

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLOREKTAL KANSERLİ BİREYLERDE GLUTATYON
PEROKSİDAZ ENZİM POLİMORFİZMİ VE SELENYUM
DURUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nurdan Ezgi ÇELİK

**Danışman
Jüri Üyesi
Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Bayram KIRAN
Doç. Dr. Aytaç GÜDER
Dr. Öğr. Üyesi Dilşad ÖZERKAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

KASTAMONU –2019

TEZ ONAYI

Nurdan Ezgi ÇELİK tarafından hazırlanan " **Kolorektal Kanserli Bireylerde Glutasyon Peroksidaz Enzim Polimorfizmi Ve Selenyum Durumunun Değerlendirilmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Prof. Dr. Bayram KIRAN Kastamonu Üniversitesi
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Aytaç GÜDER Giresun Üniversitesi
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Dilşad ÖZERKAN Kastamonu Üniversitesi

22/05/2019

Enstitü Müdürü	Prof.Dr. Hasbi YAPRAK
----------------	-----------------------	-------

TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

Nurdan Ezgi ÇELİK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOLOREKTAL KANSERLİ BİREYLERDE GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİM POLİMORFİZMİ VE SELENYUM DURUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nurdan Ezgi ÇELİK
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Bayram KIRAN

Kanser insidansı açısından, kolorektal kanser kadın ve erkekler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Araştırmalar, hücrelerin habis dönüşümünün indüklenmesinden sorumlu faktörlerden birinin reaktif oksijen türleri (ROS) olduğunu göstermektedir. ROS üretimi ve antioksidan sistem performansı arasındaki dengesizlik oksidatif strese neden olmaktadır. Normal hücreler, bu hasarlardan korunmak için savunma mekanizması geliştirmişlerdir ve reaktif maddeleri detoksifiye eden antioksidan sistemler tarafından korunurlar.

GPx' in temel rolü, hidroperoksit seviyelerini düzenlemek ve ROS aracılı DNA hasarı ile kanser başlangıcının önlenmesidir. Selenyumun hayvan modellerinde kanser insidansını azalttığını ve yeni veriler de insanlarda da koruyucu olabileceğini göstermektedir. Se, selenoproteinler aracılığıyla biyolojik rollerini kullandığı için, selenoprotein genlerindeki genetik varyasyonlar CRC'ye duyarlılığı etkileyebilir. Çalışmada GPx enzim polimorfizmi, selenyum düzeyi ve kolorektal kanser gelişim riski değerlendirildi. 90 kolon kanserli hasta ve 99 kontrol üzerinde çalışılmıştır.

Kolon kanserli hastaların serum selenyum düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark ileri düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$). Bireylerin taşıdıkları genotipler ile selenyum serum düzeyleri değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. GPX gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve kolon kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlık saptanmıştır ($p < 0,001$).

Anahtar Kelimeler: GPX , kolon kanseri, polimorfizm, antioksidan, reaktif oksijen türleri

2019, 61 sayfa
Bilim Kodu : 923

ABSTRACT

MSc Thesis

GLUTATHIONE PEROXIDASE ENZYME POLYMORPHISM IN COLORECTAL CANCER AND ASSESSMENT OF SELENIUM STATUS

Nurdan Ezgi ÇELİK
Kastamonu University
Institute of Science and Technology
Department of Genetics and Bioengineering

Supervisor : Prof. Dr. Bayram KIRAN

Interms of cancer incidence, colorectal cancer ranks second among men and women. Research has shown that one of the factors responsible for the induction of malignant transformation of cells is reactive oxygen species (ROS). The imbalance between ROS production and antioxidant system performance causes oxidative stress. All normal cell shave developed a defense mechanism to protect against these damages and are protected by antioxidant systems which detoxify the reactive substances.

The main role of GPx is to regulate hydroperoxide levels and to prevent the onset of cancer by ROS-mediated DNA damage. Selenium shows that it reduces the incidence of cancer in animal models and that new data may also be protective in humans. Since Se uses biological roles through selenoproteins, genetic variations in selenoprotein genes can affect susceptibility to CRC.

In the study, the risk of developing GPx enzyme polymorphism, selenium level and colorectal cancer was evaluated. 90 colon cancer patients and 99 controls.

When serum selenium levels of colon cancer patients were compared with the control group, the difference was found to be statistically significant ($p = 0.001$). No statistically significant difference was found when selenium serum levels were assessed by genotypes of individuals. When GPX gene polymorphism results were evaluated, genotype distribution was statistically significant between control group and colon cancer patients ($p < 0.001$).

Key Words : GPX, colorectal cancer, polymorphism, reactive oxygen species, antioxidant

2019, 61 pages
Science Code: 923

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenerek, desteğini, bilgisini ve anlayışını benden esirgemeyen Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Prof. Dr. Bayram KIRAN'a,

Tez çalışmam süresince bana yol gösteren, bilgisi ve laboratuvar imkanlarıyla her zaman destek olan İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan YAYLIM'a,

Tez çalışma sürecimde deneyimleriyle, ayırdıkları zaman ve emekleri için Arş. Gör. Mehmet Tolgahan HAKAN, sabır ve özgüvenle laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan Dilara SÖNMEZ'e , Şeyda ERCAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca laboratuvar imkanı sunan Moleküler Tıp Anabilim Dalı'na, çalışmaya katılmayı kabul eden kanser hastalarına teşekkür ederim.

Son olarak tüm bu süreçte yanımda olup destek ve sevgilerini hissettirdikleri ve eksik etmedikleri için kıymetli aileme çok teşekkür ederim.

Nurdan Ezgi ÇELİK
Kastamonu, Mayıs, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ ONAYI.....	ii
TAAHHÜTNAME.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kolon Kanseri	4
2.1.1. Epidemiyoloji.....	4
2.1.2. Etiyoloji	6
2.2. Oksidatif Stress Ve Kanser	8
2.2.1. Serbest Radikaller.....	9
2.2.1.1. <i>Reaktif Oksijen Türleri</i>	10
2.3. Antioksidan Savunma Sistemi.....	14
2.3.1. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	16
2.3.1.1. <i>Selenyum</i>	16
2.3.1.1.1. <i>Selenyum Alımı Ve Kanser</i>	17
2.3.2. Enzimatik Antioksidanlar.....	18
2.3.2.1. <i>Glutasyon Peroksidaz</i>	19
2.3.2.1.1. <i>Glutasyon Bağımlı GPX' in Enzimatik Mekanizması</i>	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Gereç	23
3.1.1. Seçilen Örneklerin Tanımı	23
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	23
3.1.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.1.4. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	24
3.1.4.1. <i>Eritrosit Parçalama Tamponu (LysisBuffer)</i>	24
3.1.4.2. <i>0.5 M Disodyumetilendiaminteraasetat (EDTA) (pH8.0)</i>	25
3.1.4.3. <i>4 M Sodyum Klorür (NaCl)</i>	25
3.1.4.4. <i>Lökositleri Parçalama Tamponu (WBL)</i>	25
3.1.4.5. <i>1 M Tris Tamponu</i>	25
3.1.4.6. <i>9.5 M Amonyum Asetat</i>	25
3.1.4.7. <i>Proteinaz K (20 mg/ml)</i>	25
3.1.4.8. <i>%10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)</i>	26

3.1.5. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.....	26
3.1.5.1. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X).....	26
3.1.5.2. Etidyum Bromür (10 mg/ml).....	26
3.1.5.3. 5X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE).....	26
3.2. Çalışmamızda Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri.....	26
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu.....	27
3.2.2. DNA Konsantrasyonu (OD260 X 50µg/ml) Ve Saflığının Ölçülmesi...27	
3.2.3. GPX Gen Polimorfizmlerinin PCR-RFLP Yöntemi İle Saptanması....	28
3.3. PCR’da Kullanılan Kimyasal Maddeler Ve PCR’nin Hazırlanışı.....	28
3.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi İle Kontrolü.....	30
3.4.1. %2’lik Agaroz Jel Hazırlanması.....	30
3.4.2. PCR Ürünlerinin Jele Yüklmesi ve Kontrolü.....	30
3.5. GPX geni PCR Ürününde Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Yönteminin Uygulanması.....	30
3.5.1. Enzim Kesim Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi İle Kontrolü.....	31
3.5.2. ApaI Enzim Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	31
3.6. Selenyum Ölçümünde Kullanılan Yöntem.....	32
3.6.1. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemi.....	33
3.6.1.1. Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi Yöntemi.....	33
4. BULGULAR	35
4.1. GPX1 - 198 C/T Polimorfizmi PCR Ürünlerine Ait Bulgular.....	35
4.2. RFLP Yöntemi ApaI Enzim Kesimi ile GPX1 Kesim Bantlarına Ait Bulgular.....	35
4.3. İstatistiksel Analiz Sonrasında Elde Edilen Bulgular.....	36
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ	47
KAYNAKLAR	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. ROS'un DNA Üzerindeki Etkileri	10
Şekil 2.2. İnflamasyon ve Oksidatif Reaksiyonlar	12
Şekil 2.3. Pro-oksidanlar ve Anti-oksidanlar Arasındaki Dengenin Modeli	15
Şekil 2.4. Reaktif Oksijen Türünün Çeşitli Aktivatörlerinin ve İnhibitörlerinin Şematik Gösterimi	15
Şekil 2.5. GPx Katalizinin Modeli	22
Şekil 3.1. ApaI Restriksiyon Enzimine Ait Kesim Tanıma Bölgesi	30
Şekil 4.1. RFLP Sonrası GPX-1 Genine Ait DNA Parçalarının Agaroz Jeldeki Görüntü Şeması	35
Şekil 4.2. ApaI Enzim Kesimi Sonucunda Ürünlerin %3'lük Agaroz Jeldeki Görüntüsü	35

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. PCR Karışımının Hazırlanması.....	29
Tablo 3.2. GPX geni PCR Çoğalma Koşulları.....	29
Tablo 3.3. ApaI Enzimi Kesim Protokolü.....	31
Tablo 3.4. GPx genine ait DNA parçalarının Kesim Bantlarına Ait Genotipleri.	32
Tablo 4.1. Kontrol ve Kolorektal Kanserli Hastaların Özellikleri	37
Tablo 4.2. CRC Hastalarında (n = 90) ve Kontrollerde (n = 99) GPX Polimorfizminin Genotip ve Allel Sıklıkları	38
Tablo 4.3. GPX Genotiplerinin Dağılımı, Klinikopatolojik Parametrelerin Karşılaştırılması.....	39
Tablo 4.4. Selenyum Seviyeleri, Klinikopatolojik Parametrelerin Karşılaştırılması.....	40

GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa
Grafik 2.1. Türkiye’ de Ölüm Nedenleri.....	5
Grafik 2.2. Türkiye’de En Sık Görülen İlk 10 Kanser.....	5



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAS	Atomik Absorbsiyon Spektrometrisi
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
CRC	Kolorektal Kanser
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamine Tetra Asetat
FAP	Adenomatöz Polipozis
GFAAS	Grafit Fırınlı AAS
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon Di Sülfid
HCl	Hidroklorik Asit
HGAAS	Hidrür Oluşumlu AAS
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HNPCC	Kalıtısal Nonpolifozis Kolorektal Kanser
HNO ₃	Nitrik Asit
HOCl	Hipokloröz Asit
HOX-1	Heme Oksijenaz
IBD	İnflamatuar Bağırsak Hastalığı
KHCO ₃	Potasyum Bi Karbonat
LOO.	Lipit peroksil
LOOH	Lipit Peroksit
LOH	Heterozigotluk Kaybı
mtH ₂ O ₂	Mitokondriyal H ₂ O ₂
NaBH ₄	Sodyum Bor Hidrür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaCl	Sodyum Klorür
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NFkB	Nükleer Faktör Kappa B
NF-Yb	Nükleer Transkripsiyon Faktörü Y
NH ₄ Cl	Amonyum Klorür
NLR	Nod Benzeri Reseptörler
NO	Nitrik oksit
NO ₂	Nitrojen Dioksit
N ₂ O ₃	Dinitrojenioksit
NOX	Oksidaz
NRF2	Nükleer Faktör Eritroid 2 İlişkili Faktör 2
O ₂ .-	Süperoksit
OH.	Hidroksil
O ₃	Ozon
¹ O ₂	Tekli Oksijen
ONOO	Peroksinitrit
· O ₂ -	Süperoksit Anyonu
·OH	Hidroksi Radikalleri

