıldı.
13. Örnekler oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı.

14. İnkübasyon sonrası tüpe 500 µl Buffer RBC eklendi ve tüp aşağı yukarı çevrilerek homojenizasyon sağlandı.
15. Örneğe 1200 µl % 100'lük Etanol eklendi ve pipetleme yapılarak iyice karıştırıldı. Santrifüj edilmeden, hızlıca bir sonraki basamağa geçildi.
16. Örnekten 500 µl alınıp 2 ml'lik toplama tüpü içine yerleştirilen RNeasy MinElute spin kolona pipetlendi ve 15 sn 13,000 rpm'de santrifüj edildi. Tüm örnek kolona bağlanana kadar bu işlem tekrarlandı.
17. RNeasy MinElute spin kolona 500 µl Buffer RPE eklenerek 15 sn 13,000 rpm'de santrifüj edildi.
18. Daha sonra kolona 500 µl Buffer RPE eklenerek 2 dk 13,000 rpm'de santrifüj edildi.
19. Spin kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne alındı. Kapak açık bırakılarak maksimum hızda 5 dk santrifüjlendi.
20. Spin kolon 1,5 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek 30 µl RNase içermeyen su ile elüsyon yapıldı (2 dk inkübasyonu takiben 13,500 rpm'de 1 dk santrifüjlendi) ve RNA örnekleri çeşitli aşamalarda kullanılmak üzere 2 µl, 3 µl, 5 µl olarak tek kullanımlık miktarlara bölünerek -80 °C'ye kaldırıldı.

#### **4.2.1.2 Hücre kültüründen ticari kit ile total RNA izolasyonu**

Real-time PCR reaksiyonunda pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere CD133 pozitif U87 hücre hattından QIAGEN RNeasy Mini kit ile aşağıdaki protokole göre total RNA izolasyonu yapıldı.

1. 350 µl Buffer RLT hücre pelleti üzerine eklendi.
2. Homojenizasyonu sağlamak için lizata pipetaj yapıldı.
3. 350 µl %70'lik EtOH eklendi ve pipetaj yapıldı.
4. 700 µl'lik lizat alınarak RNeasy Spin kolona aktarıldı. 15 sn 13,000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. (Thermo IEC Microlite RF)
5. 700 µl Buffer RW1 spin kolona eklendi ve kolonun yıkanması için 15 sn 13,000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.
6. 500 µl Buffer RPE spin kolona eklendi ve 15 sn 13,000 rpm'de santrifüjlendi. . Süpernatant atıldı ve toplama tüpü sonraki adımda tekrar kullanıldı.



7. 500 µl Buffer RPE spin kolona eklendi ve 2 dk 13,000 rpm'de santrifüjlendi. . Süpernatant toplama tüpü ile birlikte atıldı.
8. Spin kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne alındı ve tüpün ağzı kapatılarak boş bir şekilde 1 dk maksimum hızda santrifüjlendi.
9. Spin kolon 1,5 ml'lik yeni bir toplama tüpüne alındı ve 30 µl RNase içermeyen su eklendi ve 1 dk maksimum hızda santrifüj edildi.
10. Elüe edilen total RNA -80 °C'ye kaldırıldı.

#### **4.2.1.3 Hücre kültüründen trizol ile total RNA izolasyonu**

Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma Merkezi'nden alınan CD133 pozitif olan CaCo-2 insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattından trizol yöntemi ile total RNA izolasyonu yapıldı. Bu hücrelerden elde edilen RNA real-time PCR reaksiyonunda standart dilusyonları oluşturmak için kullanıldı. Total RNA izolasyonu için  $1,25 \times 10^6$  hücre kullanıldı.

1. 1 ml hücre çözeltisi üzerine 1,5 ml TriPure eklendi. Homojenizasyon için pipetaj yapıldı.
2. 5 dk oda sıcaklığında nükleoprotein kompleksinin çözülmesi için inkübasyona bırakıldı.
3. 0,3 ml kloroform (0,2 ml her 1 ml TriPure için) eklendi, 15 sn kuvvetlice karıştırıldı. 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
4. 12,000 g'de 15 dk 4 °C'de santrifüj edildi. (Hettich Zentrifugen Mikro 22)
5. Santrifüj sonrası oluşan 3 fazdan en üstteki renksiz kısım diğer fazlardan bulaş olmayacak şekilde çok yavaş alındı ve yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.
6. RNA'yı çöktürmek amacıyla 0,75 ml izopropanol alkol eklendi. Tüp aşağı yukarı çevrilerek homojenlik sağlandı ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
7. 12,000 g'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
8. %75'lik EtOH'dan 1,5 ml eklenerek pelet yıkandı. (1 ml EtOH 1ml TriPure için)
9. 7,500 g'de 5 dk 4 °C'de santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
10. Pelet oda sıcaklığında bekletilerek alkolün uçması sağlandı.
11. 30 µl RNase içermeyen su eklendi.

12. 15 dk 60 °C’de inkübe edildikten sonra RNA -80 °C’ye kaldırıldı. (Stuart Block Heater SBH200D/3)

#### **4.2.2. RNA kalite ve kontrol testlerinin yapılması**

##### **4.2.2.1 Saflık ve miktar tayini ölçümü**

Elde edilen RNA örneklerinin saflık ve miktar tayini ölçümü spektrofotometre (Beckman Coulter DU730) ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Moleküler Genetik Laboratuvarındaki nano-drop (Nano-Drop 1000) ile yapıldı. Spektrofotometrede ölçüm öncesi küveti yıkamak için aşağıdaki solüsyonlar hazırlandı.

- 500 ml 0,1 M NaOH
- 50 ml 1 mM EDTA

Spektrofotometre küveti her RNA ölçümden önce aşağıdaki sıraya uygun olarak solüsyonlar ile yıkanmıştır.

- a. %70’lik EtOH
- b. dH<sub>2</sub>O
- c. 0,1 M NaOH – 100 µl
- d. 1 mM EDTA – 100 µl
- e. PCR Grade su – 100 µl ( X 3 defa )

##### **4.2.2.2. Agaroz jel elektroforezinde görüntüleme**

İzole edilerek saflık ve miktar tayini ölçümü yapılan RNA örnekleri %1’lik nature agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edildi. (Güç kaynağı; Consort E861, Elektroforez tankı; Thermo EC Maxicell Primo EC340, Gel Explorer Ultra Lüm)

#### 4.2.2.3. AGILENT RNA 6000 nano assay analizi

Elde edilen RNA'ların bütünlüğünü kontrol etmek için AGILENT RNA 6000 Nano Assay analizi yapıldı. Analiz Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarından hizmet alımı olarak yapıldı.

#### 4.2.3. RNA'dan cDNA sentezi

İzolasyon sonrası elde ettiğimiz RNA'yı uzun süre saklayabileceğimiz ve daha dayanıklı bir molekül olan cDNA'ya (complementer DNA) çevirmek amacıyla ROCHE Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez kiti (Version 07) kullanıldı. Bu kitin protokolü aşağıda verildiği gibi uygulanmıştır.

1. Reaksiyon 500 ng total RNA üzerinden kurulacağından  $A_{260}$  oranlarına göre, çalışılacak örneklerden kaç  $\mu$ l RNA alınacağı hesaplanarak ilk aşamada son hacim 11,4  $\mu$ l olacak şekilde primer ve kalıp RNA dışında eklenecek PCR Grade su hacmi belirlendi.
2. Protokolde belirtilen miktarlar aşağıdaki Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.2.** cDNA sentez protokolünde birinci basamak bileşenlerinin miktar

<b>Kalıp RNA</b>	500 ng RNA'ya eşdeğer hacim
<b>Random hexamer primer</b>	2 $\mu$ l
<b>Su</b>	değişken
<b>Toplam</b>	11,4 $\mu$ l

3. RNA'nın denatürasyonu için hazırlanan karışım 10 dk 65 C'ye ayarlanmış termal cyclor cihazında inkübasyona bırakıldı. (Bio-rad C100 Thermal Cyclor, Biometra Thermocyclor)
4. İnkübasyon devam ederken yeni bir PCR tüpüne protokolde belirtilen ve aşağıda Çizelge 4.3.'de gösterilen bir reaksiyonluk miktarlar dikkate alarak çalışılan örnek sayısı kadar reaksiyon karışımı hazırlandı.

**Çizelge 4.3.** cDNA sentez protokolünde ikinci basamak bileşenlerinin miktarı

<b>Reverse Transkriptaz Buffer</b>	4 µl	x örnek sayısı
<b>dNTP</b>	2 µl	x örnek sayısı
<b>DTT</b>	1 µl	x örnek sayısı
<b>RNase İnhibitörü</b>	0,5 µl	x örnek sayısı
<b>Reverse Transkriptaz</b>	1,1 µl	x örnek sayısı
<b>Toplam</b>	8,6 µl	x örnek sayısı

5. Hazırlanan master mix çok kısa santrifüjlendi ve her örnek tüpüne 8,6 µl olacak şekilde dağıtıldı ve böylece son hacim 20 µl'ye tamamlanmış oldu.
6. Tüplerin duvarındaki tanecikleri indirmek için çok kısa bir santrifüjleme yapıldıktan sonra aşağıdaki koşulları sağlanarak kapak sıcaklığı 105 C olan termal cyclus cihazına yerleştirildi.

**Çizelge 4.4.** cDNA sentezi reaksiyon sıcaklıkları ve süresi

<b>Basamak</b>	<b>Süre</b>	<b>Sıcaklık</b>
1	10 dk	29 °C
2	60 dk	48 °C
3	5 dk	85 °C

7. Elde edilen cDNA tüpleri -20 °C'de saklandı.

#### **4.2.3.1. Eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu standartları için cDNA sentezi**

Standartları hazırlamak için CaCo-2 hücrelerinden elde edilen RNA kullanıldı. Tüm örneklerde olduğu gibi 500 ng kalıp RNA ile reaksiyon kurulmuştur. RNA haricindeki tüm bileşenler beş katına çıkarılarak toplam hacim 100 µl olacak şekilde cDNA sentezi yapılmıştır.

**Çizelge 4.5.** cDNA sentez protokolünde birinci basamak bileşenlerinin miktarı

<b>Total RNA</b>	1,261	µl
<b>Randem Hexamer Primer</b>	10	µl
<b>Su</b>	45,74	µl
<b>Toplam</b>	57	µl

1. Yukarıda Çizelge 4.5.'de miktarları belirtilen bileşenler PCR tüpüne eklendi ve 10 dk 65 C'de denatürasyon için inkübasyona bırakıldı.
2. Denatürasyon sonrası aşağıda Çizelge4.6'da belirtilen miktarlar tüpe eklendi.

**Çizelge 4.6.** cDNA sentez protokolünde ikinci basamak bileşenlerinin miktarı

<b>Reverse Transkriptaz Buffer</b>	20	µl
<b>dNTP</b>	10	µl
<b>DTT</b>	5	µl
<b>RNase İnhibitörü</b>	2,5	µl
<b>Reverse Transkriptaz</b>	5,5	µl
<b>Toplam</b>	43	µl

3. Programı aşağıda Çizelge 4.7.'de belirtilen sıcaklık derecelerine ayarlanmış termal cycler cihazına yerleştirildi ve reaksiyon başlatıldı.

**Çizelge 4.7.** cDNA sentezi reaksiyon sıcaklıkları ve süresi

<b>Basamak</b>	<b>Süre</b>	<b>Sıcaklık</b>
1	10 dk	29 °C
2	60 dk	48 °C
3	5 dk	85 °C

4. Reaksiyon bitiminde tüp önce buza alınarak enzim aktivitesi durduruldu ve daha sonra -20 °C'ye kaldırıldı.

#### 4.2.4. Eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR)

Spesifik bağlanma özelliğinden ve amplikon boyunun kısa olmasından dolayı qRT-PCR’da TaqMan probu tercih edildi. Bunun için ROCHE real-time Ready Catalog Assay serisinden real-time Ready CD133 (PROM1) Single Assay Probe ve real-time Ready ACTB Single Assay Probe Version 3.0 kullanıldı. Her iki probunda bazı özellikleri aşağıda Çizelge 4.8.’de belirtilmiştir. (LightCycler 480, 384’lü plaka)

**Çizelge 4.8.** Real-time ready single assay problemlerin özellikleri

Assay ID	Adı	Amplikon Boyu	Bağlanma Sıcaklığı	Primer Boyu
101125	ACTB	91 bç	60 °C	20 bç
139827	PROM1	77 bç	60 °C	20 bç

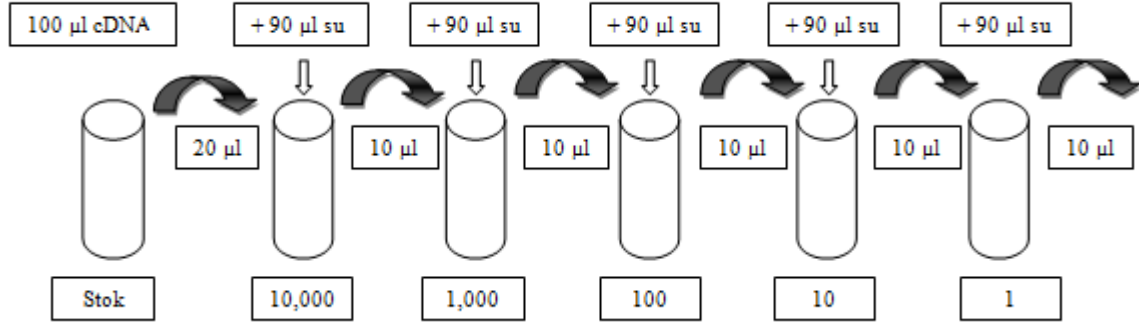
Deneye başlamadan önce PCR plakaları aşağıda belirtildiği gibi iki aşama halinde cDNA’lar eklenerek hazır hale getirildi. Reaksiyon günü prob master karışımı hazırlanarak cDNA’ların üzerine dağıtıldı ve reaksiyon başlatıldı.