OD	Optik Dansite
Ppm	Milyonda Bir
Ppb	Milyarda Bir
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Kısıtlama Parçası Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
ROO.	Peroksil
RO.	Alkoksil
SBP1	Selenyum Bağlayıcı Protein
Se	Selenyum
Sec	SelenosisteinAmino Asidi
SePP	Selenoprotein P
Sep15	15 kD a Selenoprotein
SelS	Selenoprotein S
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SOD	Süperoksit Dismutaz
STAT	Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon Aktivatörü
TAC	Toplam Antioksidan Kapasitesi
TAM	Tümörle İlişkili Makrofajlar
TAN	Tümörle İlişkili Nötrofiller
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
Th	T yardımcı hücre
TLR	Toll Benzeri Reseptörler
TOC	Toplam Organik Karbon
TRxR	Tioredoksin Redüktaz
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
TXN	Tiyoredoksin
TXNRD2	Tioredoksin Redüktaz 2
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WBL	Lökositleri Parçalama Tamponu

1. GİRİŞ

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) Mayıs 2016 verilerine göre; Türkiye'de her 5 ölümden 1'inin nedeni, kanser ve kanserli vaka sayısı yıllar içinde artış göstermiş (Türkiye İstatistik Kurumu,. 2016). Amerikan Kanser Derneği'nin 2015'te yayınladığı "Kanser Atlası"na göre,Türkiye'de kanser, her yıl ortaya çıkan 148 bin civarındaki yeni vaka ve 91 bin 800 kansere bağlı ölüm düşünüldüğünde, önemli bir halk sağlığı sorunu (Jemal vd., 2014). Bu nedenle kanserogenez süreci ve tedavisi bugünkü araştırmacılar tarafından en çok araştırılan konular arasındadır. Kanserinin ortaya çıkma nedenleri ve tedavisi üzerine yapılan çalışmalar ise her geçen gün artmakta, daha etkili ve en az yan etkiye sahip tedavi süreci arayışları sürmektedir.

Ülkemiz için önemli sağlık problemlerinin başında gelen kolorektal kanserin aydınlatılmasının önemi açıktır.

Vücutta en çok görülen serbest radikal, oksijenden oluşan ve genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan radikallerdir. ROS genelde mitokondri gibi organellerin fonksiyonlarından yada iyonize radyasyon gibi dış etkenlerden hücre içinde üretilmiştir.

Antioksidan enzimler yolu, ROS'un neden olduğu hasarın onarımında rol oynayan en önemli yol olarak düşünülmektedir. Antioksidan yolaklardaki bozukluklar diyabet, yaşla ilişkili hastalıklar ve kanser gibi çeşitli hastalık türleriyle ilişkilidir.

Oksidatif hasar ve inflamatuvar süreçlerle ilgili spesifik moleküller, CRC (kolorektalkarsinom)'nin farklı fazlarının karakterize edilmesini sağlayabilir, yine de araştırmaya ihtiyaç duyar (Yoshizawa vd., 1998).

İnsanlarda, birkaç grup selenyumun diyetle alınması ile akciğer, kolon ve prostat dahil olmak üzere çeşitli yerlerdeki kanser insidansı arasında ters korelasyon bildirmiştir. Selenyum (Se) insan sağlığı için gerekli olan bir mikro besindir (Bellinger vd., 2009)(Rayman, 2009).

Selenyum tüketiminin bir sonucu olarak kanser insidansındaki azalma, selenyumun etkili olduğunu göstermiştir. Akciğer, kolon, prostat ve karaciğerde kanser insidansını azaltmaktadır (Clark vd., 1996)(Yu vd., 1997).

İnsan çalışmalarında, veriler selenyum düzeylerinin kanser mortalitesi ve insidansı ile ters olarak ilişkili olduğunu göstermiştir. Selenyum kanser mortalitesini ve kolorektal kanser insidansını azaltmıştır (Ghadirian vd., 2000).

Selenyumun kanser insidansını etkileyebileceği bir mekanizma, selenyum içeren proteinler üzerindeki etkilerinden kaynaklanır. Glutasyon peroksidaz-1 (GPX1), hidrojen ve lipid peroksitleri her yerde ifade eden ve detoksifiye eden hücre içi selenyum bağımlı bir enzimdir. GPX1 seviyeleri diğer selenoproteinlere kıyasla selenyum seviyelerindeki dalgalanmalara özellikle duyarlıdır(Chu vd., 2004).

Epidemiyolojik çalışmalar, GPX1 genlerindeki allellik varyasyonların, H₂O₂'nin üretimi ve eliminasyonu arasındaki dinamiği etkilediğini gösterdi. Deneysel ve epidemiyolojik kanıtlar GPX1'in kanser riskini ve ilerlemeyi etkilemek üzere etkileşebileceğini gösteren epidemiyolojik kanıtlar, aktiviteler arasındaki dengeden kaynaklanan net mitokondriyal H₂O₂ birikiminin (mtH₂O₂) olduğunu ortaya koymuştur (Ekoue vd., 2017).

GPX enzimlerinin bazılarının hücre içi patolojik süreçlerin önlenmesinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir. GPX, oksidatif hasara karşı hücreleri koruyan antioksidan bir enzimdir.

Önceki bir çalışma, insan SEPP1 geninin promotöründeki varyantlar CRC riskini (Al-Taie vd., 2004) değiştirmemesine rağmen, daha yakın zamanda yapılan bir çalışmada, SEPP1'de üç değişikliğin (rs3797310, rs2972994 ve rs12055266) ileri kolorektal adenom riski ile ilişkisini gösterdi (Peters vd., 2008).

Antioksidan enzimlerin etkinliğindeki azalmalar, diyabet, kanser gibi pek çok patolojik süreçle ilişkilidir. Selenoproteinleri kodlayan genlerdeki genetik varyasyonların, hücre koruma mekanizmalarını ve kansere yatkınlığı etkilemesi olasıdır. Bu çalışma ile, kolorektal kanserli hastalarda GPX enziminin etkinliğinde

değişikliklere sebep olabilecek tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ile, hastaların selenyum değerlerinin, hastalığın etyopatogenezi ve prognozundaki olası etkileri hakkında bilgiler edinilmesi amaçlanmıştır (Jacobs vd., 2004).



2. GENEL BİLGİLER

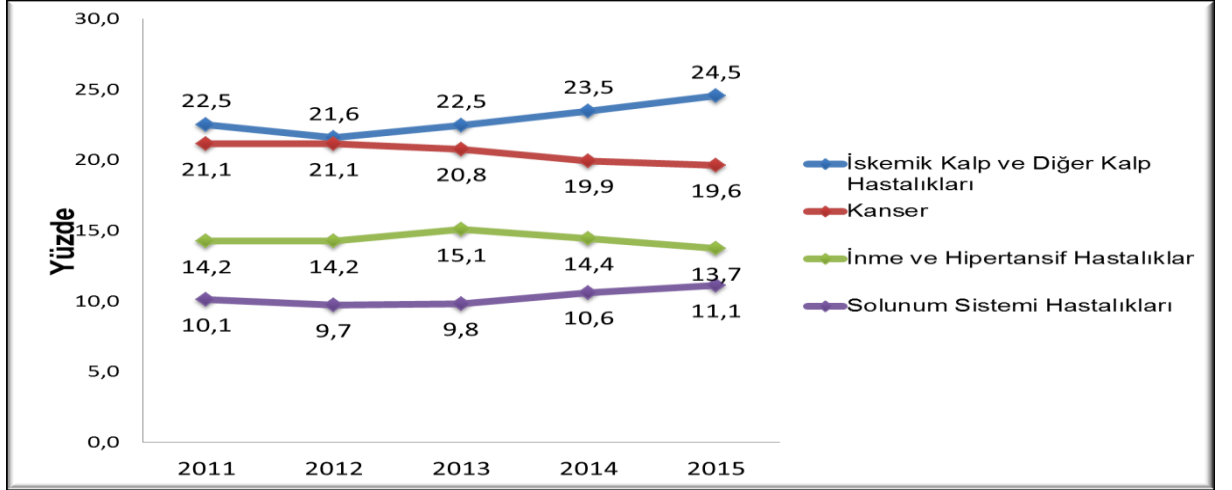
2.1. Kolon Kanseri

2.1.1. Epidemiyoloji

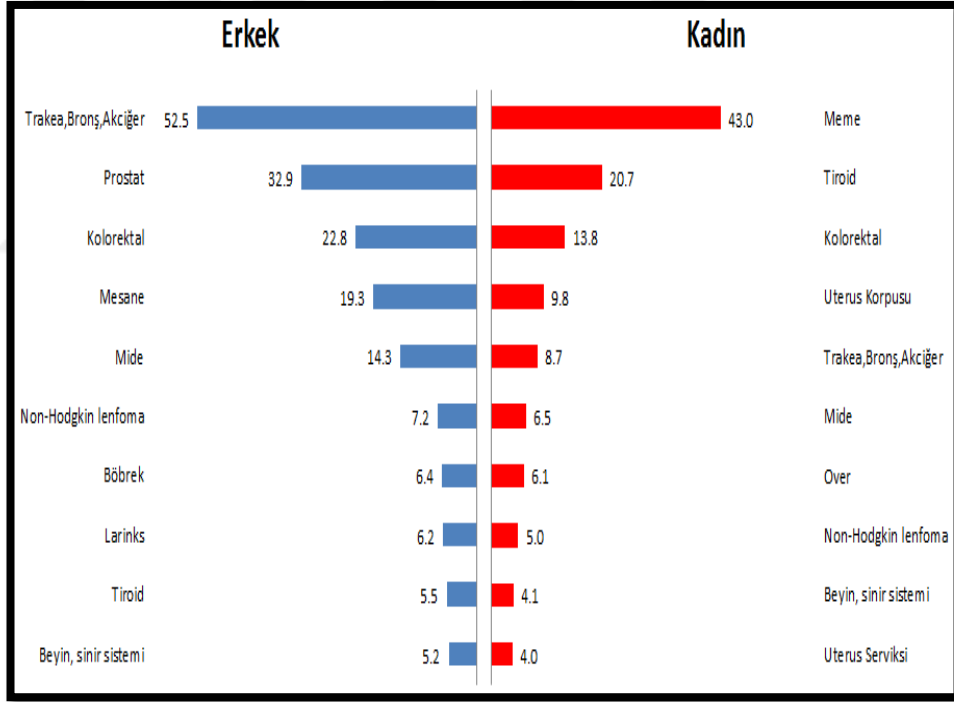
Kanser, vücudun belirli bir bölümündeki normal hücreler kontrol dışı kalmaya başladığında gelişir. Farklı kanser türleri vardır; her türlü kanser hücresi ölmek yerine büyür, bölünmeye devam eder ve yeni anormal hücreler oluşturur. Genellikle kanser hücreleri deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarına bağlı olarak normal hücrelerden oluşur. DNA'nın hasar gördüğü zamanların çoğunu vücut onarabilir, ne yazık ki kanser hücrelerinde hasar gören DNA onarılamaz (Sudhakar, 2009).

Kanser en yaygın genetik hastalıktır: Batı dünyasında üç kişiden birinde gelişir (Futreal vd., 2001). WHO (Dünya Sağlık Örgütü) 2012 verilerine göre dünyada kanserden meydana gelen ölüm sayısı 8,2 milyon ile birinci sırada yer almakta ve TÜİK 2015 verilerine göre Türkiye'deki ölüm nedenlerinin % 19,6 sı kanserdir. 2014 yılında yapılan tarama sonucuna göre kadın ve erkeklerde görülen kanser türleri arasında kolorektal kanser 3. Sırada yer almaktadır (Keskinılıç, 2017).