##### 4.2.4.1. Standart dilüsyonların hazırlanması

1. Standart dilüsyonları hazırlamak amacıyla özel olarak sentezlenen cDNA tüpünden 20 µl alınarak yeni bir ependorf tüpe aktarıldı. (1)
2. 20 µl cDNA bulunan tüpten 10 µl cDNA alınarak yeni bir ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 90 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve pipetaj yapıldı. ( $10^{-1}$ )
3. Seyreltilmiş tüpten 10 µl alınarak yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 90 µl nükleaz içermeyen su eklendi. ( $10^{-2}$ )
4. Seyreltilmiş tüpten 10 µl alınarak yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 90 µl nükleaz içermeyen su eklendi. ( $10^{-3}$ )
5. Seyreltilmiş tüpten 10 µl alınarak yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 90 µl nükleaz içermeyen su eklendi. ( $10^{-4}$ )

6. Hazırlanan dilüsyonlar etiketlenerek derin kuyulu plakaya yüklenmek üzere -20 °C'ye kaldırıldı.

**Çizelge 4.9.** Standart dilüsyonların hazırlanışı



#### 4.2.4.2. cDNA'ların derin kuyulu plakaya aktarılması

Öncelikle 384'lü derin kuyulu plaka düzenine göre bir örnek yükleme planı oluşturuldu ve cDNA örnekleri aşağıdaki dilüsyon uygulanarak PCR tüplerinden derin kuyulu plakaya aktarıldı.

- 20 µl cDNA sentezi ürününden 10 µl alındı plaka üzerinde belirlenen kuyuya eklendi. cDNA, üzerine 20 µl nükleaz içermeyen su eklenerek 1:3 oranında dilüe edildi. Tüm örnekler ve pozitif kontrol bu şekilde yüklendi.
- Standartlar herhangi bir dilüsyon uygulanmadan yüklendi.
- Negatif kontrol için cDNA yerine 3 µl nükleaz içermeyen su yüklendi.
- Özel kapağı ile kapatılan derin kuyulu plaka -20 °C'ye kaldırıldı.

#### 4.2.4.3. Örneklerin derin kuyulu plakadan rt-pcr plakasına aktarımı

Derin kuyulu plakaya aktarılan tüm örnekler için 384'lü plaka üzerinde bir çalışma planı oluşturuldu. 3 tekrarlı çalışılacağından ACTB ve CD133'ün her biri için iki tane plaka

kullanılacaktır. Hazırlanan yükleme planına göre örneklerden 3'er µl derin kuyulu plakadan alınarak PCR plaklarına aktarıldı ve plaka -20 °C'de saklandı.

#### 4.2.4.4. Probe master karışımının hazırlanması ve reaksiyonun kurulumu

Prob master karışımı pre-PCR alanı olarak ayrılan laminar kabin içerisinde aşağıdaki Çizelge 4.10.'da verilen miktarlara göre hazırlandı. (Hoten Lamin Air)

**Çizelge 4.10.** Real-time PCR prob master bileşenlerinin miktarı

<b>FastStart Probe Master</b>	5 µl	x örnek sayısı
<b>Real-time Ready Single Assay Probe</b>	0,5 µl	x örnek sayısı
<b>Su</b>	1,5 µl	x örnek sayısı
<b>Toplam</b>	7 µl	x örnek sayısı

1. Karışım hazırlandıktan sonra ependorf tüp dışarı alındı ve daha önce -20 °C'den çıkartılan ve duvardaki damlaları indirmek için çok kısa santrifüjlenen plaka kuyularına 7 µl olarak dağıtıldı.
2. 3 µl cDNA üzerine eklenen 7 µl prob master karışımı ile son hacim 10 µl'ye tamamlandı.
3. Plaka sealing foil ile hava almayacak şekilde kapatıldı.
4. 1,500 rpm'de 2 dk santrifüjlendi.
5. LightCycler 480 cihazına yerleştirilen plaka için aşağıda Çizelge 4.11.'de gösterilen program girildi.
6. Reaksiyon sonunda cihazdan alınan plaka -20 °C'de saklanmak üzere kaldırıldı.



**Çizelge 4.11.** ROCHE LightCycler 480-384 kuyulu Plaka için RT-PCR programı

<b>Tespit Formatı</b>	<b>Blok Tipi</b>	<b>Reaksiyon Hacmi</b>	
Monocolor Hidrolysis Probe/UPL Probe	384	10 µl	
<b>Filtre Kombinasyonu:</b> Dinamik Mod			
LighCycler 480 Instrument Versiyon I veya II için sırasıyla FAM 483 – 533 ya da 465-510			
<b>Programlar</b>			
<b>Program Adı</b>	<b>Döngü</b>	<b>Analiz Modu</b>	
Pre-inkübasyon	1	Hiçbiri	
Amplifikasyon	50	Kantifikasyon	
Soğuma	1	Hiçbiri	
<b>Sıcaklık Hedefi</b>			
<b>Hedef (°C)</b>	<b>Kazanç Modu</b>	<b>Süre (ss:dk:sn)</b>	<b>Ramp Rate (°C/sn)</b>
<b>Pre-inkübasyon</b>			
95	Hiçbiri	00:10:00	4.8
<b>Amplifikasyon</b>			
95	Hiçbiri	00:00:10	4.8
60	Hiçbiri	00:00:30	2.5
72	Tek	00:00:01	4.8
<b>Soğuma</b>			
40	Hiçbiri	00:00:30	2.5

#### 4.2.4.5. Optimizasyon

Tüm reaksiyonlar bittikten sonra agaroz jelde yapılan kontroller sonrası CaCo-2 hücrelerinin ACTB reaksiyonlarında 200 bp'nin hemen altında non-spesifik bir bant olduğu görülmüştür. Non-spesifik bağlanmayı önleyebilmek adına sırasıyla aşağıdaki koşullarda reaksiyonlar kurulmuştur. Her reaksiyon sonrası elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Tüm bu optimizasyon çalışmaları ile non-spesifik bant içeren örnekler olası DNA kontaminasyonları açısından değerlendirildi.

1. 62°C bağlanma sıcaklığında
2. 64°C bağlanma sıcaklığında
3. 66°C bağlanma sıcaklığında
4. 68°C bağlanma sıcaklığında
5. 70°C bağlanma sıcaklığında
6. 70°C bağlanma sıcaklığında 40 döngü
7. 72°C bağlanma sıcaklığında 40 döngü
8. 72°C bağlanma sıcaklığında 45 döngü
9. 72°C bağlanma sıcaklığında 5 döngü + 70 C bağlanma sıcaklığında 35 döngü

#### **4.2.4.6. PCR ürünlerinin görüntülenmesi**

Real-time PCR sonucunda CD133 pozitif sinyal aldığımız örneklerin hem ACTB hem de CD133 kuyuları, elde edilen piklerin kontrolü amacıyla %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Böylece non-spesifik bağlanma olup olmadığı ve aldığımız sinyallerin jelde görüntülenerek kontrolü sağlandı. (Güç Kaynağı; Labnet Power Station 300, Görüntüleme Cihazı; Gene Genius Bio Imaging System)

#### **4.2.5. İstatistik**

##### **4.2.5.1. Real-time PCR analizleri**

qRT-PCR sonucunda Pfaffl metodu ile yapılan analiz sonucunda elde edilen veriler t-testi ile değerlendirilmiştir.

##### **4.2.5.2. Sağkalım analizleri**

Hastaların sağkalım analizleri Kaplan-Meier metoduna göre yapılmıştır.

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. Saflık ve Miktar Tayini Ölçüm Sonuçları

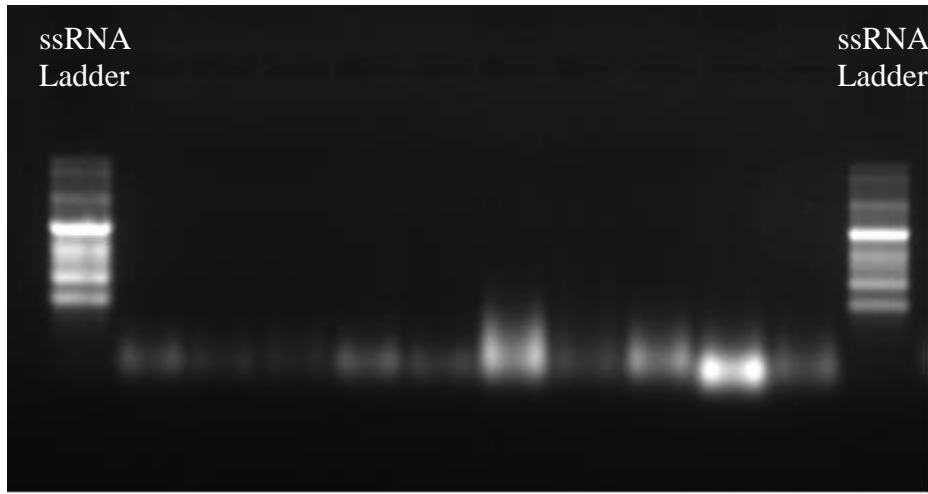
Saflık ve miktar tayinleri spektrofotometre/nanodorp ile yapıldı. Çalışma sonucunda CD133 pozitif çıkan örneklere ait saflık ve miktar tayini sonuçları Tablo 'da gösterilmiştir. Çalışmaya dahil olan tüm hasta ve kontrol örneklerinin nano-drop tayin sonuçları EK1'de yer almaktadır.

**Çizelge 5.1.** CD133 pozitif örneklerin Nano-drop ölçümü sonuçları

Örnek Adı	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> oranı	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> oranı	A <sub>260</sub> oranı
U87 hücreleri	2,1	2,1	744,7 ng/µl
CaCo-2 hücreleri	1,8	2	396,5 ng/µl
K030	2	2	230,9 ng/µl
K050	2	1,9	231,3 ng/µl
K056	2	2	168,3 ng/ul
K068	2	1,9	299,7 ng/ul
K070	1,9	1,5	84,8 ng/ul
K075	2	2,1	207,0 ng/ul
K077	2	2	309,4 ng/ul
K081	2	2	123,7 ng/ul
K83	2	2,1	138,1 ng/ul
K090	2	2	60,0 ng/ul
K098	1,9	1,9	316,4 ng/ul
K106	2	2	306,3 ng/ul
K108	2	2	639,5 ng/ul
K109	2	2	76,5 ng/ul
K111	2	1,9	135,8 ng/ul
K112	2	2,1	163,9 ng/ul
Örnek 46	1,7	0,8	73,0 ng/ul
Örnek 47	1,9	1,8	139,1 ng/ul
Örnek 53	1,9	1,9	141,4 ng/ul
Örnek 61	1,7	1,8	70,7 ng/ul
Örnek 62	1,9	1,5	50,4 ng/ul
Örnek 63	1,9	1,9	217,6 ng/ul
Örnek 77	1,8	1,7	103,6 ng/ul,

## 5.2. RNA İzolasyonu Sonuçları

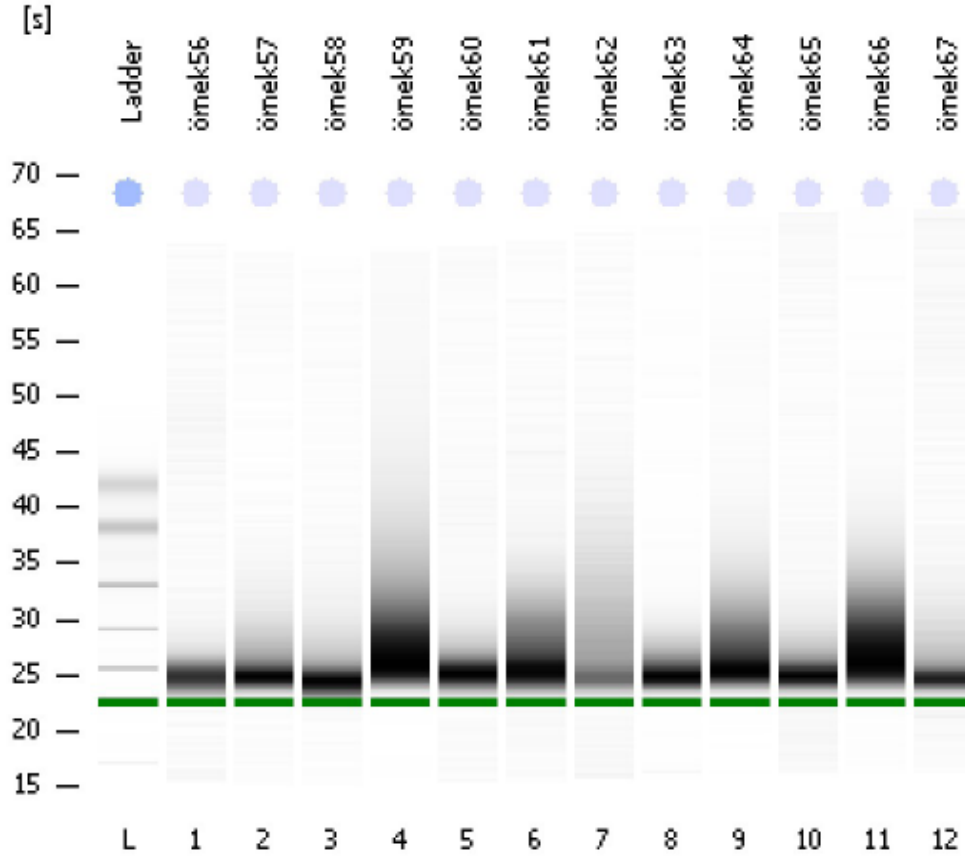
RNA izolasyonunu takiben ürünler hem RNA varlığını kontrol edebilmek hem de DNA kontaminasyonu olup olmadığını değerlendirmek amacıyla %1'lik agaroz jelde yürütüldü. %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Parafinize dokulardan RNA izolasyonu yapıldığı için olası RNA degradasyonu göz önünde bulundurularak real-time PCR'da primer ampikon boyunun 100 bç'nin altında olmasına dikkat edildi. RNA izolasyonunu takiben yapılan agaroz jel elektroforezlerini temsilen bir jel görüntüsü Şekil 5.1.'de gösterilmektedir.



Şekil 5.1. İzole edilen RNA örneklerine ait temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü

## 5.3. AGILENT RNA 6000 Nano Assay Analizi Sonuçları

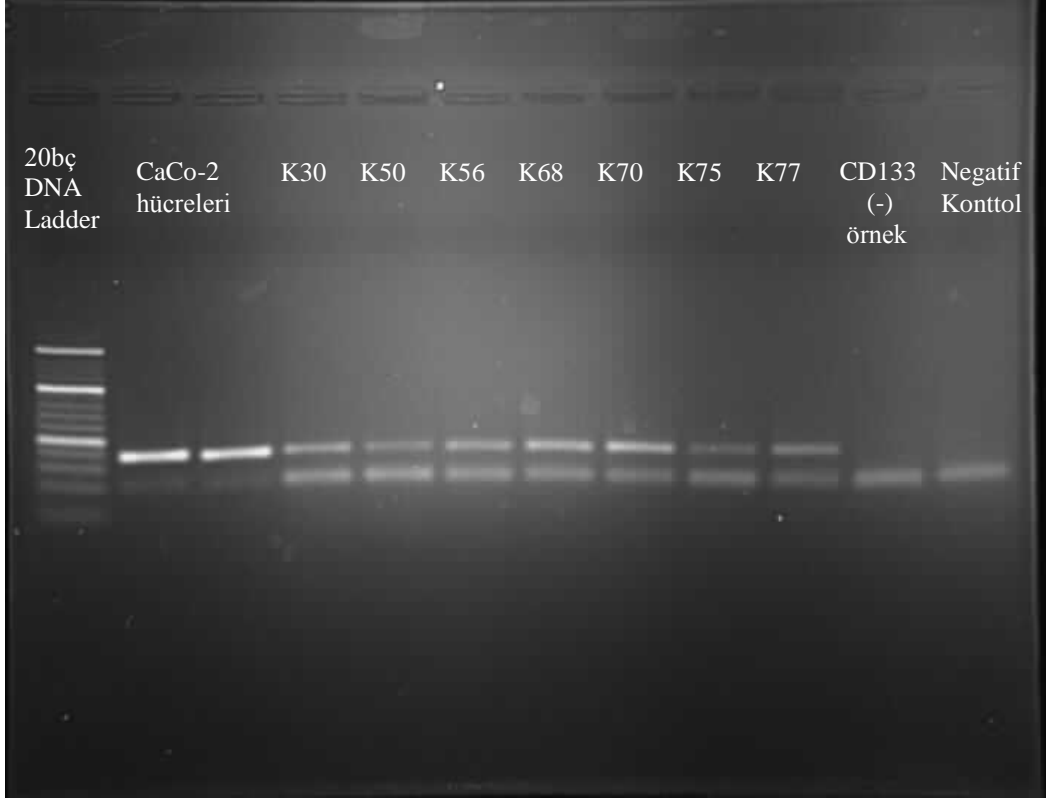
Agaroz jel elektroforezi sonuçları bize RNA örneklerimizin büyük ölçüde degrade olduğunu gösterdi. Bu nedenle örneklerimizin hangi boyutlarda degradasyona uğradığını detaylı görebilmek amacıyla yapılan RNA 6000 Nano Assay analizi agaroz jel elektroforezi sonuçlarını desteklemiştir. Genel olarak tüm örneklerde alınan pikler 20 bç boyutunda veya daha küçük idi. Temsili olarak bir çip sonucu aşağıda Şekil 5.2.'de gösterilmektedir. Diğer çiplerin sonuçları EK2'de bulunmaktadır.



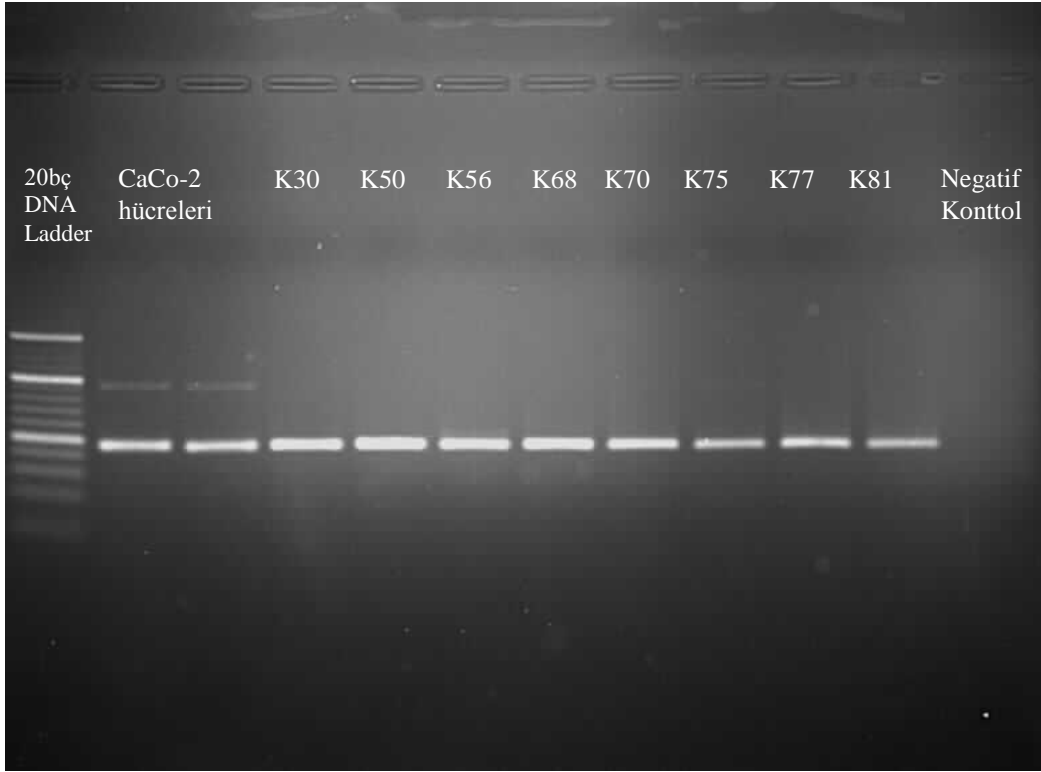
Şekil 5.2. AGILENT RNA 6000 Nano Assay Analizi Temsili Sonucu (beşinci çip)

#### 5.4. Eş Zamanlı Kantitatif PCR Sonuçları

Herhangi bir optimizasyon çalışmasına ihtiyaç duymayan ve optimize edilmiş satın alınan CD133 ve ACTB TaqMan probları kullanılarak cDNA örnekleri ile kantitatif RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ürünler de %2'lik agaroz jelde kontrol edildi. CD133 ve ACTB genlerine ait qRT-PCR ürünlerinin temsili agaroz jel elektroforezi görüntüleri Şekil 5.3. ve Şekil 5.4.'de gösterilmektedir.



Şekil 5.3. CD133 geni qRT-PCR ürünlerini temsilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 5.4. ACTB geni qRT-PCR ürünlerini temsilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Üçlü tekrar çalışıldığı için öncelikle her örneğin üç tekrarı içinde ortalama Crossing Point (Cp) değeri hesaplandı. Tüm örneklerin ortalama Cp değeri hem CD133 hem de ACTB için hesaplandıktan sonra sadece CD133 pozitif olan örnekler için istatistikî analiz değerlendirmesi yapıldı. Elde edilen ham verilerin analizi relatif kantifikasyon ile yapıldı ve Pfaffl Metodu kullanıldı. (96)

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

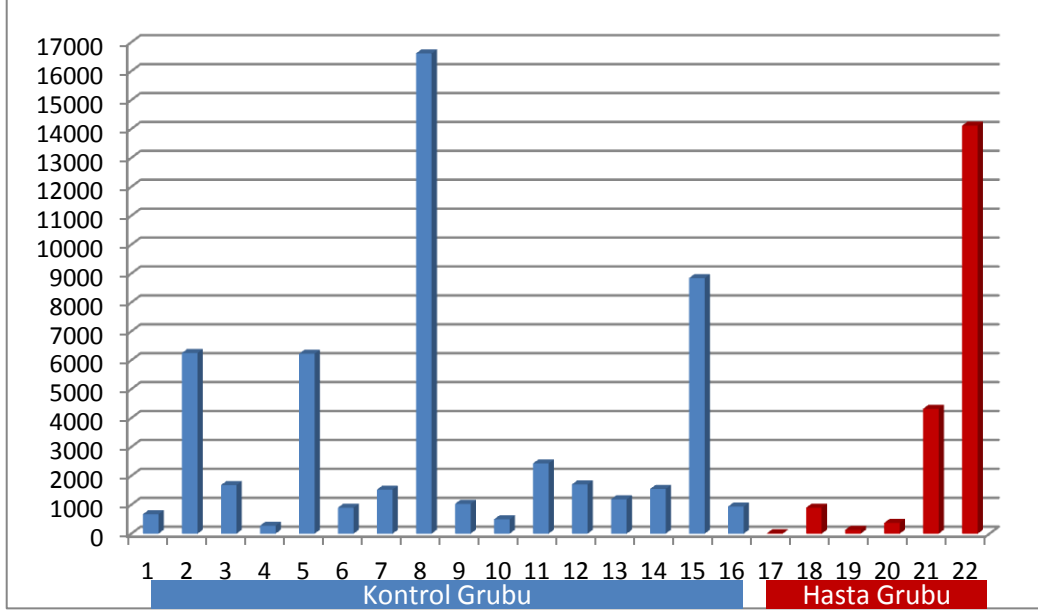
qRT-PCR sonucunda CD133 pozitif olan örneklerin ortalama Cp değerleri alınmış ve Pfaffl Metodunda göre çalıştığımız örneklerin pozitif kontrol örneğine göre CD133 gen ekspresyon düzeyi belirlenmiştir. Analiz sonucunda elde ettiğimiz standart eğriye göre hesaplanan amplifikasyon etkinlik değeri (Efficiency, E) CD133 ve ACTB için 2 olarak bulundu ve aşağıdaki tabloda belirtildi. Yapılan hesaplamaların sonucunda CD133 pozitif olan örneklerin analiz sonuçları ile birlikte ortalama Cp değerleri aşağıda Çizelge 5.2.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 5.2.** qRT-PCR ürünlerinin ortalama Cp değerleri ve Pfaffl Metodu ile analiz sonuçları