2012 yılında 14.1 milyon yeni vaka ve 8.2 milyon ölüm tespit edilmiştir. En yaygın olarak teşhis edilen kanserler akciğer (1.82 milyon), meme (1.67 milyon) ve kolorektal (1.36 milyon) idi; kanser ölümünün en yaygın nedenleri akciğer kanseri (1,6 milyon ölüm), karaciğer kanseri (745,000 ölüm) ve mide kanseri (723,000 ölüm) idi. Kolorektal kanser, dünyadaki en yaygın üçüncü kanserdir ve 2012 yılında yaklaşık 1,4 milyon yeni vaka tespit edilmiştir (Peters vd., 2015).



Grafik 2.1. Türkiye’ de ölüm nedenleri (TÜİK-Sağlık Bakanlığı Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü,2016)



Grafik 2.2. Türkiye’ de En Sık Görülen İlk 10 Kanser (100.000 Kişide – 2014) (Keskinlikç, 2017)

Kanser, somatik mutasyonlar olarak da adlandırılan genetik ve epigenetik değişikliklerle karakterizedir. CRC tümörleri de genellikle somatik mutasyona sahip genlerde bulunur (Peters vd., 2015).

Kolorektal kanser; apandis, rektum ve kolonda büyüyen malign bir tümördür. CRC olgularının çoğunun sporadik olarak (% 70-80) ortaya çıktığı tahmin edilirken, CRC

vakalarının yaklaşık % 15'i ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve kalıtsal non polifozis kolorektal kanser (HNPCC) gibi, kalıtsal faktörlerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Souglakos., 2007).

Moleküler düzeyde incelendiğinde kolorektal kanserlerin büyük kısmında (%80-%90), adenomatöz polipozis koli (APC) olarak adlandırılan tümör baskılayıcı gende inaktive edici bir mutasyon saptanmaktadır (Dow vd., 2015).

CRC en sık rastlanan malign tümörlerden biridir ve morbidite ve mortalite oranları her yıl artmaktadır. 2016'ya ait kanser istatistikleri raporunda, Birleşik Devletler gibi gelişmiş ülkelerdeki tüm malign tümörler arasında CRC'nin en yüksek insidans ve mortalite oranlarına sahip olduğu gösterilmekte (Siegel vd., 2016). Kalın bağırsak (kolon-rektum) kanserleri en sık görülen üçüncü kanser olmakla birlikte, ölümlerle sonuçlanan kanserler arasında ikinci sırada yer almaktadır.

Önümüzdeki on yıllar boyunca dünya nüfusundaki mevcut insidans ve ölüm oranları ile öngörülen demografik değişimlere dayanarak, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), yeni teşhis konan CRC vakalarında % 77'lik bir artış ve 2030'a kadar CRC'den ölümlerde %80 artış tahmin etmektedir (Karsa vd., 2010) (McGuire , 2016) (Binefa vd., 2014).

2.1.2. Etiyoloji

Kanser etiyojisinin açıklanması çevresel ve genetik risk faktörlerinin entegrasyonuna bağlı (Garcia-Closas vd., 2014) genom, transkriptom, epigenom ve benzerleri üzerindeki tümöre özgü veri tabanlarının, belirli kanserojenlere işaret eden genetik değişim örüntülerinin keşfedilmesiyle etiyojolojiyi açığa çıkarma ihtimaline sahip olduğu gösterilmiştir (Mäbert vd., 2014). Daha hedefe yönelik biyolojik belirteçler, maruz kalma, DNA hasarı, genetik yatkınlık ve kanser arasındaki karmaşık mekanik ilişkilerin anlaşılmasına yardımcı olabilir (Porru vd., 2014).

Spesifik genlerdeki mutasyonlar, diğer kanser türlerinde olduğu gibi kolorektal kanserin başlamasına neden olmaktadır. Bu mutasyonlar, onkogenlerde, tümör süpresör genlerinde ve DNA tamir mekanizmalarıyla ilgili genlerde görülebilmektedir. Mutasyonun kökenine bağlı olarak, kolorektal karsinomlar

sporadik, kalıtsal ve ailesel olarak sınıflandırılabilir. Yaşam boyunca ortaya çıkan nokta mutasyonlar, kalıtım yoluyla alınan sendromlarla ilişkili değildir ve sadece bireysel hücreleri ve onların soylarını etkiler. Nokta mutasyonlardan türeyen kanserler, sporadik kanserler olarak adlandırılır ve tüm kolorektal kanserlerden %70 sorumlu gösterilmiştir (Fearon vd., 1990).

Farklı kanserler farklı risk faktörlerine sahiptir. Sigara gibi bazı risk faktörleri değiştirilebilir. Birinin yaşı veya aile geçmişi gibi değerleri değiştirilemez. Ancak, bir risk faktörü ya da çokluğu olması, hastalığı alacağınız anlamına gelmemektedir. Ve hastalığı olan bazı insanlarda bilinen herhangi bir risk faktörü olmayabilir (Adair vd., 2014).

Kanser vakalarının yaklaşık %30'unun diyet, şişmanlık ve/veya egzersiz eksikliğinden kaynaklandığı gösterilmiştir (Ng vd., 2014). Sedatif davranış kolon ve endometriyal kanser riskini arttırmaktadır. Dünya çapında, vücut kütle indeksi 25 kg/m² veya daha fazla olan yetişkinlerin oranı, 1980 ve 2013 yılları arasında %28.8 (28.4-29.3) ile %36.9 (26.3-37.4) arasında artarken, %95 belirsizlik aralığı gösterilmiştir (Scully, 2014).

Küresel olarak, 2012 yılında 481000 kanser (tüm erişkin kanserlerinin %3.6'sı) aşırı vücut kütle indeksine bağlanmıştır (Arnold vd., 2015). Sosyo ekonomik koşulların iyileştirilmesi, artan tütün ve alkol kullanımı, yüksek yağ/şeker alımına yönelik diyet değişiklikleri ve azalmış fiziksel aktivite ile kanser riskinin artması ilişkilendirilmiştir (Ng vd., 2014).

Diyet kalsiyumunun düşük seviyeleri, bazı çalışmalarda artan kolorektal kanser riski ile ilişkilendirilmiştir (Alteri vd., 2018).

Kırmızı et (sığır eti, domuz eti, kuzu veya karaciğer gibi) ve işlenmiş etlerden (sosisli sandviç ve bazı öğle yemekli etler gibi) yüksek bir diyetin kolorektal kanser riskini arttırdığı gösterilmiştir. Etleri çok yüksek sıcaklıklarda pişirme (kızartma, kızartma veya ızgara) kanser riskini artıracak kimyasallar üretir ancak bunun kolorektal kanser riskini ne kadar artırabileceği kesin olarak belirlenmemiştir (Jayasekara vd., 2016).

Diğer diyet bileşenlerinin (örneğin belirli yağların, lifli gıdaların) kolorektal kanser riskini etkileyip etkilemediği açık değildir.

Sigara, akciğer kanserinin bilinen bir nedeni olmakla birlikte, kolorektal kanser gibi diğer kanserlerle de bağlantılı olabilmektedir (Stewart vd., 2016)(McGuire, 2016).

Kolorektal kanser, ağır alkol kullanımıyla da bağlantılı olabilir. Alkol kullanımını erkekler için günde en fazla 2, kadınlarda günde 1 kez bir içecek ile kısıtlamak, kolorektal kanser riskini azaltmak da dahil olmak üzere pek çok sağlık yararı için önerilmiştir. Ayrıca yaş ilerledikçe kolorektal kanser riskinin yükseldiği öne sürülmüştür.

Ülseratif kolit veya Crohn hastalığı da dahil olmak üzere inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) ve birinci derece akrabasında (ebeveyn, kardeş veya çocuk) kolorektal kanser öyküsü olan kişiler için, kolorektal kanser riskinin arttığı bildirilmiştir.

Kolon kanserinin katkıda bulunan nedenlerinden birisi, reaktif oksijen türlerinin DNA onarım mekanizmalarına olumsuz etkisidir. Birçok çalışma, oksidatif strese karşı koymada ve kolorektal karsinogenezi önlemede antioksidanların önemini belgelemektedir (Carini vd., 2017).

Artan riskin nedenleri her durumda açık değildir. Kanserlerin kalıtsal genler, ortam çevresel faktörler veya bunların bir kombinasyonu nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir (Mármol vd., 2017).

2.2. Oksidatif Stres ve Kanser

Oksidatif stres, enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler de dahil olmak üzere ROS'un üretimi ile antioksidan savunmaları arasındaki denge bozulması olarak tanımlanmaktadır (Betteridge, 2000)(Yildirim vd., 2009). Oksidatif stres, makro moleküler oksidatif hasara yol açar, doku proteini denatürasyonunu, DNA hasarını ve lipid peroksidasyonunu tetikler ve vücudun normal metabolik aktivitesini bozarak hastalıkların oluşumuna ve/veya gelişimine sebep olur (Wu vd., 2017).

Oksidatif reaksiyonlar çoğunlukla kanserin erken evresi ile ilişkili olsa da, esas olarak DNA hasarını indükledikleri için, anti-tümör etkilere sahip olmaktan ziyade tümör ilerlemesini ve invazivliği kolaylaştırabilen antioksidan tepki aktivasyonunda yer alabilirler. CRC'de inflamasyon sırasında aktive edilen redoks duyarlı sinyal yolları bu fenomenin başlıca aktörlerinden biridir (Rokutan vd., 2006).

Süperoksit veya hidrojen peroksit gibi ROS'un birikimine bağlı oksidatif stres, birçok kanser hücresinde yaygın olarak görülür (Nogueira vd., 2013)(Toyokuni vd., 1995). Bununla birlikte pnömoni, pankreatit (Osterreicher vd., 2007), diyabetik nefropati, kardiyovasküler hastalık, sinir sistemi hastalığı (Feng vd., 2012) gibi çeşitli hastalıklar da etkendir (Eroglu vd., 2013).

2.2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektronlar diğer maddelerle kolaylıkla reaksiyona girebilir ve serbest radikallere büyük bir reaktivlik kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid ko-enzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır (Diplock, 1998).

Serbest radikaller oksijen (Tablo 2.1.) ve nitrojen kaynaklı olabilir (Tablo 2.2.). Oksijen kaynaklı olanlar ROS ve nitrojen kaynaklı olanlar reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak isimlendirilir. Reaktif oksijen türleri arasında süperoksit ($\cdot O_2^-$), hidroksil (OH \cdot), peroksil (ROO \cdot), lipid peroksil (LOO \cdot), ve alkoksil (RO \cdot) radikalleri sayılabilir. Reaktif nitrojen türlerini ise nitrik oksit (NO \cdot) ve nitrojen dioksit (NO $_2\cdot$) oluşturur.