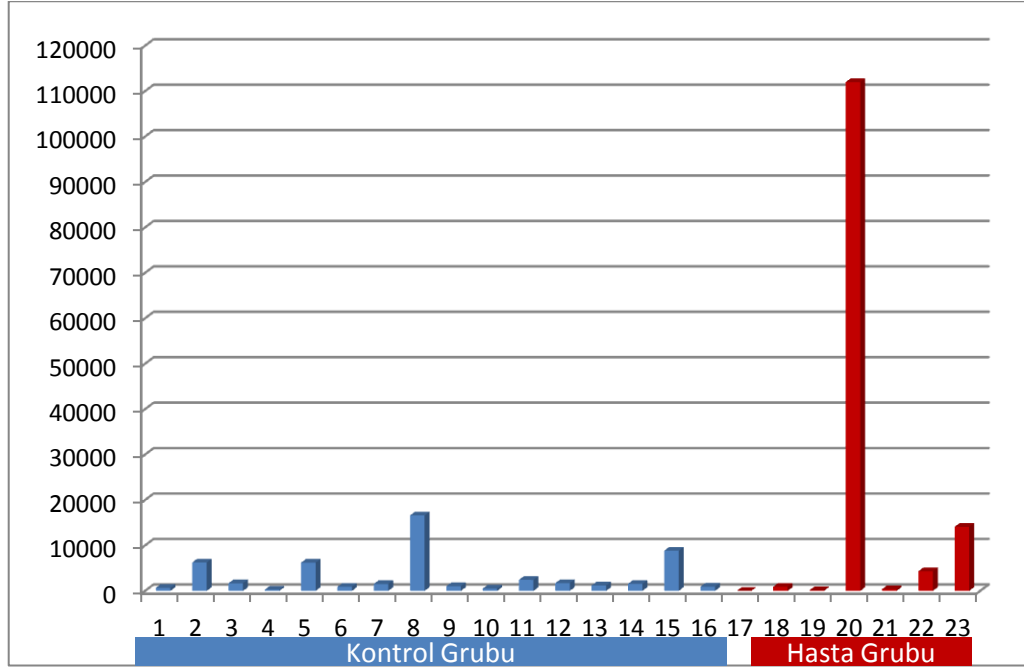
	2	2					
Adı	ACTB	CD133	ACTB	CD133	ACTB	CD133	CD133/ACTB
U87 hücreleri	18,10	32,60	0	0	1	1	1
K030	32,62	37,72	-14,52	-5,12	0,00004	0,0288	674,03
K050	34,85	36,74	-16,75	-4,14	0,00001	0,0567	6251,56
K056	33,62	37,41	-15,52	-4,81	0,00002	0,0356	1678,94
K068	31,16	37,56	-13,06	-4,96	0,00012	0,0321	275,01
K070	35,23	37,13	-17,13	-4,53	0,00001	0,0433	6222,74
K075	31,82	36,51	-13,72	-3,91	0,00007	0,0665	899,72
K077	33,08	37,01	-14,98	-4,41	0,00003	0,0470	1523,67
K081	36,26	36,74	-18,16	-4,14	0,00000	0,0567	16612,71
K083	33,08	37,58	-14,98	-4,98	0,00003	0,0318	1029,93
K090	31,22	36,77	-13,12	-4,17	0,00011	0,0556	495,70
K098	35,63	38,88	-17,53	-6,28	0,00001	0,0129	2429,88
K106	31,66	35,43	-13,56	-2,83	0,00008	0,1411	1704,34
K108	30,44	34,72	-12,34	-2,12	0,00019	0,2300	1189,93
K109	33,80	37,71	-15,70	-5,11	0,00002	0,0290	1544,94
K111	34,41	35,80	-16,31	-3,20	0,00001	0,1088	8841,04
K112	30,70	35,33	-12,60	-2,73	0,00016	0,1507	937,93
Örnek 46	26,99	37,43	-8,89	-4,83	0,00210	0,0352	16,72
Örnek 47	29,04	33,73	-10,94	-1,13	0,00051	0,4569	897,64
Örnek 53	27,47	34,96	-9,37	-2,36	0,00151	0,1948	128,59
Örnek 61	37,72	35,45	-19,62	-2,85	0,00000	0,1387	112015,07
Örnek 62	28,04	34,00	-9,94	-1,40	0,00102	0,3789	371,36
Örnek 63	34,19	36,61	-16,09	-4,01	0,00001	0,0621	4319,55
Örnek 77	36,29	37,00	-18,19	-4,40	0,00000	0,0474	14115,57



Pfaffl Metodu ile yapılan analiz sonuçlarına göre hasta ve kontrol grubunda elde edilen CD133 ekspresyonu verileri Şekil 5.5. ve Şekil 5.6.'da gösterilmiştir.

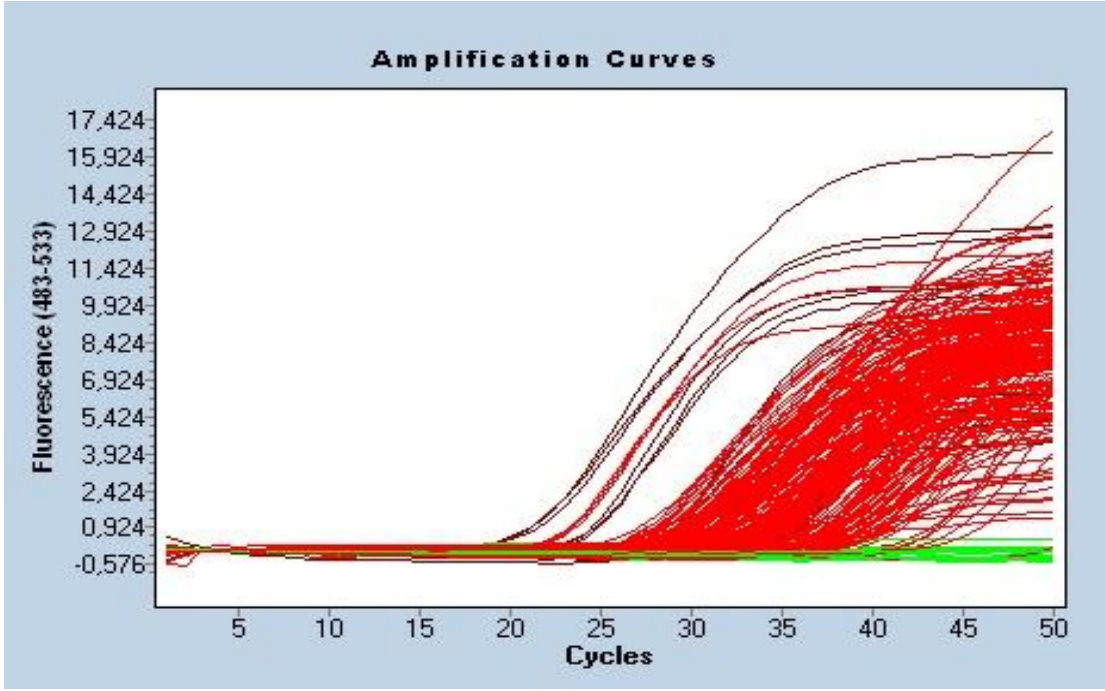


Şekil 5.5. Örnek 61 dâhil edilmediğinde elde edilen grafik

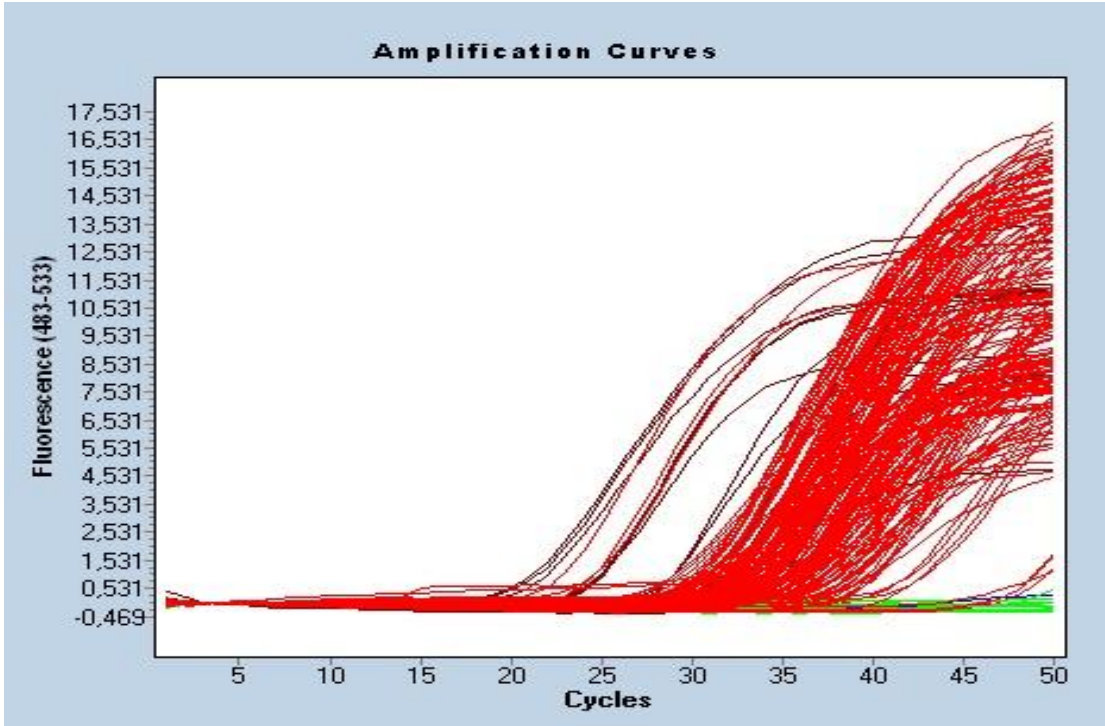


Şekil 5.6. Tüm CD133 pozitif örnekleri kapsayan grafik

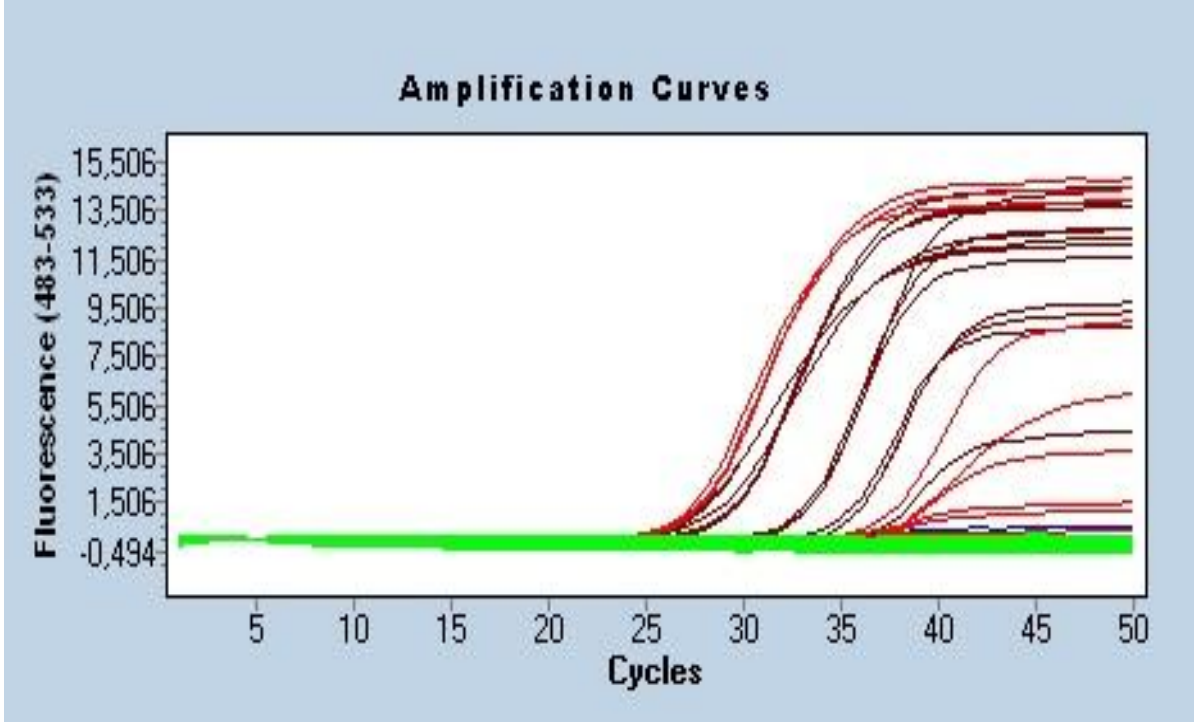
Reaksiyon sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrisi grafikleri aşağıda gösterilmiştir.