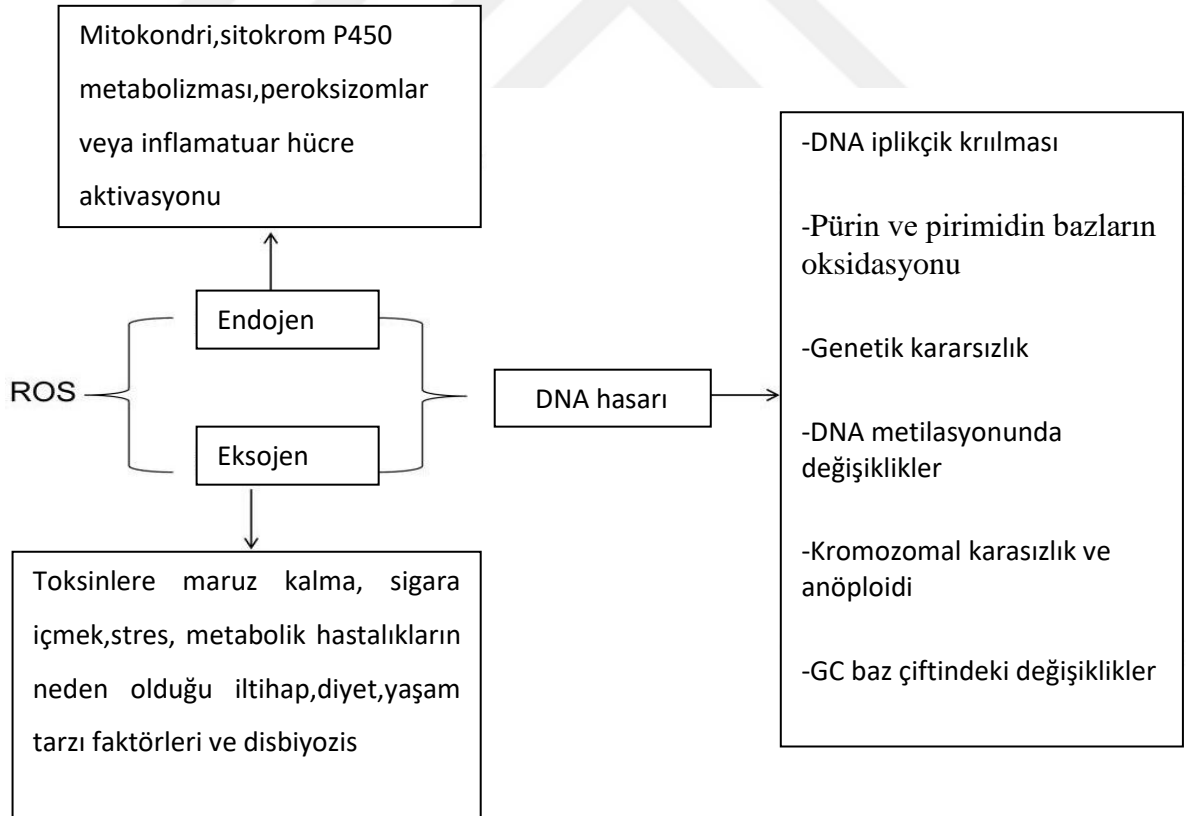
ROS ve RNS diğer non-radikal reaktif türlere kolay bir şekilde dönüşebilir. Genellikle oksidanlar olarak adlandırılan hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$), ozon (O $_3$), tekli oksijen (1O_2), hipokloröz asit (HOCl), nitrik asit (HNO $_2$), peroksinitrit (ONOO), di nitrojentrioksit (N $_2$ O $_3$) ve lipid peroksit (LOOH) ise serbest radikaller arasında gösterilmezler. Bu oksidan türleri patolojik ve fizyolojik durumlar altında canlılar

tarafından üretilir ve canlı organizmada kolaylıkla serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilirler (Karabulut vd., 2016).

H₂O₂, OH., .O₂⁻ ve ONOO gibi ROS, normal enerji metabolizmasının yan ürünleri olan oksijenin eksik tamamlanmasından türemiştir (Saud vd., 2014). Aerobik organizmalarda, mitokondri, sitokrom P450 metabolizması, peroksizomlar veya enflamatuvar hücre aktivasyonu gibi eksojen kaynaklardan hem de endojen olarak üretilirler (Sreevalsan vd., 2013).

2.2.1.1. Reaktif oksijen türleri

ROS, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla kanserojen fenotipleri teşvik ederek kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve sağ kalımını uyarır (Saud vd. , 2014). (Şekil 2.1.)



Şekil 2.1. ROS'un DNA üzerindeki etkileri

ROS aktif oksitlerin çoğunluğunu ve toplam oksitlerin %95'inden fazlasını oluşturur. ROS seviyelerinin antioksidanlarla dengesiz olduğu oksidatif stres koşulları altında ROS; kontrolsüz çoğalma, inflamasyon veya apoptozise yol açan hücre için zararlı olabilir (Valko vd., 2007)(Kramer vd., 2007).

Bununla birlikte, ROS'un faydalı ya da zararlı rolü konsantrasyonlarına bağlıdır. Belirli bir seviyedeki ROS, DNA hasarı ve genetik mutasyonların indüklenmesi, hücre içi sinyal, transkripsiyon aktivasyonu, hücre çoğalması, inflamasyon ve apoptoz gibi hücre fonksiyonlarının düzgün bir şekilde düzenlenmesi için çok önemlidir ancak makro moleküllere daha yüksek ROS miktarı zararlıdır (Lachance vd., 2001)(Valko vd., 2006).

Aşırı ROS üretimi aynı zamanda hücre döngüsü tutuklanmasına, yaşlanmasına ve programlanmış hücre ölümüne neden olabilir (Trachootham vd., 2008)(Trachootham vd., 2009).

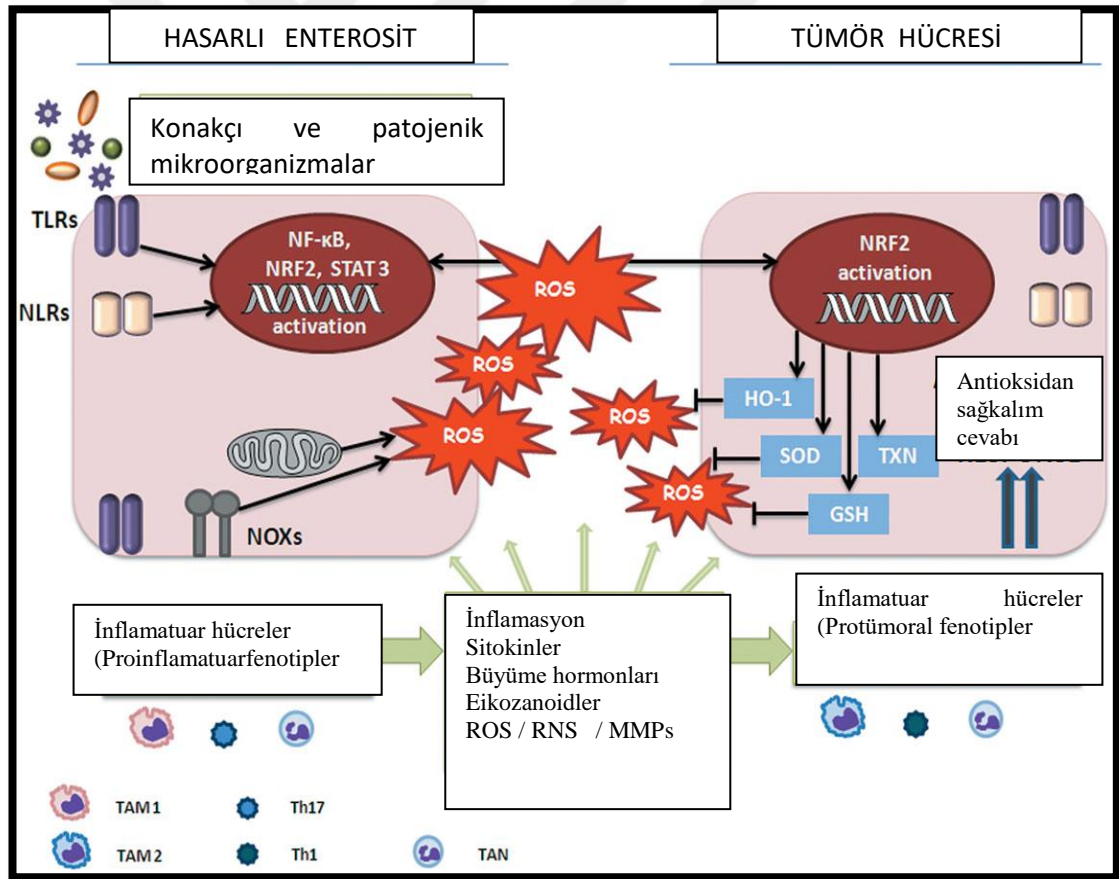
Ayrıca proteinler ROS'a duyarlıdır ve artan serbest radikal üretiminin sık hedefidir. ROS, yapısal proteinleri oksitlemekte ve proteolitik sistemi inhibe etmektedir. Bu gibi reaksiyonlar, protein yapılarının değişmesine veya enzim işlevlerinin değiştirilmesine yol açar. İkincisi enzimatik ve bağlayıcı aktivitelerin inhibisyonu, hücrelerin artmış veya azaltılmış alımı, DNA tamir enzimlerinin inaktivasyonu ve çoğaltılmış DNA'da hasar görmüş DNA polimerazlarının güvenilirliğini kaybetmesi gibi geniş işlevsel sonuçları bir araya getirebilir (Shringarpure vd., 2002).

ROS üretimi metabolik hastalıklar, diyet, yaşam tarzı faktörleri ve disbiyozis kaynaklı toksinler, sigara, stres ve inflamasyona maruz kalındığında artar (Pais vd., 2013). Bu reaktif türler; lipidler, karbonhidratlar, proteinler ve nükleik asitler gibi biyo moleküllerle reaksiyona girebilir ve böylece hücre işlevine müdahale edebilir (Yung vd., 2006).

Sonuç olarak DNA mukavemetine neden olan nükleotid diziliminde bozulma, pürin ve pirimidin bazlarının oksidasyonu, genetik istikrarsızlık (Saad vd., 2014) ve DNA metilasyonunda kromozomal instabilite ve anöploidi oluşturan değişiklikler meydana

gelebilir. Bu meydana gelen oksidatif hasar, mutagenез, karsinogenез ve yaşlanmaya katılan ilk adımdır (Slattery vd., 2015)(Sreevalsan vd., 2013).

Nötrofiller ve makrofajlar gibi, inflamatuvar fagositik hücreler immün yanıt oluşturmak için oksidaz (NOX) üretirler. Bu enzim, bakterileri işlemek ve öldürmek için gerekli ROS'u üretir. Kanser başlangıcı sırasında ROS oluşturmadaki rolünün yanı sıra, NOX ayrıca epitelyal tümör hücresi proliferasyonu ve invazyonunda da önemli bir rol oynar. Süperoksit ve H₂O₂ ikinci haberciler gibi hareket edebilir. Patojenlerle veya spesifik sitokinlerle temas ettiğinde, NOX, oksijeni O₂•-'e dönüştürür, sonra antioksidan enzimlerle süperoksit dismutaz (SOD) ve daha sonra H₂O ve O₂'den glutasyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) yoluyla H₂O₂'ye dönüştürülür (Juhasz vd., 2009).



Şekil 2.2. İnflamasyon ve oksidatif reaksiyonlar

Önceden varolan inflamasyon, tümör başlangıcını destekleyen inmutasyonlar ve epigenetik değişimlere neden olabilir. ROS/RNS, proinflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri ve aktif inflamatuvar/immün hücreler tarafından üretilen prostaglandinler, mutasyonları ve genomik değişiklikleri başlatır, Bu uyarılara yanıt olarak çoğalan ve hayatta kalan premalign hücrelerin (hasarlı enterosit) ortaya çıkmasıyla sonuçlanır.

Böyle bir mikro ortamda malign transformasyonun erken evrelerinde, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) 1, tümörle ilişkili nötrofiller (TAN) 1 ve T yardımcı (TH) 17 lenfositler gibi, inflamatuvar infiltrat tipik olarak proinflamatuvar bir fenotipi eksprese eden hücrelerden oluşur.

Bu hücreler transkripsiyon faktörleri nükleer faktör-B (NF-B) ve sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) 3 aktivasyonundan ve aynı zamanda inflamasyonla ilişkili tümör gelişiminin patogeneğinde rol oynayan anahtar olayları temsil eden Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH), NOX yukarı regülasyonundan sorumludur.