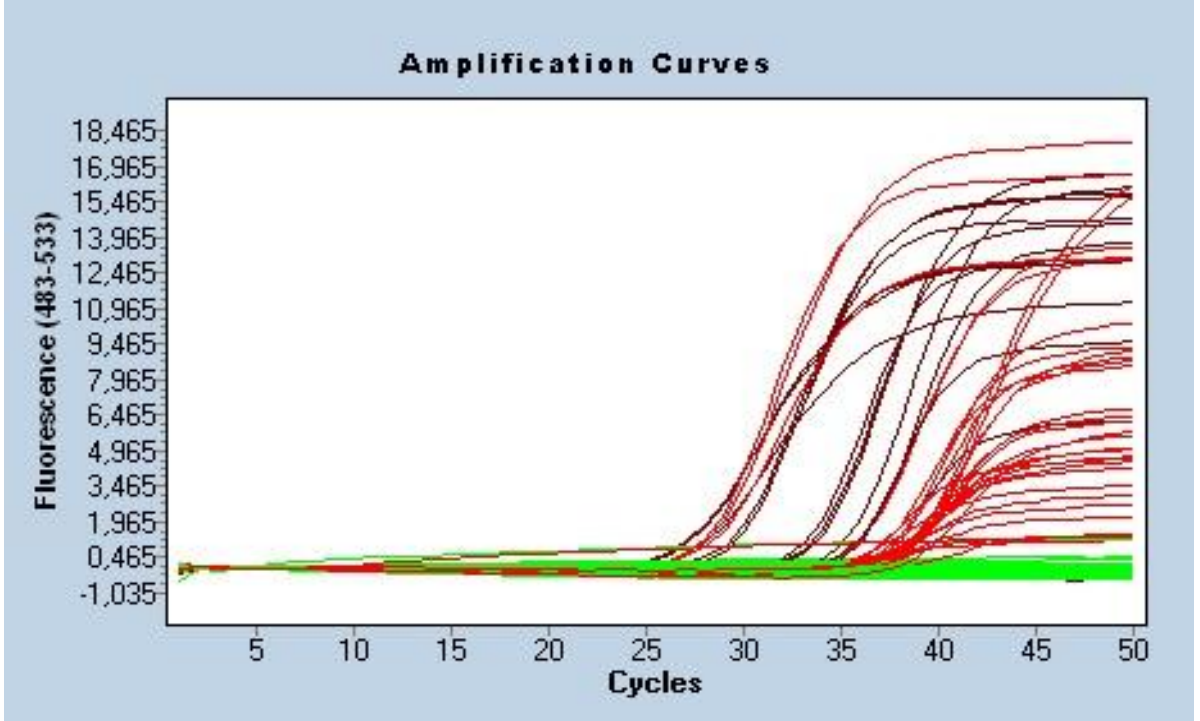
Şekil 5.7. ACTB birinci plaka amplifikasyon eğrisi grafiği



Şekil 5.8. ACTB ikinci plaka amplifikasyon eğrisi grafiği



Şekil 5.9. CD133 birinci plaka amplifikasyon eğrisi grafiği



Şekil 5.10. CD133 ikinci plaka amplifikasyon eğrisi grafiği

## 5.5. Hasta Özellikleri ve Prognostik Değerlendirme

Çalışmaya dâhil edilen hastalarımızın ortalama yaşı 59 olup, %40,8'i kadın (n=42) %59,2'si erkek (n=61) idi. Primer tümör bölgesi hastaların %81,6'sında kolon (n=84) %18,4'ünde rektum (n=19) şeklindedir. Histopatolojik olarak olguların % 79'u adenokarsinoma iken % 21'i müsinöz adenokarsinomadır. Hastalarımızın %76'sı erken evrede (I-III) iken yaklaşık % 24'ü metastatik evrede idi. (Çizelge 5.3.)

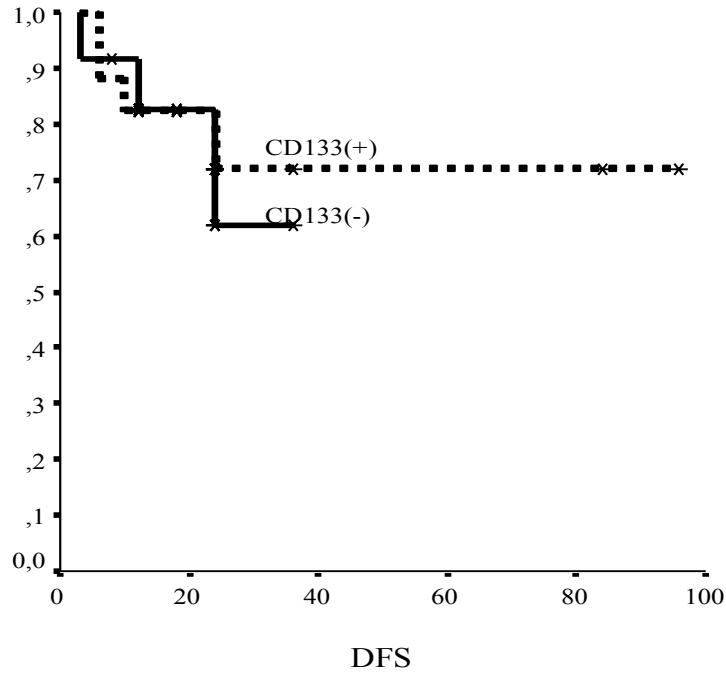
**Çizelge 5.3.** Hasta Özellikleri

<b>Parametre</b>	<b>N (%)</b>
Yaş,Ortanca (Dağılım)	59 (28-81)
<b>Cinsiyet</b>	
Kadın	42 (40,8)
Erkek	61 (59,2)
<b>Hastalık bölgesi</b>	
Kolon	84 (81,6)
Rektum	19 (18,4)
<b>Evre</b>	
I	2 (1,9)
II	28 (27,2)
III	48 (46,6)
IV	25 (24,3)
<b>Greyd</b>	
1	3 (2,9)
2	77 (74,8)
3	23 (22,3)

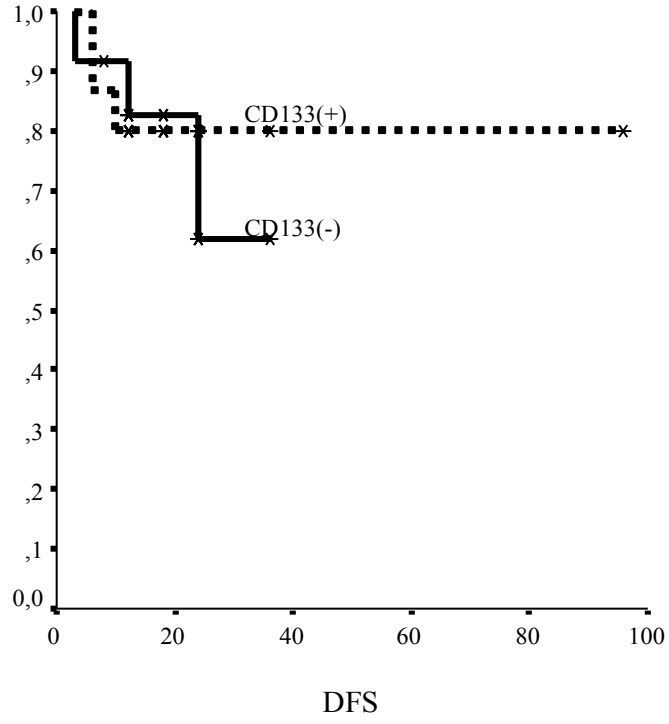
Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin istatistik değerlendirmesi sonucunda; tümör dokusunda CD133 pozitifliği ile cinsiyet, hastalığın primer bölgesi, tümörün evresi ve greydi arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $p>0.05$ ). Çalışmamızda toplam 103 KRK tümör örneği üzerinde çalışıldı ve sadece 7 örnekten CD133 pozitif sonuç alındı. Kaplan Meier Metoduna göre KRK tümör dokularında yapılan analiz sonucunda 5 yıllık hastalıksız sağkalım oranı CD133 pozitif olgularda %72,1 iken CD133 negatif olgularda

%61,8 olarak saptandı (p=0,801). KRK'li olgularda hastalıksız sağkalım eğrisi Şekil 5.11.'de gösterilmektedir.

CD133 kolon KKH belirteci olmanın yanı sıra aynı zamanda normal kolon kök hücre belirteci olduğu için sağlıklı kolon dokularını içeren kontrol grubu üzerinde de CD133 ekspresyonu düzeyi araştırıldı. Çalışmamızda kontrol grubunu oluşturan 34 sağlıklı kolon dokusundan 16 örnekten CD133 pozitif sonuç alındı. Normal kolon mukozasında CD133 pozitifliği kadınlarda erkeklere göre daha fazla bulundu (%60 vs %40) ancak aradaki, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p=0,273). Kaplan Meier Metoduna göre sağlıklı kolon dokularında yapılan analiz dikkate alındığında 5 yıllık hastalıksız sağkalım oranı CD133 pozitif olgularda %80,1 iken CD133 negatif olgularda %61,2 olarak saptandı (p=0,727). Normal kolon mukozası sonuçlarına dayalı olarak hastalar gruplara ayrıldığında elde edilen hastalıksız sağkalım eğrisi Şekil 5.12'de gösterilmektedir.



**Şekil 5.11.** Tümör dokusunda CD133 durumuna göre hastalıksız sağkalım eğrisi  
CD133(+): %72,1 ve CD133(-): %61,8; (p=0,801)



**Şekil 5.12.** Normal Kolon Mukozasında CD133 pozitif olan hastaların hastalıksız sağkalım eğrisi, 5-yıllık hastalıksız sağkalım oranı:CD133(+): %80,1 vs CD 133(-):%61,2; p=0,727)

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde büyük bir sağlık problemi olan kanserde üçüncü en yaygın kanser tipi olan kolorektal kanser insidansı önemli bir orana sahiptir. İlerleyen teknoloji ve sağlık imkânlarına rağmen kolorektal kanserin henüz tedavisi kesin olarak bulunamamıştır. Özellikle metastatik KRK hastalarında konvansiyonel tedavilere direnç, nüks bu süreçte karşılaşılan en önemli problemlerdendir.

Bu problemlerin üstesinden gelebilmek adına son yıllarda kanser oluşumuna farklı bir bakış getiren kanser kök hücresi hipotezinin önemi giderek artmaktadır. Yapılan çalışmalar birçok epitelyal kanser çeşidinde bazı genleri eksprese eden hücrelerin kök hücre karakteri özelliği taşıdığını ve kanseri başlatan hücreler olduğunu göstermektedir. Bu nedenle kesin bir tedavi için kanser kök hücrelerinin kimliklendirilmesi çalışmaları hız kazanmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler hedefe yönelik tedavi stratejisi geliştirmek için son derece önemlidir.

Kolon kanserinde kanser kök hücre belirteci olarak öne çıkan en önemli protein CD133 glikoproteinidir. CD133 proteini immünohistokimyasal olarak tümör dokularında bakılabileceği gibi yine tümör dokularında veya hastaların periferik kan hücrelerinde CD133 gen ifade düzeyleri de çok sayıda araştırmada incelenmiştir. Parafinize tümör dokularında CD133 gen ifade artışı ile ilgili değişik sonuçlar bildirilmiştir. Gaiser ve arkadaşlarının çalışmasında parafinize kolon kanseri tümör dokusunda CD133 pozitifliği %80 olarak bildirilirken (97) bir başka çalışmada Xi ve arkadaşı bu oranı %54,7 olarak bildirmişlerdir (98). Bizim çalışmamızda ise parafinize kolon kanserli tümör dokusunda CD133 gen ifade artışını hastalarımızın %6,7'sinde bulduk. Literatürde bu kadar değişken sonuçlar bildirilmesinde parafinize dokulardan gen ifade çalışmalarının bazı sınırlamaları olabileceğini göstermektedir. Örneğin bu kısıtlamalardan bir tanesi parafinize dokulardan yeterli ve kaliteli RNA elde edilmesinde karşılaşılan güçlüklerdir. Nitekim bizim çalışmamızda da RNA kalitesi birçok örneğimizde iyi değildi (Şekil 5.1.). Parafinize arşiv dokularından gen ifadesi çalışılmasına karşılaşılan bir başka güçlük de doku kesitlerindeki tümör hücrelerinin oranıdır. Lazer diseksiyon mikroskobu ile tümör dokusu spesifiye edilemiyor ise genellikle normal doku ile tümör hücreleri dilüe olabilmektedir. Bu

çalışmamızda doku kesitlerimizdeki tümör oranının en az %70 olmasına dikkat edilmiştir Patoloji değerlendirmeleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji anabilim Dalı'ndan Doç Dr. Berna Savaş tarafından yapılmıştır.

Kolon kanserli hastalarda CD133 ifadesinin klinikopatolojik parametreleri ve prognoz ile ilişkisini araştıran bazı çalışmalar vardır. Yakın zamanda yapılan bir meta analiz çalışmasında özellikle histokimyasal olarak CD133 tayininde proteinin ifade derecesinin yüksekliği ile kötü sağkalım arasında bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (99). Söz konusu bu meta-analizde immün histokimyasal olarak CD133 tayinine dayalı olan çalışmalar değerlendirmeye alınmıştır. Horst ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada %50'den fazla tümöral glandda CD133 pozitif boyanması CD133-yüksek olarak tanımlanmış ve bu tanımlamaya göre hastaların %26'sının pozitif olduğu gösterilmiştir. Klinikopatolojik özellikler (yaş, cinsiyet, tümör boyutu vb) ile CD133 arasında pozitif bir ilişki gösterilemez iken CD133-yüksek olan hastalarda 5 ve 10 yıllık sağkalım oranlarının daha kötü olduğu bulunmuştur (100). Xi Ho ve arkadaşının yaptığı bir çalışmada da benzer olarak CD133 protein ifadesinin kolorektal kanserli hastalarda, tümör dokusunda yaklaşık %55 komşu normal mukozada ise %25 oranında pozitif olduğunu bulmuşlardır(98)

CD133'ün gen düzeyinde ifadesini araştıran çalışmalar da mevcuttur. Ancak bu çalışmalar henüz CD133 gen ifade düzeylerinin kolorektal kanserli hastalarda klinik seyir hakkında bir belirteç olarak yol gösterici rolünü ortaya koyabilecek düzeyde kanıt sunamamaktadır. Lin ve arkadaşı kolorektal kanserli hastaların periferik kanlarındaki monoökleer hücrelerde yaptığı çalışmada, CD133 mRNA düzeyi RT-PCR ile araştırmış ve çalışmalarında artmış CD133 düzeyleri ile hastalık nüksü arasında bir ilişki göstermişlerdir (101). Erken evre (evre I-III) kolorektal kanserli hastalarda yaptıkları bir çalışmada Artells ve arkadaşları CD133 ifade artışı ile hastalık nüksü arasında bir paralellik bulmuşlardır (102). Toplam 64 hasta ile yapılan bu çalışmada CD133 ün diğer klinikopatolojik parametrelerden bağımsız olarak prognostik önemi olduğu gösterilmiştir. Yine Huh ve arkadaşlarının yaptıkları yeni bir çalışmada CD133 pozitifliğinin daha agresif tümör davranışını yansıttığı ve prognozla ters orantılı bir ilişki gösterdiği bulunmuştur (103).



Bizim çalışmamızda ise erken evredeki (evre I-III) toplam 78 hastanın ayrı olarak değerlendirdiğimizde CD133 ifade artışı ile hastalısız sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulamadık. Artells R ve arkadaşının çalışmasının aksine istatistiksel olarak anlamlı olmasa da CD133 ifade artışı ile hastalısız sağkalım arasında negatif bir ilişki söz konusuydu. CD133 pozitif olan erken evredeki bu hastalarımız detaylı incelendiğinde bunların radikal cerrahi operasyon geçirdikleri ve cerrahi sonrası nispeten daha etkili adjuvan kemoterapi (FOLFOX4 şeması) aldıkları görülmektedir. CD133 pozitif hasta sayısının azlığı ve karıştırıcı olarak değerlendirilebilecek cerrahi müdahale, adjuvan tedavi vb faktörlerin rolünü dışlamak zor olacağı için ve istatistiksel olarak da anlamlı olmaması nedeniyle bu bulgumuz konusunda kesin bir yorum yapılması uygun değildir.

Hasta sayısının azlığı, parafinize dokulardan total RNA eldesi kalitesinde yaşanan zorluklar çalışmamızın başlıca kısıtlılıklarını oluşturmaktadır. CD133 pozitiflik oranımızın düşük olması nedeniyle kanser kök hücresi marker pozitifliği olan ve olmayan hastaların klinikopatolojik olarak karşılaştırmaları da yeterli istatistiksel güce ulaşmamaktadır. Tez çalışmamızda elde edilen bulguların klinik önemi konusu değerlendirilirken bu durumların göz önünde bulundurulmasında yarar vardır. Bu çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular CD133'ün klinik açıdan literatürde belirtilenin aksine farklı bir boyutu da olabileceği olasılığını gündeme getirmesi açısından ilginçtir. Bu bulgularımızın teyid edilmesi için hasta sayısının artırılarak, ayrıca mümkün olabilir ise taze tümör dokuları ya da hastaların periferik kan hücrelerinden örnekler alınarak yapılacak çalışmalara gereksinim olduğunu düşünüyoruz.

## KAYNAKLAR

- 1 Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England journal of medicine*. 2000 Jul 13;**343**(2):78-85.
- 2 Olah E. Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination. *The Journal of The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2005;**16** (2).
- 3 Lauderdale TCRCof. Information About the Anatomy of the Colon. 2013 [cited; Available from: <http://www.crcftlauderdale.com/education/anatomy-of-the-colon.php>
- 4 Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? *Annals of surgical oncology*. 2008 Sep;**15**(9):2388-94.
- 5 Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2002 Oct 10;**101**(5):403-8.
- 6 Todaro M, Francipane MG, Medema JP, Stassi G. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology*. 2010 Jun;**138**(6):2151-62.
- 7 Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Jun;**105**(11):1493-9.
- 8 Potten CS, Kellett M, Roberts SA, Rew DA, Wilson GD. Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut*. 1992 Jan;**33**(1):71-8.
- 9 Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 1990 Dec;**110**(4):1001-20.
- 10 Cheng H, Bjerknes M, Amar J. Methods for the determination of epithelial cell kinetic parameters of human colonic epithelium isolated from surgical and biopsy specimens. *Gastroenterology*. 1984 Jan;**86**(1):78-85.
- 11 Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nature reviews Cancer*. 2008 Jun;**8**(6):415-24.
- 12 Willis ND, Przyborski SA, Hutchison CJ, Wilson RG. Colonic and colorectal cancer stem cells: progress in the search for putative biomarkers. *Journal of anatomy*. 2008 Jul;**213**(1):59-65.
- 13 Johns Hopkins Colon Cancer Center. Stem Cells & Colon Cancer. [cited; Available from: [http://www.hopkinscoloncancercenter.org/CMS/CMS\\_Page.aspx?CurrentUDV=59&CMS\\_Page\\_ID=2E075D97-85A2-4CBC-A417-8379D1586907](http://www.hopkinscoloncancercenter.org/CMS/CMS_Page.aspx?CurrentUDV=59&CMS_Page_ID=2E075D97-85A2-4CBC-A417-8379D1586907)
- 14 Morales CP, Souza RF, Spechler SJ. Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. *Lancet*. 2002 Nov 16;**360**(9345):1587-9.
- 15 Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Annals of surgery*. 2001 Mar;**233**(3):322-37.
- 16 Kelloff GJ, Schilsky RL, Alberts DS, et al. Colorectal adenomas: a prototype for the use of surrogate end points in the development of cancer prevention drugs. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004 Jun 1;**10**(11):3908-18.
- 17 Fearon ER. Genetic alterations underlying colorectal tumorigenesis. *Cancer surveys*. 1992;**12**:119-36.
- 18 Labianca R, Beretta GD, Kildani B, et al. Colon cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2010 May;**74**(2):106-33.
- 19 Levine JS, Ahnen DJ. Clinical practice. Adenomatous polyps of the colon. *The New England journal of medicine*. 2006 Dec 14;**355**(24):2551-7.

- 20 American Cancer Society. What are the key statistics about colorectal cancer? 2013 [cited; Available from: <http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-key-statistics>
- 21 Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Daire Başkanlığı. 2006-2008 Yılları Türkiye Kansere İncidansı. [cited; Available from: [www.kanser.gov.tr](http://www.kanser.gov.tr).
- 22 Edwards BK, Ward E, Kohler BA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*. 2010 Feb 1;**116**(3):544-73.
- 23 Lynch HT, Boland CR, Gong G, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *European journal of human genetics : EJHG*. 2006 Apr;**14**(4):390-402.
- 24 Lynch HT, Lynch JF, Attard TA. Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2009 Sep 1;**181**(5):273-80.
- 25 Kumar A, Fausto, Michell. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 8th ed; 2010. p. 817-25.
- 26 Hamilton SR BF, Boffetta P et al,. *Carcinoma of The Colon Rectum. WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. 4th ed; 2010. p. 132-73.
- 27 Amersi F, Agustin M, Ko CY. Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and health services. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2005 Aug;**18**(3):133-40.
- 28 Vargas AJ, Thompson PA. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. 2012 Oct;**27**(5):613-23.
- 29 Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2009 Nov;**22**(4):191-7.
- 30 Johnson CM, Wei C, Ensor JE, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer causes & control : CCC*. 2013 Jun;**24**(6):1207-22.
- 31 Stegeman I, de Wijkerslooth TR, Stoop EM, et al. Colorectal cancer risk factors in the detection of advanced adenoma and colorectal cancer. *Cancer epidemiology*. 2013 Jun;**37**(3):278-83.
- 32 Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews Cancer*. 2005 Apr;**5**(4):275-84.
- 33 Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annual review of medicine*. 2007;**58**:267-84.
- 34 Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2002:369-91.
- 35 Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2004 Jul;**51**(1):1-28.
- 36 BI108- Organ Replacement California Proposition 71. What are stem cells? [cited; Available from: [http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108\\_2005\\_Groups/07/background.htm](http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2005_Groups/07/background.htm)
- 37 Lin H, Schagat T. Neuroblasts: a model for the asymmetric division of stem cells. *Trends in genetics : TIG*. 1997 Jan;**13**(1):33-9.
- 38 Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, et al. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell*. 2009 Sep 18;**138**(6):1083-95.
- 39 Cohnheim J. Ueber Entzündung und Eiterung. *Path Anat Physiol Klin Med*. 1867;**40**:1-79.

- 40 Rudolf V. Editorial. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 1855;**3**:23.
- 41 Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994 Feb 17;**367**(6464):645-8.
- 42 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine.* 1997 Jul;**3**(7):730-7.
- 43 *Essential of Stem Cell Biology.* In: Robert Lanza JG, Brigid Hogan, Douglas Melton, Roger Pedersen, E. Donnall Thomas, James Thomson, Sir Ian Wilmut, editor. 2nd ed; 2009. p. 469-82.
- 44 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001 Nov 1;**414**(6859):105-11.
- 45 Anderson EC, Hessman C, Levin TG, Monroe MM, Wong MH. The Role of Colorectal Cancer Stem Cells in Metastatic Disease and Therapeutic Response. *Cancers.* 2011 Jan 1;**3**(1):319-39.
- 46 McDonald SA, Preston SL, Lovell MJ, Wright NA, Jankowski JA. Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology.* 2006 May;**3**(5):267-74.
- 47 Schatton T, Frank NY, Frank MH. Identification and targeting of cancer stem cells. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology.* 2009 Oct;**31**(10):1038-49.
- 48 Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005 Apr 14;**434**(7035):843-50.
- 49 Gudjonsson T, Magnusson MK. Stem cell biology and the cellular pathways of carcinogenesis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica.* 2005 Nov-Dec;**113**(11-12):922-9.
- 50 Baba S. Recent advances in molecular genetics of colorectal cancer. *World journal of surgery.* 1997 Sep;**21**(7):678-87.
- 51 Wong WM, Wright NA. Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. *Journal of clinical pathology.* 1999 May;**52**(5):321-33.
- 52 Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science.* 2007 Jul 20;**317**(5836):337.
- 53 Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews Cancer.* 2008 Oct;**8**(10):755-68.
- 54 O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007 Jan 4;**445**(7123):106-10.
- 55 Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007 Jan 4;**445**(7123):111-5.
- 56 Roy S, Majumdar AP. Signaling in colon cancer stem cells. *Journal of molecular signaling.* 2012;**7**(1):11.
- 57 Bozzone DM. *The Biology of Cancer. Cancer Genetics.* 1st ed: Chelsea House 2007. p. 16-54.
- 58 Brabletz S, Schmalhofer O, Brabletz T. Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *J Pathol.* 2009 Jan;**217**(2):307-17.
- 59 Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E, et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS biology.* 2009 Jun 2;**7**(6):e1000121.
- 60 Kolligs FT, Bommer G, Goke B. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion.* 2002;**66**(3):131-44.
- 61 Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science.* 1997 Mar 21;**275**(5307):1787-90.

- 62 Huelsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway. *Journal of cell science*. 2002 Nov 1;**115**(Pt 21):3977-8.
- 63 Dönmez HG DŞ, Beksaç MS,. WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolunun Sitoplazmik Biyomolekülleri. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2011;**25**(3):189-99.
- 64 Staal FJ, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nature reviews Immunology*. 2008 Aug;**8**(8):581-93.
- 65 Sugimura R, Li L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2010 Dec;**90**(4):243-56.
- 66 Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, Clevers H. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology*. 2005 Aug;**129**(2):626-38.
- 67 van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 2002 Oct 18;**111**(2):241-50.
- 68 Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*. 1991 Aug 9;**253**(5020):661-5.
- 69 Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Human molecular genetics*. 1992 Jul;**1**(4):229-33.
- 70 Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 2000 Oct 13;**103**(2):295-309.
- 71 Kerrigan D. CLIC4 Moves Into Nucleus to Stabilize Anti-Growth Signal. 2009 [cited; Available from: <http://home.ccr.cancer.gov/inthejournals/yuspa.asp>
- 72 Hoosein NM, McKnight MK, Levine AE, et al. Differential sensitivity of subclasses of human colon carcinoma cell lines to the growth inhibitory effects of transforming growth factor-beta 1. *Experimental cell research*. 1989 Apr;**181**(2):442-53.
- 73 Ilyas M, Efstathiou JA, Straub J, Kim HC, Bodmer WF. Transforming growth factor beta stimulation of colorectal cancer cell lines: type II receptor bypass and changes in adhesion molecule expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Mar 16;**96**(6):3087-91.
- 74 Xu Y, Pasche B. TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Human molecular genetics*. 2007 Apr 15;**16 Spec No 1**:R14-20.
- 75 Miele L, Osborne B. Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *Journal of cellular physiology*. 1999 Dec;**181**(3):393-409.
- 76 Wang Z, Ahmad A, Li Y, Azmi AS, Miele L, Sarkar FH. Targeting notch to eradicate pancreatic cancer stem cells for cancer therapy. *Anticancer research*. 2011 Apr;**31**(4):1105-13.
- 77 Katoh M, Katoh M. Notch signaling in gastrointestinal tract (review). *International journal of oncology*. 2007 Jan;**30**(1):247-51.
- 78 Sikandar SS, Pate KT, Anderson S, et al. NOTCH signaling is required for formation and self-renewal of tumor-initiating cells and for repression of secretory cell differentiation in colon cancer. *Cancer research*. 2010 Feb 15;**70**(4):1469-78.
- 79 Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes & development*. 2008 Sep 15;**22**(18):2454-72.
- 80 Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nature reviews Cancer*. 2003 Dec;**3**(12):903-11.
- 81 Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, et al. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer research*. 2007 Mar 1;**67**(5):2187-96.