Dahası, intestinal mikrobiyota tarafından Toll-benzeri reseptörlerin (TLR) ve Nod benzeri reseptörlerin (NLR) aktivasyonu, NF-P ve STAT3 aktivasyonu yoluyla inflamasyona katkıda bulunabilir.

NOX ve mitokondri, hücre büyümesi ve proliferasyonunda rol oynayan önemli moleküllerin yapısal ve fonksiyonel hasarını indükleyebilen ROS üretimi ve ilgili oksidasyon ürünlerinden sorumludur.

Normalde, enterositlerde oksidatif hasar, hücre sel antioksidan savunmalarla, özellikle redoks duyarlı nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2 (NRF2), GSH, hemeoksijenaz (HOX-1), SOD ve tiyoredoksin (TXN) gibi antioksidan molekülleri indükler.

Tersine, hücreler malign fenotip (tümör hücresi) aldığı nda, artan antioksidan tepkisi ve yüksek oranda antioksidan üretimi, onların ilerlemesini ve yayılmasını kolaylaştırır.

Özellikle, bu kanser aşamalarında, esas olarak farklı büyüme faktörlerini ve tümör sağ kalımını ve invazivliğini sürdüren proteinazları sentezleyen proteojenik aktivitesi olan hücreler (yani, TAM2, TAN2 ve TH1) ile yer değiştirmektedir.

İnflamasyon sırasında ROS üretimi yoluyla NF- κ B'nin aktivasyonu, karsinogenezi destekleyebilir. Aktive edilmiş NF- κ B ile tümör hücreleri, kemoterapötiklere karşı direnç kazanırlar; NF- κ B'nin etkisiz hale getirilmesi, bu ajanlara karşı duyarlılıklarını artırır (Berardi vd., 2012).

NRF2'nin, tümörjenezde ikili bir rol oynadığı düşünülmektedir. Birçok rapor, NRF2 aktivasyonunun, özellikle de en erken aşamalarda birçok malign tümörde karsinogenezi baskılayabildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, malign tümörlerde NRF2'nin sürekli aktivasyonu ortaya çıkar. NRF2 ayrıca, kanser hücrelerinde redoks dengesini koruyarak ve antioksidanlar oluşturarak kanser hücresi proliferasyonunu ve tümör oluşumunu destekleyebilir.

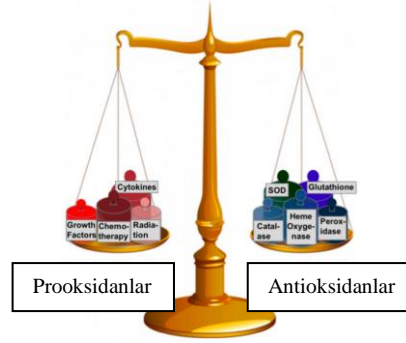
GSH sentezinin artması, kanser hücresi proliferasyonunu hızlandırmada NRF2'nin bir başka önemli etkisidir. Özellikle, NRF2, NF- κ B'yi inhibe ederek enflamasyona karşı korumaya katılabilir (Kim vd., 2010). Tersine, NF- κ B'nin inflamasyon sırasında oksidatif stresin bir sonucu olarak NRF2'yi aktive edebileceği de düşünülebilir (Guina vd., 2015).

2.3. Antioksidan Savunma Sistemi

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere; antioksidan adı verilir (Elliott, 1999).

Antioksidan enzimler yolu, ROS'un neden olduğu hasarın onarımında rol oynayan en önemli yoldur. Ayrıca tümör hücrelerinin büyümesi ve invazivitesi ile ilişkili çeşitli metabolik ve moleküler süreçlerle ilgilenmektedirler. Antioksidan aktivitesini artırarak oksidatif strese karşı koymak, ROS'un zararlı etkilerini geciktirmenin potansiyel olarak etkili bir aracıdır (Goldstein vd., 2014)(Mazzola vd., 2016).

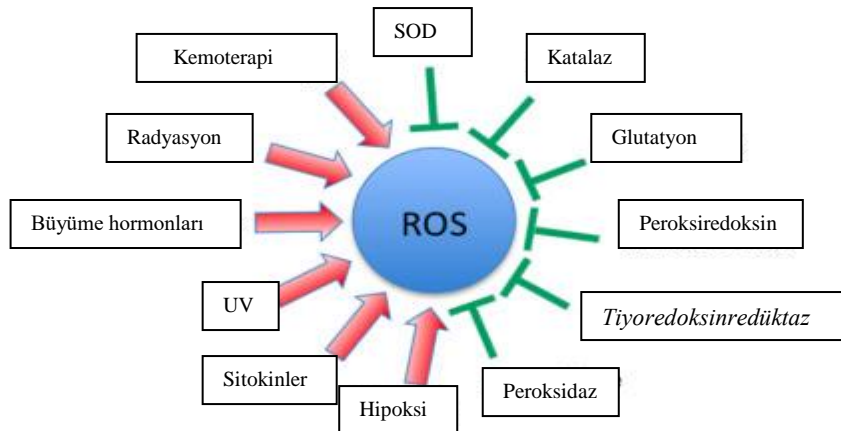
ROS'un üretimi ve çıkarılması arasındaki dengeyi kontrol etmek için (Şekil 2.3.), çeşitli DNA onarım enzimleri bulunur, antioksidanlar hücrelerin radikallerden korunmasında daha spesifik ve etkilidir.



Şekil 2.3. Pro-oksidanlar ve anti-oksidanlar arasındaki dengenin modeli (Yi Zhang vd.,2011)

Antioksidan savunma sisteminin toplu olarak çalışan sayısız antioksidandan oluşmaktadır. Antioksidanlar birincil (SOD, CAT, GPX, glutatyon redüktaz (GR)) , ikincil (E vitamini, vitamin C, beta-karoten, ürik asit, bilirubin ve albumin) ve üçüncül (serbest radikal tarafından hasar görmüş biyomoleküller) savunma elementleridir (Valko vd., 2007).

Organizmayı zararlı pro-oksidanlara karşı korumak, enzimatik antioksidanların (örneğin SOD, GPX, GR, CAT)ve enzimatik olmayan antioksidanların (GSH, vitaminler C ve D) kompleks bir sistemidir (Sies, 1991). (Şekil 2.3.)



Şekil 2.4. Reaktif oksijen türünün çeşitli aktivatörlerinin ve inhibitörlerinin şematik gösterimi (Reuter vd., 2010)

2.3.1. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

İkincil antioksidanlar; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran glutatyon, selenyum, C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi bileşiklerdir (Ou vd., 2002).

GSH, hücreler tarafından üretilen ve serbest radikaller ve peroksitler gibi ROS'lardan korunmaya yardımcı olan bir tripeptid ve başlıca endojen antioksidandır (Pompella vd., 2003).

ROS ve elektrofilik kimyasalların DNA'ya zarar verebileceği ve GSH'nin bu tür hasara karşı koruyabileceği şimdi iyi bir şekilde belirlenmiştir (Valko vd., 2007).GSH, aynı zamanda, karsinojenleri faz II metabolizması ve bu kimyasalların hücreden daha sonra ihracatı yoluyla doğrudan detoksifiye edebilir.

Diğer taraftan, kanserli hücrelerin ve katı tümörlerin çeşitli tiplerinde yükselmiş GSH seviyeleri gözlenir ve bu, bu hücreleri ve dokuları kemoterapiye daha dirençli hale getirme eğilimindedir (Estrela vd., 2006).

GPX, substrat olarak GSH kullanılarak lipid hidroperoksitler de dahil olmak üzere hidroperoksiti azaltabilen başka bir enzim grubudur. Glutatyon di sülfidin (GSSG) oksitlenmiş formu yine spesifik enzim GR tarafından azaltılır (Zhang vd., 2011).

2.3.1.1. Selenyum

CRC; genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonundan kaynaklanmaktadır (Lamprecht vd., 2003). Diyet, CRC gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır ve birçok biyolojik mekanizma mikro besinler ile azalmış CRC riski arasında teorik bir bağlantı sağlamaktadır (Bruce vd., 2000)(Hill, 1999).

Oksidatif stres, CRC gelişimi ve progresyonunda önemli bir rol oynar (Kovacic vd., 2001), ve serbest radikallerin aşırı üretimi veya yetersiz antioksidan savunmalardan kaynaklanır (Watters vd., 2007).

Serbest radikaller doku hasarı oluşturabilecek dengesiz, yüksek oranda reaktif oksijen içeren moleküllerdir. Bu nedenle, serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki denge kritiktir. C vitamini, E vitamini, karotenoidler ve Se gibi çok sayıda besin maddesi, antioksidan özelliklere sahiptir (Borek., 2004) ve serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyucudurlar.

Se'nin anti neoplastik etkisi için birkaç önerilen mekanizma vardır. Se, GPX'i arttırarak ve mukozal prostaglandin E seviyelerini düşürerek bir antioksidan görevi görebilir. Önerilen diğer mekanizmalar; lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, peroksit ayrışımı, serbest radikal süpürme ve moleküler hasarın onarımıdır. Selenyum metabolitlerinin apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (Reddy vd., 1992)(Lanfeard vd., 1994)(Russo vd., 1997).

2.3.1.1.1 Selenyum alımı ve kanser

Se, insan sağlığı için gerekli olan mikro besin maddesidir (Rayman, 2009). İnsan vücudunda selenyumun fonksiyonları, selenosistein amino asidi (Sec) içeren 25 selenoproteinle sağlanır (Kryukov vd., 1999)(Kryukov vd., 2003).

Se'in kanser insidansını etkileyebileceği mekanizma, Se içeren proteinler üzerindeki etkisidir. Selenoproteinler; hücrelerin oksidatif radikallere zarar vermesini önleyen glutatyon peroksidazla 1 ve 4 (GPx1 ve GPx4), Se'yi dokulara (Burk vd., 2005) taşıyan selenoprotein P (SePP), redoks kontrolünde (Arner, 2009) çalışan tioredoksin redüktazları (TR), 15 kDa selenoprotein (Sep15) ve inflamasyonda rol oynayan yeni bir tioredoksin benzeri proteinler ve selenoprotein S (SelS) ailesinin üyelerini (Shchedrina vd., 2010) içerirler.

Bu nedenle, selenoproteinleri kodlayan genlerdeki genetik varyasyonların, hücre koruma mekanizmalarını ve kansere yatkınlığı etkileyebileceği olasıdır. Selenoprotein genlerindeki birkaç SNP'nin fonksiyonel sonuçlara sahip olduğu gösterilmiştir. (Meplan vd., 2010)

Bir selenoprotein, sitoplazmik GPX1, hidrojen ve lipid peroksitleri her yerde eksprese eden ve detoksifiye eden hücre içi selenyum bağımlı bir enzimdir. Birçok

çalışma, selenyumun hGPX1 aktivitesini ve ifadesini artırdığını göstermiştir. Genellikle, selenyumun bir hücrenin antioksidan kapasitesini arttırdığı ve dolayısıyla hücre içi oksidatif stresi azalttığı belirtilmiştir (Nordlund vd., 2006).

Selenoproteinler önemli enzimlerdir ve insan sağlığına olan önemi, selenoprotein genlerindeki SNP'lerin hastalık riski veya mortalitesi üzerine etkisi ile gösterilmiştir.

- 15 kDa selenoprotein (SEP15) = ER'de yer alır; glikoprotein katlanmayı etkileyebilir.
- Selenoprotein S (SEPS1) = ER'de bulunan anti inflamatuvar; ER strese, glikoz metabolizmasına ve insülin duyarlılığına bağlı apoptozdan hücreleri koruyabilir.
- Selenoprotein P (SEPP1) = 10 adet selenosistein kalıntısı içerir; plazma selenyum durumunun iyi bir göstergesi için katkıda bulunur.
- Glutasyon peroksidazlar = Antioksidan enzimlerin ailesi: hidrojen peroksit, lipid hidroperoksitler, (GPx4) fosfolipit ve kolesterol hidroperoksitleri temizler.
- GPx1 (sitosolik) = Retro viral virülansı azaltır; eksikliği kardiyomiyopatiye neden olur.