- 82 Varnat F, Duquet A, Malerba M, et al. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO molecular medicine*. 2009 Sep;**1**(6-7):338-51.
- 83 Sanders MA, Majumdar AP. Colon cancer stem cells: implications in carcinogenesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2011;**16**:1651-62.
- 84 Ieta K, Tanaka F, Haraguchi N, et al. Biological and genetic characteristics of tumor-initiating cells in colon cancer. *Annals of surgical oncology*. 2008 Feb;**15**(2):638-48.
- 85 Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000 Feb 1;**95**(3):952-8.
- 86 Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997 Dec 15;**90**(12):5002-12.
- 87 Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Dec 19;**97**(26):14720-5.
- 88 Corbeil D, Roper K, Hellwig A, et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Feb 25;**275**(8):5512-20.
- 89 Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *Journal of cell science*. 2004 Jul 15;**117**(Pt 16):3539-45.
- 90 Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, et al. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Jul;**114**(2):182-95.
- 91 Zhong X, Li Y, Peng F, et al. Identification of tumorigenic retinal stem-like cells in human solid retinoblastomas. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007 Nov 15;**121**(10):2125-31.
- 92 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004 Nov 18;**432**(7015):396-401.
- 93 Ferrandina G, Bonanno G, Pierelli L, et al. Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2008 May-Jun;**18**(3):506-14.
- 94 Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006 Dec 29;**351**(4):820-4.
- 95 Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, et al. Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells. *Cancer research*. 2006 Feb 1;**66**(3):1491-9.
- 96 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001 May 1;**29**(9):e45.
- 97 Gaiser T, Camps J, Meinhardt S, et al. Genome and transcriptome profiles of CD133-positive colorectal cancer cells. *The American journal of pathology*. 2011 Apr;**178**(4):1478-88.
- 98 Xi HQ, Zhao P. Clinicopathological significance and prognostic value of EphA3 and CD133 expression in colorectal carcinoma. *Journal of clinical pathology*. 2011 Jun;**64**(6):498-503.
- 99 Chen S, Song X, Chen Z, et al. CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2013;**8**(2):e56380.

- 100 Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2008 Oct 21;**99**(8):1285-9.
- 101 Lin EH, Hassan M, Li Y, et al. Elevated circulating endothelial progenitor marker CD133 messenger RNA levels predict colon cancer recurrence. *Cancer*. 2007 Aug 1;**110**(3):534-42.
- 102 Artells R, Moreno I, Diaz T, et al. Tumour CD133 mRNA expression and clinical outcome in surgically resected colorectal cancer patients. *European journal of cancer*. 2010 Feb;**46**(3):642-9.
- 103 Huh JW, Park YS, Lee JH, Kim HR, Shin MG, Kim YJ. CD133 mRNA expression and microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Journal of surgical oncology*. 2010 Dec 1;**102**(7):765-70.

## EKLER

### EK1: Çalışılan tüm örneklerin saflık ve miktar tayini analizi sonuçları

Örnek Adı	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> oranı	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> oranı	A <sub>260</sub> oranı	2.izolasyon A <sub>260</sub> oranı
Örnek 1	1,9		292,06 ng/ul	
Örnek 2	1,9	1,8 (2.izo.)	49,1 ng/ul	
Örnek 3	1,2		184,49 ng/ul	
Örnek 4	1,7		97,69 ng/ul	
Örnek 5	1,3 1,5 (2.izo.)	0,3 (2.izo.)	13,02 ng/ul	21,1 ng/ul
Örnek 6	1,7		75,12 ng/ul	
Örnek 7	1,7		225,73 ng/ul	
Örnek 8	1,1		354,43 ng/ul	
Örnek 9	1		96,87 ng/ul	
Örnek 10	1,7	1,2 (2.izo.)	79,8 ng/ul	
Örnek 11	1,8		279,2 ng/ul	
Örnek 12	1,8	0,9 (2.izo.)	100,2 ng/ul	
Örnek 13	1,8		80,11 ng/ul	
Örnek 14	1,6		65,45 ng/ul	
Örnek 15	1,7		134,13 ng/ul	
Örnek 16	1,7		100,18 ng/ul	
Örnek 17	1,8		689,6 ng/ul	
Örnek 18	1,8		698,8 ng/ul	
Örnek 19	1,3 1,5 (2.izo.)	1 (2.izo.)	28,4 ng/ul	27,4 ng/ul
Örnek 20	1,7		261,7 ng/ul	
Örnek 21	1,7		159,1 ng/ul	
Örnek 22	1,7		117,79 ng/ul	
Örnek 23	1,7		336,49 ng/ul	
Örnek 24	1,9		262,0 ng/ul	
Örnek 25	1,8		168,18 ng/ul	
Örnek 26	1,7		133,89 ng/ul	
Örnek 27	1,7	1,2 (2.izo.)	55,6 ng/ul	
Örnek 28	1,8		56,2 ng/ul	
Örnek 29	1,6		221,89 ng/ul	
Örnek 30	1,6		107,7 ng/ul	
Örnek 31	1,7		270, 11 ng/ul	
Örnek 32	1,9		112,84 ng/ul	
Örnek 33	1,8		480, 9 ng/ul	
Örnek 34	1,8		178,6 ng/ul	
Örnek 35	1,4		141,67 ng/ul	
Örnek 36	1,6		103,4 ng/ul	