(Rayman, 2009)

2.3.2. Enzimatik Antioksidanlar

Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir.

Birincil antioksidan kategorisinde SOD, GPX, CAT ve GR yer alır. Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak suretiyle bir hücresel bölgeden diğerine geçişini de önleyebilmektedirler (Diplock, 1998).

SOD, CAT ve GPX; organizmaları oksidatif hasardan koruyan antioksidan enzimlerdir (Chandrasena vd., 2006). SOD, süperoksiti hidrojen peroksit haline dönüştürür. CAT, hidrojen peroksitin su ve oksijene ayrışmasını katalize eder, böylece yüksek ROS seviyelerinden gelen hücre hasarını önler. GPX'ler, glutatyonun birleştirilmiş oksidasyonu ile organik peroksitleri ve hidrojen peroksiti düşüren selenoproteinlerdir (Yung vd., 2006)(Valko vd., 2007).

SOD, CAT ve GPX enzimlerini kodlayan antioksidan genlerin genetik çeşitliliği, enzimatik aktivitelerinin azalmasına veya bozulmasına ve ROS detoksifikasyonunun değişmesine neden olabilir. Bu nedenle, hücreyi ROS'a karşı koruyan enzimler arasındaki genetik değişiklikler hastalık riskini modüle edebilir (Forsberg vd., 2001). CAT daha sonra H₂O₂'nin suya detoksifikasyonundan sorumludur.

2.3.2.1. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon, çoğu aerobik organizmanın merkezi redoks ajanıdır. Glutatyon peroksidaz sistemi, GPX enzimi ve GR enzimleri ve kofaktörler GSH ve indirgenmiş NADPH enzimleri de dahil olmak üzere çeşitli bileşenlerden oluşur. Bu moleküller birlikte hidrojen peroksidi etkili bir şekilde çıkarırlar. Üç amino asitten oluşan GSH, bu sistemin vazgeçilmez bir bileşenidir ve glutatyon transferaz adı verilen; bazı ilaçların ve kimyasalların yanı sıra diğer reaktif moleküllerin hücrelerden çıkarılmasına yardımcı olan bir enzim için bir kofaktör görevi görür. Dahası, GSH, bazı ROS (örneğin, hidroksil radikali) ile etkileşime girerek onları detoks hale getirmenin yanı sıra hücredeki diğer kritik faaliyetleri de yerine getirir (Fernández-Checa vd., 1997). GSH'nin oksidasyonu ile H₂O₂'nin indirgenmesini katalize eden GPX; ilk olarak Mills tarafından tanımlanmıştır (Mills, 1957). GPX1 keşfedilen ilk memeli selenoproteini olup, hidrojen peroksitin detoksifikasyonuna ve geniş bir organik peroksit aralığına katılan selenyum bağımlı bir enzimdir. GPX1'in sitozolik formu, bir başka sitozolik formu olan GPX2 (Chu vd., 1993), plazma bazlı GPX3 (Takahashi vd., 1990) ve fosfolipid hidroperoksidaz GPX4 (Maiorino vd., 1991) içeren selenyum bağımlı peroksidazlardan bir ailenin üyesidir (Ratnasinghe vd., 2000).

Günzler ve ark. GPX1'in (Günzler vd., 1984) amino asit dizisini belirlediğini, Chambers ve ark. Fare GPX' de ki selenosistein kalıntısının bir durdurma kodunu tarafından kodlandığını göstermiştir (Chambers vd., 1986).

Selenosistein içeren redoks enzimlerinin bir ailesi olan glutatyon peroksidazlar, ROS sinyal, immüno modülatör ve zararlı etkilerini dengelemek için önemli rol oynamaktadır. Glutatyon peroksidazlarının katalitik triadında bulunan selenosistein, glutamin ve triptofan kalıntılarıyla hidrojen bağıyla optimize edilir ve aktivitesini artırır ve GPX1 gibi belirli glutatyon peroksidazlarında antioksidan aktivite sağlar (Barrett vd., 2013).

GPX'ler, hücreleri hidrojen peroksit ve indirgenmiş glutatyonla geniş bir organik peroksit aralığına indirgeyerek oksidatif hasara karşı hücre savunma mekanizmalarıyla ilişkilendirmiştir (Cohen vd., 1963)(Flohe, 1988).

H₂O₂'nin yanı sıra, enzim çeşitli organik hidroperoksitlerin indirgenmesini de katalize edebilir (Little vd., 1968). GSH'ın sadece hücre sel bileşenleri H₂O₂ toksisitesinden koruduğu değil aynı zamanda lipit hidroperoksitleri parçalayarak yapısal lipidlerin oksidasyonunu önlediği ve bunun da lipit peroksidasyonunun engellenmesine neden olduğu bildirilmiştir (Awasthi vd., 1979).

İnsan GPX1 genindeki işlevsel polimorfizmler, artmış akciğer kanseri ve olasılıkla diğer organların kanseri riskiyle ilişkilidir. Spesifik GPX1 alleli ile bağlantılı bir kanser riskini gösteren verilere ek olarak, GPX1 lokusundaki heterozigotluk kaybı (LOH), kanser gelişiminde ortak bir olay olarak gösterilmiştir (Moscow vd., 1994).

Alel kaybı, hücrenin GPX1 aktivitesinde, zayıflatılmış antioksidan savunmada veya etkilenen sinyal yollarındaki değişikliklerle sonuçlanarak geri kalan alelde resesif geçişli bir mutasyonun ortaya çıkmasına veya kanser teşvik edilmesine neden olabilir (Hu vd., 2005).

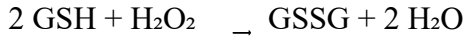
CRC'ye duyarlılığı etkileyebilecek genetik faktörler üzerine yoğunlaşmıştır (Slattery vd., 2012). Antioksidatif koruyucu sistemle ilişkili genlerde birkaç tek nükleotid polimorfizm (SNP) bulunmuştur. Selenoproteinler, selenosisteine dahil

olan yaklaşık 25 protein grubu içerir ve bunlar, oksidatif strese karşı çeşitli koruyucu mekanizmalara dahil edilmiştir. Örneğin, GPX antioksidan enzimi, redoks kontrolünde TR fonksiyonu, SePP dokulara selenyum taşır ve Sels katlanmamış protein tepkisinin giderilmesinde rol oynamaktadır (Meplan vd., 2010).

2.3.2.1.1. Glutasyon bağımlı GPX' in enzimatik mekanizması

Enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla serbest radikalleri yakalamak için görev yapan hücrel antioksidanlardır. Bir tripeptid olan glutasyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Glutasyonun, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı koruma mekanizması, enzimatik olarak gerçekleşmektedir (Di Mascio vd., 1991). Aktivitesi için Se mineraline ihtiyaç duyan GPX enzimi, glutasyonun indirgenmiş formunu (GSH), oksitlenmiş hale (GSSG) dönüştürmektedir.

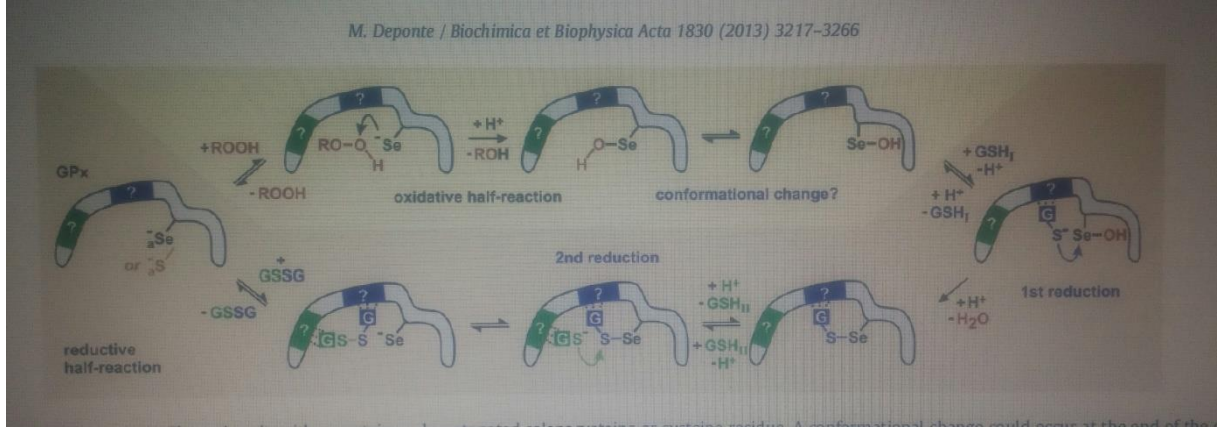
GSHPx



Glutasyon aynı zamanda hücre içinde tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), süperoksit anyonu ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksi ($\cdot\text{OH}$) radikalleri gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir (Larson, 1988).

Hidroperoksitlerin GPX katalizli indirgeme mekanizması (Şekil 3.1.)

- (i) Hidroperoksit, GPX tarafından saldırıya uğramadan önce glutasyonile değıldir.
- (ii) Ara madde olarak oldukça reaktif bir selelenik / sülfenik asit oluşur.
- (iii) Modifiye edilmiş enzimin rejenerasyonu, indirgeyici yarı reaksiyonda iki basamak gerektirir (Flohé vd., 1972).



Şekil 2.5. GPX katalizinin modeli

Aktif bölge, protondan arındırılmış bir selenosistein veya sistein kalıntısı içerir. İndirgeyici yarı reaksiyon iki kısımdan oluşur. Oksidatif yarı reaksiyonun sonunda konformasyonel bir değişim meydana gelebilir. Bir glutatyon bağlayıcı sistenin varlığı ve bileşimi, GPX izoformuna büyük ölçüde bağlıdır ve bu nedenle, tahmin edilen her iki bölgede soru işaretiyle belirlenir. (alternatif olarak, GSH1 ve GSH2 ayrıca bazı bağlanma artıkları için de yarışabilir) (Deponte, 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Gereç

3. 1. 1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Laboratuvar çalışmaları İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde yapılmıştır.

Çalışmada örnek olarak iki grup kullanılmıştır. İlk gruba kendisinde tümör bulgusu olmayan ve ailesinde kanser tanısı olmaması tercih edilen 99 birey kontrol grubu olarak dahil edilmiştir.

Diğer grup için, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde kolorektal kanser tanısı alan 90 birey ele alınmıştır. Tanısı konan bireylerin örnek alımları ilgili klinikte gerçekleştirilmiştir.

3. 1. 2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı (+4 Beko)
- Derin dondurucu (-20 Uğur)
- Distile su cihazı (Millipore)
- Hassas terazi (Scaltec)
- Vortekskarıştırıcısipin (Biosan)
- Spektro fotometre (NanoDrop2000)
- UV- görünür alan spektrofotometresi (Maestro Gen NanoDrop)
- Pipet takımı (Gilson)
- PCR cihazı (BioRad)
- Elektroforez sistemi (Labnet)
- Mikrodalga fırın (Philco)
- Güç kaynağı (Apparatus)
- UV transilluminator (Kodak Gel Logic 100 ImagingSystem)

- Isı bloğu (Biosan)

3. 1. 3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Agaroz (invitrogen MBG)
- Amonyum asetat (Sigma A-8920)
- Amonyum klorür (Sigma A-5666)
- Borik asit (Sigma B-6768)
- Bromfenolblue (Sigma B-6896)
- DNA marker (Fermentas)
- EDTA (Merck K-90602121)
- Etanol (%99 Merck)
- EtidyumBromid (Sigma E-8751)
- Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114)
- İzopropanol
- Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552)
- Potasyum hidroksit (Sigma P 1767)
- Primerler (invitrogen)
- Proteinaz K (invitrogen)
- Sodyum dodesil (lauryl) sülfat (Sigma L-5750)
- Sodyum hidroksit (Merck C754962)
- Sodyum klorür (Carlo Erba 368257)
- Trizmabaz (Sigma T-1503)
- Taqpolimeraz (Intron)
- 100bp marker (Intron)

3. 1. 4. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3. 1. 4. 1. Eritrosit parçalama tamponu (*Lysis Buffer*)

8.7 gram amonyum klorür (NH₄Cl), 1 gram potasyum bikarbonat (KHCO₃), 200 µ 10.5 M etilen diaminetetra asetat (EDTA)'ın miktarları ayarlandı ve erlen içerisine

900 mililitre distile su eklenerek çözeltinin pH'sı 1N sodyum hidroksit (NaOH) ile 7.4'e ayarlandı. Ardından erlene aktarılarak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanan çözelti, +4°C' de muhafaza edildi.

3. 1. 4. 2. 0.5 M Disodyumetilendiaminteraasetat (EDTA) (ph8.0)

186 gram EDTA tartıldı, behere aktarıldı ve 800 ml distile su ilave edildi. Manyetik karıştırıcı ile çözündürülerek, pH'sı NaOH çözeltisi ile 8.0'e ayarlandı ve distile suyla 1 litre olacak şekilde tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlandı ve sterilize edildi.

3. 1. 4. 3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl)

233 gram NaCl tartılıp, erlene alındıktan sonra üzerine 800 mililitre distile su eklendi ve manyetik karıştırıcı ile çözünmesi sağlandı. Hacmi 1 litreye tamamlanarak, 120°C'de 15 dakika otoklavlandı ve sterilize edildi.

3. 1. 4. 4. Lökositleri parçalama tamponu (WBL)

25 mililitre 4 M NaCl ve 50 mililitre 0.5 M EDTA beher içerisinde 1 litre olacak şekilde ayarlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanıp sterilize edilerek, oda ısısında muhafaza edildi.

3.1.4.5. 1 m Tris tamponu

121 gram miktarında tartılıp behere alınan Tris baz içerisine 42µlHCl ve 800 mililitre kadar distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcı aracılığıyla çözünmesi sağlandı. Sonrasında erlene aktarılıp 1 litreye tamamlanarak 120°C'de 15 dakika otoklavlanıp, sterilize edildi.

3.1.4.6. 9.5 m Amonyum asetat

73 gram amonyum asetat tartılıp behere alındı. İçerisine 80 mililitre distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. Ardından distile su ile 100 mililitreye tamamlanıp, sterilize edildikten sonra +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.4.7. %10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS)

10 gram SDS tartılıp beher içine alındıktan sonra içerisine 80 mililitre distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı aracılığıyla çözünmesi sağlanıp, pH'sı7.2'ye ayarlandı. Sterilize edilerek ve oda ısısında muhafaza edildi.

3.1.4.8. Proteinaz K (20 mg/ml)

20 miligram Proteinaz K tartılıp steril tüp içerisinde steril distile su kullanılarak hacmi 1 mililitreye tamamlandıktan sonra -20 °C'de muhafaza edildi.

3.1.5. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

3.1.5.1. Agaroz jel yükleme tamponu (5x)

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0.2 mililitre 0.5 M , EDTA, 1 mililitre 1M Tris (pH 8.0), 200 miligram Brom fenol blue, 200 miligram xylene cyanol tartıldıktan sonra steril distile su kullanılarak hacmi 100 mililitreye tamamlanıp, oda ısısında muhafaza edildi.

3.1.5.2. Etidyum bromür (10 mg/ml)

1 gram Etidyum bromür tartılıp steril distile su kullanılarak hacmi 10 mililitreye tamamlandı.

3.1.5.3. 5x Tris-borik asit-edta (TBE)

54 gram Trisbaz ve 27,5 gram borik asit tartılarak behere alındı. İçerisine 20 mililitre 0.5 M EDTA (pH 8.0) ve 800 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcı kullanılarak çözünmesi sağlandı. Hacmi 1 litreye tamamlandıktan sonra 120°C'de 15 dakika otoklavlanıp sterilize edilerek oda ısısında muhafaza edildi.

3.2. Çalışmamızda Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri

Çalışmaya dahil olan bireylerden izin alınarak EDTA'lı ve kuru tüp içerisine 10 ml'lik kan örnekleri alınmıştır. Periferik kanlar EDTA'lı tüplere alındıktan sonra numaralandırılarak, listelenmiştir. Ardından DNA izolasyonu yapıp, DNA'nın saflığı belirlenerek DNA konsantrasyonları bulunmuştur. İzole olan DNA örneklerinden GPX genlerindeki polimorfizmleri belirleyebilmek için, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılıp, kısıtlama parçası uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile varyasyon tespit edilmiştir. Kuru tüplerin içerisindeki kan örneklerinden santrifüjleme yöntemi kullanılarak serum elde edilip -40 °C'de muhafaza edilmiştir. Olgulara ait genotip ve allel dağılımlarının saptanması ve biyokimyasal parametrelere ait istatistiksel analizler yapılmıştır. Elde edilen verilerin hastalık gelişimi açısından risk olup olmadıkları belirlenmeye çalışılmıştır.

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Steril EDTA'lı tüplere 10 ml periferik kan örneği alındı. Falcon tüpe konulup 1:3 oranında (30 ml) eritrosit parçalama çözeltisi ile muamele edilip, karıştırıldıktan sonra +4 °C'de 15 dakika bekletildi. +4 °C'den alınan örnekler süpernatant kısımlarının atılması için 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve pelletler tam olarak süspanse edildikten sonra bir kere daha 15-20 ml eritrosit parçalama çözeltisi ilave edildi. +4 °C'de 15 dakika muhafaza edilen örnekler, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atıldı ve süspanse edildi. Pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS, 75 µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9.4 ml lökosit parçalama çözeltisi (WBL) ilave edildi. İyi karıştırılarak 56 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüp içerisine 1 ml örnek için 0.37 ml ayarlayarak 9.5 M amonyum asetat çözeltisi ilave edildi. Tüp güzelce karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmesi sonucu proteinlerin çökmesi sağlandı. Karışım santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı steril ependorf tüpe alındı ve 2 katı miktarda %99'luk saf alkol ilave edilerek, DNA'nın yoğunlaşması gözlemlendi. Yoğunlaşan DNA alkol yüzeyine çıktı ve mikro pipet ucuyla ependorf tüpe aktarıldı. DNA %70'lik alkol ile yıkandıktan sonra Tris-EDTA çözeltisinde çözündürülüp +4 °C'de muhafaza edildi.

3.2.2. DNA Konsantrasyonu (OD260 X 50µg/ml) ve Saflığının Ölçülmesi

UV spektrofotometresi ile belirlenebilmektedir. 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki ölçümler ile DNA'nın saflık derecesi ve konsantrasyonu ölçüldü. 260 nm'deki ölçümde çift iplikçikli DNA için absorbans karşılığı 50 µg / ml'dir ve 1 optik dansite (OD) değerindedir. (Sambrook, Fritsch, ve Maniatis. 1989)

DNA örneklerinin saflığı OD260 / OD280 formülü ile hesaplandı. Saf DNA için kabul edilen absorbans oranı OD260 / OD280; 1.8'dir. Absorbansın 1.8'e yakınlığı arttıkça DNA'nın verimi yükselir. Mevcut olan fenol veya protein kontaminasyonu; değer 1.8'den küçük olmasına neden olacaktır. Değer 2'den büyük ise ribo nükleik asit RNA kontaminasyonu söz konusudur.

3.2.3. GPX Gen Polimorfizmlerinin PCR-RFLP Yöntemi ile Saptanması

Çalışmada GPX gen bölgesi için kullanılan spesifik primerlerin dizisi aşağıdaki gibidir. Uluslararası kaynaklarda onaylanmış primer dizileridir.

GPX ileri Primer: 5' AAGGTGTTCCCTCCCTCGTAGGT'3

GPX Geri Primer: 5' CTACGCAGGTACAGCCGCCGCT'3

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PCR'nin Hazırlanışı

DNA örneklerinde GPX geni 252bp'lik gen bölgesinin PCR yöntemi ile çoğaltılması sağlandı. Reaksiyon hacmi 25 µl ayarlanacak şekilde, tablo 3.1'de verilen oranlarda sırasıyla 0.2 ml'lik steril tüpe bileşenler ilave edildi. Olası pipetleme hataları düşünülerek çalışılacak örnek sayısından iki tane fazlası olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı. Bileşenlerin iyice karışması için tüpe vorteks ve spin uygulandı.

Tablo 3.1. PCR Karışımının Hazırlanması

MALZEMELER	KULLANILAN HACİM
dH ₂ O	16,7 µl
10x buffer	2,6 µl
MgCl	1,7 µl
Dntp	1,5 µl
GPx Primer	1,5 µl
Taq i-star	0,1 µl
DNA	1 µl

Üzerlerinde örnek kodu yazılan 0.2 ml'lik PCR tüplerine 24 µl olacak şekilde karışım dağıtıldı. Daha sonra sırasıyla her tüpe 1 µl genomik DNA eklenerek pipetleme yapıldı ve tüpler teker teker vorteks ile karıştırılarak, karışımın tüpün dibinde olması sağlandı. Öncesinde 95°C sıcaklığa ayarlanmış PCR cihazına örnekler yerleştirildi ve PCR işlemi başlatıldı.

Tablo 3.2. GPX geni PCR Çoğalma Koşulları

°C	Süre
95	5 dk
94	45 sn
61	45 sn
72	45 sn
72	5 dk
4	∞

3.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Kontrolü

3.4.1. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması:

- 5 gr agaroz hassas terazide tartılarak erlen içerisine alındı ve hacmi 200 ml'ye ayarlanacak şekilde 1X TBE tamponu eklendi. Mikrodalga fırında yaklaşık 2 dakika ısıtılarak jel eritildi.
- Ilık hale gelen jel içerisine 4,5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklendi ve karıştırıldı.
- Jel hazırlandıktan sonra elektroforez kabına döküldü ve tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı.
- Donan jelden tarak çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi.

3.4.2. PCR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi ve Kontrolü

- Jeli 2-3 ml aşacak şekilde 1X TBE tamponu jel üzerine ilave edildi.
- PCR ürününe, 10 µl yükleme tamponu eklendikten sonra pipetleme işlemi uygulanarak karışması sağlandı. 7µl'lik örnek ve 1 µl boya karışımı kuyulara yüklendi. Marker tüplerine 3,5 µl kadar da marker konuldu. Yükleme sonrası tankın kapağı kapatılarak 170 volt 500 miliamper akımda 30 dakika jel yürümeye bırakıldı. Elektroforez işlemi sonrası UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) jelin fotoğrafı çekilerek PCR ürünleri incelendi.

3.5. GPX Geni PCR Ürününde Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Yönteminin Uygulanması

ApaI enzimi 10X Buffer Tango ile beraber GPX -198 C/T gen polimorfizminin saptanması amacıyla kullanıldı. ApaI enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:

5'...GGGCC▼C...3'

3'...C▲CCGGG...5'

Şekil 3.1. ApaI Restriksiyon Enzimine
ait Kesim Tanıma Bölgesi

Primerle çoğaltılan genin PCR ürünlerinin ApaI enzimi ile kesimi gerçekleştirildi. Kesim aşaması için enzimin optimum sıcaklığı olan 37 °C'de 16 saat beklenmiştir.

Tablo 3.3. ApaI Enzimi Kesim Protokolü

Kimyasallar	Kullanılan Hacim
Per ürünü	8,5 µl
dH ₂ O	4,5 µl
10XBuffer	1,5 µl
Kesim Enzimi (ApaI)	0,5 µl

3.5.1. Enzim Kesim Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Kontrolü

%2'lik agaroz jel hazırlandıktan sonra kesim ürünlerinden 7 µl ve yükleme tamponundan 1 µl alınıp karıştırılarak %2'lik agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Kesim ürünleri 50 bç'lik DNA moleküler markerla beraber yürütüldü. Yürütme aşamasından sonra jel üzerindeki bantlar, UV ışık altında incelendi.