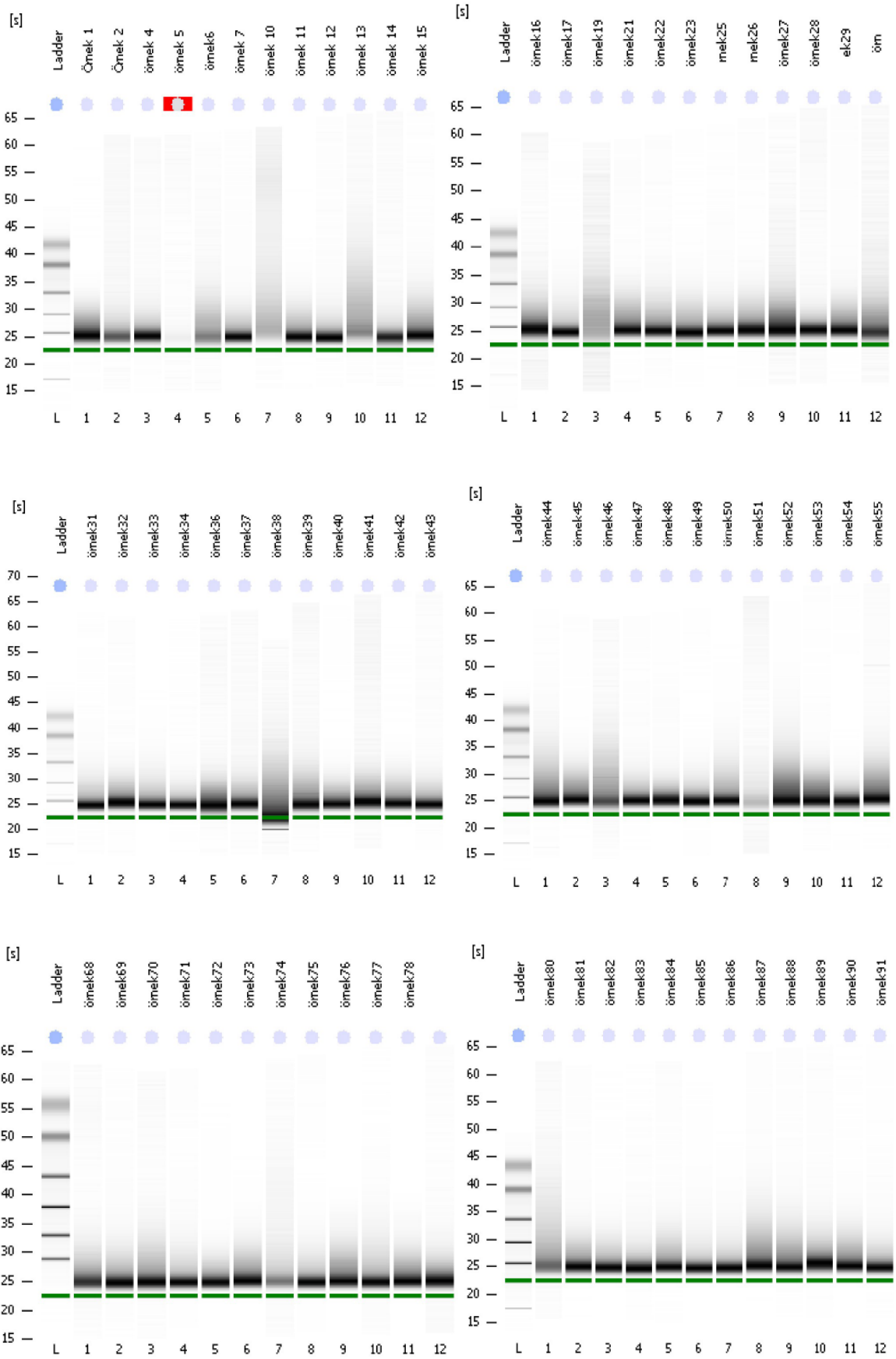


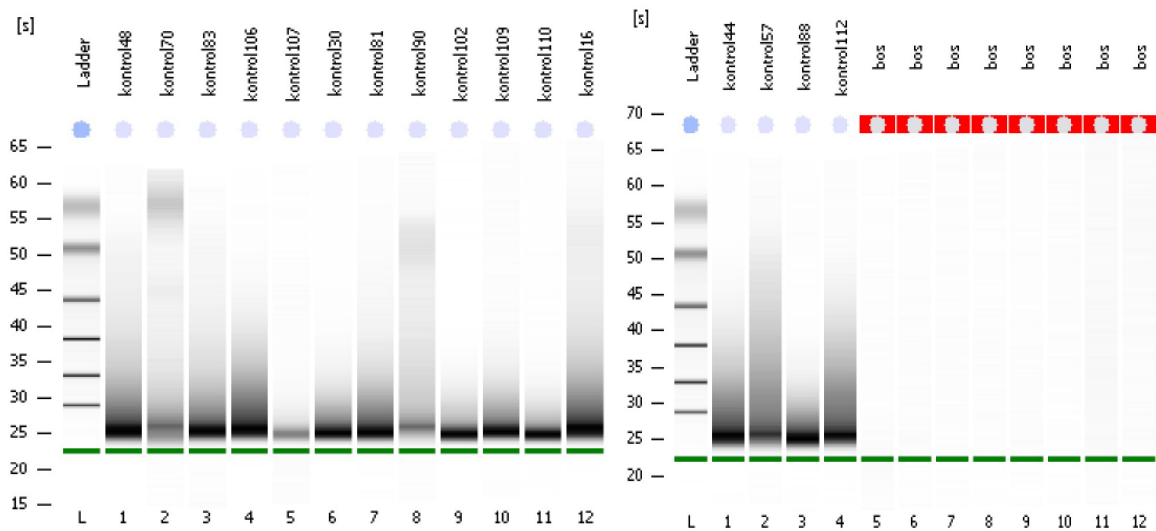
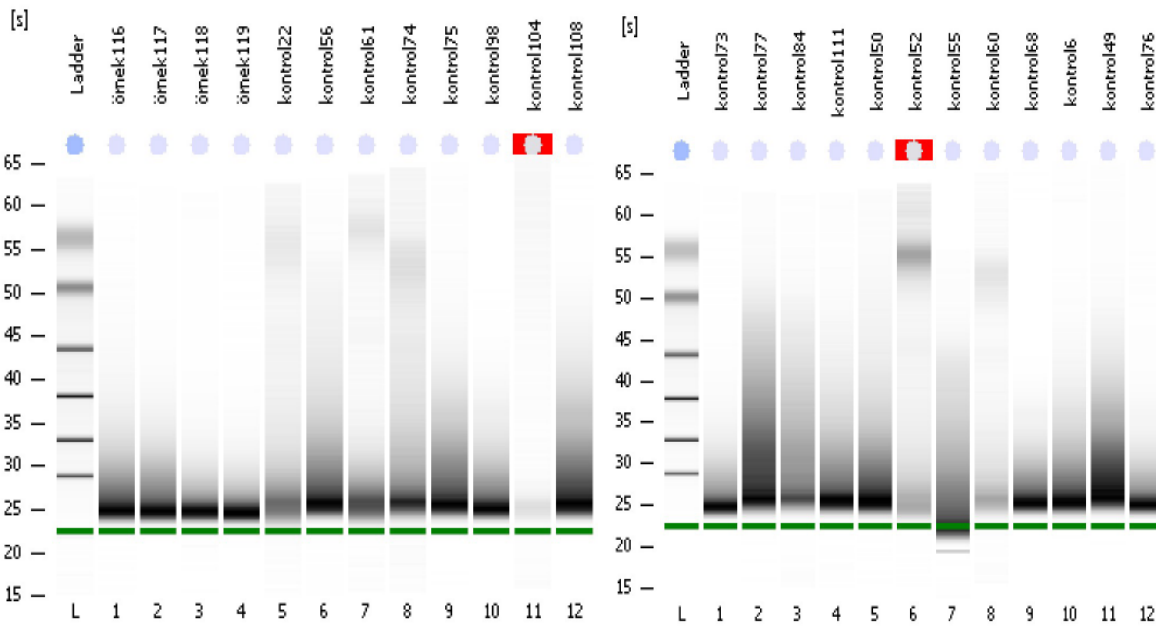
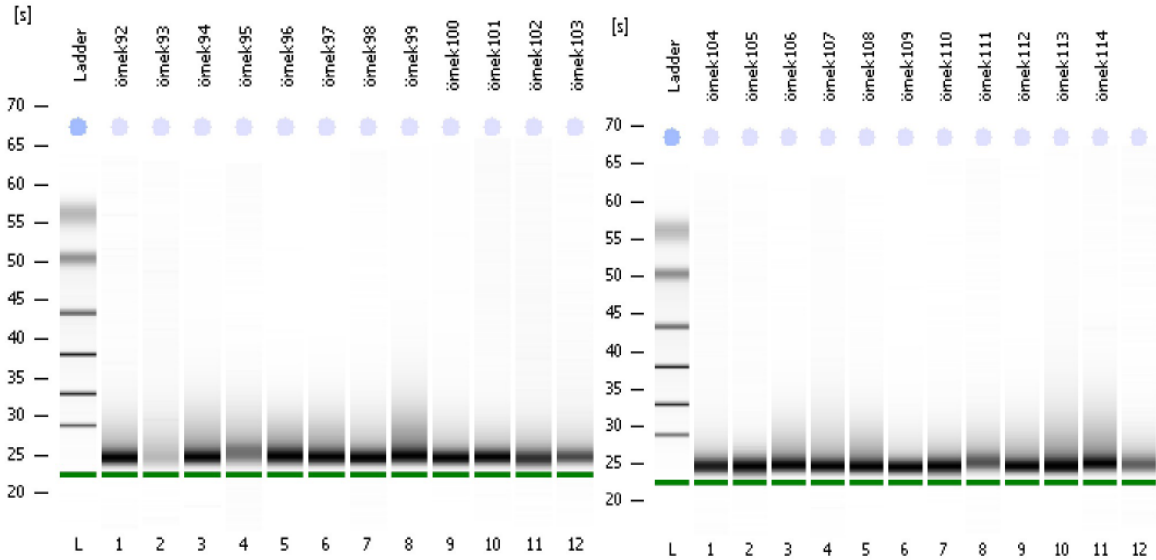
Örnek 37	1,6			115,7 ng/ul		
Örnek 38	1,7			103,3 ng/ul		
Örnek 39	1,7			131,9 ng/ul		
Örnek 40	1,8			288,0 ng/ul		
Örnek 41	1,1			319,7 ng/ul		
Örnek 42	1,5			369,6 ng/ul		
Örnek 43	1,7			106,5 ng/ul		
Örnek 44	1,8		1,8	309,7 ng/ul		
Örnek 45	1,9		1,7	153,6 ng/ul		
Örnek 46	1,7		0,8	73,0 ng/ul		
Örnek 47	1,9		1,8	139,1 ng/ul		
Örnek 48	1,9		1,4	284,7 ng/ul		
Örnek 49	1,9		1,4	289,0 ng/ul		
Örnek 50	1,8		1,8	407,0 ng/ul		
Örnek 51	1,7	1,8 (2.izo.)	0,9	1,1(2.izo.)	24,0 ng/ul	26,4 ng/ul
Örnek 52	1,7		1,8	444,5 ng/ul		
Örnek 53	1,9		1,9	141,4 ng/ul		
Örnek 54	1,9		2	154,0 ng/ul		
Örnek 55	2		1,7	98,7 ng/ul		
Örnek 56	1,6		1,3	59,5 ng/ul		
Örnek 57	1,9		1,3	76,2 ng/ul		
Örnek 58	1,9		2	94,2 ng/ul		
Örnek 59	1,8		1,6	351,1 ng/ul		
Örnek 60	1,8		1,5	58,6 ng/ul		
Örnek 61	1,7		1,8	70,7 ng/ul		
Örnek 62	1,9		1,5	50,4 ng/ul		
Örnek 63	1,9		1,9	217,6 ng/ul		
Örnek 64	1,8		2	233,9 ng/ul		
Örnek 65	2		1,6	87,0 ng/ul		
Örnek 66	1,8		1,9	222 ng/ul		
Örnek 67	1,9	1,8 (2.izo.)	2,0	1,3(2.izo.)	38,2 ng/ul	30,2 ng/ul
Örnek 68	1,9	1,9 (2.izo.)	1,5	1,3(2.izo.)	45,9 ng/ul	59,6 ng/ul
Örnek 69	1,9		1,7	147,8 ng/ul		
Örnek 70	1,7		1	75,4 ng/ul		
Örnek 71	1,9		1,8	98,5 ng/ul		
Örnek 72	1,9		1,8	354,6 ng/ul		
Örnek 73	1,9		1,8	313,9 ng/ul		
Örnek 74	1,8	1,9 (2.izo.)	1,9	1,2(2.izo.)	27,2 ng/ul	35,2 ng/ul
Örnek 75	1,9		1,7	102,7 ng/ul		
Örnek 76	2		2	877,5 ng/ul		
Örnek 77	1,8		1,7	103,6 ng/ul,		
Örnek 78	2		2	822,5 ng/ul		
Örnek 79	1,8		1,5	101,9 ng/ul		
Örnek 80	1,9		1,4	64,0 ng/ul		
Örnek 81	1,9		2	139,3 ng/ul		

Örnek 82	1,9	1,9	317,9 ng/ul			
Örnek 83	1,9	1,2	135,4 ng/ul			
Örnek 84	1,9	1,7	277,7 ng/ul			
Örnek 85	1,8	1,8	245,5 ng/ul			
Örnek 86	1,8	1,8	460,0 ng/ul			
Örnek 87	1,9	1,5	247,3 ng/ul			
Örnek 88	1,8	1,4	146,2 ng/ul			
Örnek 89	1,8	1,5	112,3 ng/ul			
Örnek 90	1,9	1,6	248,3 ng/ul			
Örnek 91	1,9	1,6	158,6 ng/ul			
Örnek 92	1,9	2,2	117,2 ng/ul			
Örnek 93	1,6	1,6 (2.izo.)	0,6	1,0(2.izo.)	40,7 ng/ul	8,8 ng/ul
Örnek 94	1,9	1,7	220,9 ng/ul			
Örnek 95	1,8	2,2	53,4 ng/ul			
Örnek 96	1,9	2	584,3 ng/ul			
Örnek 97	1,9	1,8	582,0 ng/ul			
Örnek 98	1,8	1,4	145,4 ng/ul			
Örnek 99	1,8	1,7	319,3 ng/ul			
Örnek 100	1,8	1,5	188,7 ng/ul			
Örnek 101	1,9	1,6	92,5 ng/ul			
Örnek 102	1,9	1,7	57,6 ng/ul			
Örnek 103	1,9	1,5	49,1 ng/ul			
Örnek 104	1,9	1,3	110,8 ng/ul			
Örnek 105	1,9	2,1	83,9 ng/ul			
Örnek 106	1,9	1,8	312,3 ng/ul			
Örnek 107	1,8	1,6	122,9 ng/ul			
Örnek 108	1,9	2,1	199,6 ng/ul			
Örnek 109	1,9	2	425,3 ng/ul			
Örnek 110	1,9	2,3	139,7 ng/ul			
Örnek 111	1,7	1,8	54,4 ng/ul			
Örnek 112	1,8	1,9	299,0 ng/ul			
Örnek 113	1,8	1,5	334,9 ng/ul			
Örnek 114	1,7	1,4	116,2 ng/ul			
Örnek 115	2	3,2	48,2 ng/ul			
Örnek 116	1,9	1,9	188,4 ng/ul			
Örnek 117	1,8	1,9	439,2 ng/ul			
Örnek 118	1,8	1,6	234,1 ng/ul			
Örnek 119	1,9	1,9	275,5 ng/ul			
<b>KONTROL ÖRNEKLERİNİN ÖLÇÜM SONUÇLARI</b>						
K22	1,8	1,9	54,8 ng/ul			
K56	2	2	168,3 ng/ul			
K61	1,7	1,6	51,8 ng/ul			
K74	2	2	67,9 ng/ul			
K75	2	2,1	207,0 ng/ul			
K98	1,9	1,9	316,4 ng/ul			

K104	1,6	1,6(2.izo.)	0,8	0,7(2.izo.)	20,8 ng/ul	12,3 ng/ul
K108		2		2	639,5 ng/ul	
K73		1,9		1,7	333,8 ng/ul	
K77		2		2	309,4 ng/ul	
K84		2		2,1	150,8 ng/ul	
K111		2		1,9	135,8 ng/ul	
K50		2		1,9	231,3 ng/ul	
K52		1,8		1,9	76,4 ng/ul	
K55		1,9		1,9	353,5 ng/ul	
K60		2		2	60,5 ng/ul	
K68		2		1,9	299,7 ng/ul	
K112		2		2,1	163,9 ng/ul	
K49		2		2	193,4 ng/ul	
K76		2		2	242,8 ng/ul	
K6		2		2	255,8 ng/ul	
K48		2		2	255,1 ng/ul	
K70		1,9		1,5	84,8 ng/ul	
K83		2		2,1	138,1 ng/ul	
K106		2		2	306,3 ng/ul	
K107	1,8	1,9 (2.izo.)	1,6	1,5(2.izo.)	22,6 ng/ul	9,5 ng/ul
K30		2		2	230,9 ng/ul	
K81		2		2	123,7 ng/ul	
K90		2		2	60,0 ng/ul	
K102		2		1,8	250,2 ng/ul	
K109		2		2	76,5 ng/ul	
K110		2		1,8	99,5 ng/ul	
K16		1,9		1,8	271,0 ng/ul	
K44		2		2	279,0 ng/ul	
K57		2		1,8	137,4 ng/ul	
K88		2		2	134,7 ng/ul	

## EK2: AGILENT RNA 6000 Nano Assay Analizi Sonuçları





**EK3: Etik Kurul Kararı****GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİSYONU  
DEĞERLENDİRME FORMU**

DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/Ankara
TELEFON	0312 310 30 10/227
FAKS	0312 310 63 70
E-POSTA	etik@medicene.ankara.edu.tr

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kolon kanserinde Vit D reseptör ekspresyonu ve Vit D reseptör ekspresyonunun kolon kanseri prognozu ve evresi üzerine olan etkisi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU				
	EUDRACT NUMARASI				
	SORUMLU ARAŞTIRMACI İYANVADUSOYADI	Doç.Dr.Murat Tönelner			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Gastroenteroloji			
	KOORDİNATÖRÜN İYANVADUSOYADI				
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ				
	BAŞVULAN DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu			
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ				
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input checked="" type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TORU	FAZ 1 <input type="checkbox"/>	FAZ 2 <input type="checkbox"/>	FAZ 3 <input type="checkbox"/>	FAZ 4 <input type="checkbox"/>
	BEBY <input type="checkbox"/>	DİĞER <input type="checkbox"/>	Diğer ile belirtiniz:		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	İLAC DİŞİ ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/>	İLAÇ DİŞİ ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/>	İLAÇ DİŞİ ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/>	İLAÇ DİŞİ ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/>	
	TEK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Version Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	14.12.2009	1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>
	HASTA KART/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>
	İLAN	<input type="checkbox"/>
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>
	DİĞER	<input type="checkbox"/>

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:10-157	Tarih: 03 Mayıs 2010
	Doç.Dr.Murat Törtüner'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler; araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ve Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	
<b>DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ</b>		
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu ve SOP	
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BAŞKAN YEKİLİ UNVANI/ADISOYADI: Prof.Dr.Bülent GÜMÜŞEL		
<b>DEĞERLENDİRME KOMİSYONU ÜYELERİ</b>		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Kablen **		İmza
Prof.Dr.Mehmet Mellî	Tıbbi Farmakoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>M. Mellî</i>
Prof.Dr.Ahmet Demirkazık	Tıbbi Onkoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Ahmet Demirkazık</i>
Prof.Dr.Ajan Tökün	Tıbbi Genetik	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Ajan Tökün</i>
Prof.Dr.Nuhan Puralı	Biyofizik	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<i>Nuhan Puralı</i>
Prof.Dr.H.Serdar Öztürk	Tıbbi Biyokimya	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>H.Serdar Öztürk</i>
Prof.Dr.Bülent Gümüşel	Eczacı- Öğr.Üyesi	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Bülent Gümüşel</i>
Prof.Dr.H.Serap Sivri	Çocuk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>H.Serap Sivri</i>
Doç.Dr.Banu Çakar	Halk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Banu Çakar</i>
Doç.Dr.Muhammed Özen	Avukat- Öğr.Üyesi	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Muhammed Özen</i>
Öğr.Gör.Dr.Volkan Kavas	Deontoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Volkan Kavas</i>
Gölsüm Aslan	Sağlık Mes. Dışı- Emekli	-----	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Gölsüm Aslan</i>

- \* :Araştırma ile İlişki  
\*\* :Toplantıda Bulunma

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sıdıka ÖZTOP

Doğum Yeri : İstanbul

Doğum Tarihi : 15.06.1987

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Şanlıurfa Anadolu Lisesi (2001-2005)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2006-2011)