3.5.2. ApaI Enzim Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Gözlemlenecek olan PCR bant büyüklüğü 192 bp olacaktır. ApaI enzimiyle kesim sonrasında yalnızca 192 bç'lik bant gözlemlendiğinde TT (homozigot mutant genotip), 192, 122 ve 70 bç'lik bantlar gözlemlendiğinde CT (heterozigot mutant genotip), 122 ve 70 bç'lik bantlar gözlemlendiğinde ise CC (homozigot doğal genotip) olarak değerlendirildi.

PCR kesim bantlarına ait genotipler ve bant büyüklükleri Tablo3.4.'te belirtildiği gibidir.

Tablo 3.4. *GPX* genine ait DNA parçalarının kesim bantlarına ait genotipleri

Kesim Enzimi	Bantlar	Genotip
ApaI	192 bp	TT
	192, 122, 70	CT
	122, 70	CC

3.6. Selenyum Ölçümünde Kullanılan Yöntem

Selenyum tayini için atomik absorpsiyon spektroskopisi yöntemi kullanıldı. Öncelikle hasta ve kontrol gurubundan alınan kanlar 3000rpm'de 5 dk santrifüj edilip serumlarına ayrılarak, çalışma boyunca -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

Selenyum miktar tayininde Thermo Scientific Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi ve ölçümü yapılacak elemente uygun "Se" lambası kullanıldı. Kalibrasyon değerlendirmesinde bakır standardı referans kabul edildi. 3,5 mg/L (ppm) bakır standardı 0,4 A vermektedir.

Cihaz çalışma prensibi olarak, temel seviyedeki elementlerin UV-görünür kısımdaki monokromatik ışınları Lambert-Beer yasasına göre absorblasına dayanmaktadır. AAS'de, örnek sulu ortamda çözüldükten sonra, bu sıvının aerosola dönüştürüleceği havalı bir nebulazör aracılığıyla aleve püskürtülüp, kaynaktan gelen ışın demetinin etkisine bırakılır. Işığı absorplayan atomlarda temel seviyedeki elektronlar, kararsız uyarılmış enerji seviyelerine geçerler ve absorpsiyon miktarı, temel düzeydeki atom sayısına bağlı olarak değişmektedir.

3.6.1. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemi

3.6.1.1. Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi Yöntemi

Atomik absorpsiyon spektrometrisi(AAS), eser miktardaki elementlerin kantitatif analizinde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Işık enerjisinin atomlar tarafından absorplanmasını inceler. Spektroskopi; atomlar, moleküller veya diğer kimyasal maddeler tarafından absorplanmış, dağıtılmış (saçılmış) ve dışarıya yayılmış elektromagnetik radyasyonun (ışınım) ölçümü ve yorumlanmasıdır.

AAS cihazı iki farklı teknik ve üç farklı modda çalışabilir. En basit teknik alevli atomik absorpsiyondur. Ppm (milyonda bir) seviyelerinde analiz imkanı vardır. Grafit fırınlı AAS (GFAAS) diğer modudur. Düşük ppb (milyarda bir) seviyelerinde analizlere yöneliktir. Diğer, hidrür tekniğinin kullanıldığı Hidrür oluşumlu AAS (Hydritegeneration AAS) cihazıdır. Yalnızca uçucu ve hidrür oluşturabilen elementlerin analizinde kullanılabilir ve düşük ppb analizleri için uygundur. Alevli ve grafit fırınlı AAS de numunenin atomize edildiği bölüm farklıdır.

Sistemin prensibi, metale özgü oyut katot lambasından üretilen ışığın, atomize edilmiş numune tarafından absorplanması ve sayıca azalmış ışık demetinin dedektöre ulaştırılarak aralarındaki oranın yazılım sayesinde yapılan hesaplama ile sayısal değere dönüşmesidir. Beer-lambert yasası cihazın çalışma prensibini belirler.

Atomik absorpsiyon spektrofotometreleri; Analiz elementinin absorplayacağı dalga boyunda ışına yapan bir ışın kaynağı, örnek çözeltisi içindeki analiz elementini atomlarına ayıran bir atomlaştırıcı, çalışılan dalga boyunu diğer dalga boylarından ayıran bir monokromatör, ışın şiddetinin ölçüldüğü dedektör kısımlarından oluşur.

Atomik absorpsiyon spektrofotometresinde tayin edilen elementlerin absorpsiyon hat genişliğinden daha dar emisyon spektrumu veren ışın kaynakları kullanılmalıdır. Aksi halde hassasiyeti düşüren düşük absorbans değerleri elde edilir.

Bir atomlaştırıcının (absorpsiyon hücresinin) en önemli görevi, bir örnekte termal seviyede bulunan iyon ve moleküllerden analiz edilecek elementin atomlarını

oluşturmaktır. Işın kaynağından gelen emisyon atomlaştırıcıdan geçirildiğinde bir kısmı termal ayrışma sonucu oluşturulan atomlar tarafından absorblanır. Bu nedenle AAS'de bir analizin başarısı, atomlaşmanın etkinliğine bağlıdır. Atomlaştırıcılar genel olarak; alevli, elektrotermal, hidrür, soğuk buhar olmak üzere dörde ayrılır (Welz, 1999).

Monokromatörün esas görevi tayin elementinin rezonans hattını, oyuk katot lambasının yaydığı diğer hatlardan ayırmaktır. Monokromatörler, giriş ve çıkış olarak iki yarık, dalga boyuna ayırma bileşeni ve yardımcı optik bileşenlerden oluşur. Giriş ve çıkış yarıkları, ışın kaynağından çıkarak monokromatöre giren ve dedektör üzerine düşen ışın oranını kontrol eder. Geniş giriş yarığı kullanılabildiğinde ışın enerjisinin daha büyük miktarı dedektöre ulaşır. Bu durumda gürültü, sinyale oranla küçüldüğünden sinyal kararlıdır, kesindir ve düşük derişimler ölçülebilir (Welz vd., 1985).

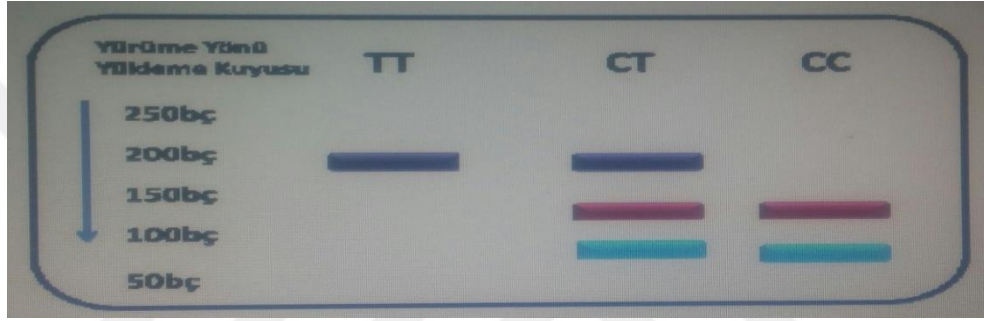
Dedektörler ışın kaynağından gelen ışının şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan bileşenlerdir. Işığı elektrik sinyaline dönüştürürler. Bir dedektörün, ışığa karşı duyarlı olması, ışın şiddeti ile doğru orantılı bir sinyal üretmesi, üzerine düşen ışığa cevap verme yani sinyal üretme süresinin kısa olması, kararlı olması ve üretilen elektriksel sinyalin yardımcı devrelerle çoğaltılabilmesi gibi özelliklere sahip olması istenir (Murat vd., 2006).

Hazırlanan standartlar insan serumu içindeki minimum ve maximum miktarları içine alacak şekilde hazırlanır. Standart çözeltiden faydalanarak çizilen standart eğrisinden örneğin absorbans değeri için gözlenen değer okunarak konsantrasyon bulunur.

4. BULGULAR

4.1. GPX1 - 198 C/T Polimorfizmi PCR Ürünlerine Ait Bulgular

PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra incelendi. Agaroz jelde GPX1 gen varyasyonunun belirlenmesi için 192 bç'lik spesifik PCR ürününe ait bantlar oluştuğu gözlemlendi ve PCR ürünleri Apa-I enzimi kullanılarak kesim işlemi yapıldı.



Şekil 4.1. RFLP sonrası GPX-1 genine ait DNA parçalarının agaroz jeldeki görüntü şeması (MBI Fermentas 100 bç DNA marker)

4.2. RFLP Yöntemi ApaI Enzim Kesimi ile GPX-1 Kesim Bantlarına Ait Bulgular

1. kuyu 192 bç homozigot mutant genotip (TT); 2. ve 3. kuyu 192, 122 ve 70 bç heterozigot mutant (CT) ; 4. kuyu 122 ve 70 bç homozigot normal genotip (CC).
(Marker : 100bç marker)



Şekil 4.2. ApaI enzim kesimi sonucunda ürünlerin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü

4.3. İstatistiksel Analiz Sonrasında Elde Edilen Bulgular

Çalışmamıza dahil edilen kolon kanserli hasta ve kontrol grubuna ait özellikler Tablo 4.1.'de verilmiştir. Buna göre hasta ile kontrol grubu arasında yaş ve cinsiyet parametreleri açısından istatistiksel anlamlılık mevcut değildir. Yaş parametresine göre yapılan değerlendirme sonucunda kontrol grubunun yaş ortalaması $57,34 \pm 12,71$ hasta grubunun yaş ortalaması $61,66 \pm 13,73$ şeklinde bulunmuştur.

Kolon kanserli hastaların serum selenyum düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; kolon kanserli hastalarda serum Se düzeyleri ($73,50 \pm 17,61$) kontrol grubuna göre ($58,45 \pm 19,36$) daha yüksek oranda tespit edilmiş olup, aradaki fark ileri düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$).

GPX gen polimorfizminde, kolon kanserli hastalarda anjiyolenfatik invazyon varlığında hastaların (%12,1) TT genotipi taşıdığı gözlenirken, anjiyolenfatik invazyon görülmeyen hastaların hiçbirinde TT genotipine rastlanmamıştır. Aradaki fark ileri düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,016$).

Müsinöz komponent varlığında, CC genotip taşıma frekansı hastalarda (%43,8) olarak tespit edilirken, müsinöz komponent yokluğunda bu değer (%20,3) olup, yaklaşık 2 kat daha düşük bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,0048$, OR:2,158, %95CI:1,055-4,417).

GPX gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde CC, TT, CT genotip frekansları hasta grubunda sırasıyla %24,4, %4,4, %71,1 ve kontrol grubunda %21,2, %30,3, %48,5, olarak gözlenmiş olup genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve kolon kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlık saptanmıştır ($p < 0,001$).

Tablo 4.1. Kontrol ve Kolorektal Kanserli Hastaların Özellikleri

Bireylerin Sayısı		Hasta n (%)	Kontrol n (%)
		90	99
SelenyumSeviyeleri mean \pm (SD)		73,50 \pm 17,61	58,45 \pm 19,36
Yaş mean \pm (SD)		61,66 \pm 13,73	57,34 \pm 12,71
Cinsiyer	Erkek	54 (60)	49 (49,5)
	Kadın	36 (40)	50 (50,5)
Tümör Lokalizasyonu ^a			
Sol Kolon		10 (11,1)	-
Sağ Kolon		11 (12,2)	-
Transvers(enine) Kolon		3 (3,3)	-
Sigmoid Kolon		39 (43,3)	-
Çekum		8 (8,9)	-
Rektum		19 (21,1)	-
Tümör Evresi			
I		8 (8,9)	-
II		15 (16,7)	-
III		52 (57,8)	-
IV		15 (16,7)	-
Lenf Nodu Durumu			
N0		41 (45,6)	-
N1		28 (31,1)	-
N2		15 (16,7)	-
N3		6 (6,7)	-
Uzak Metastaz			
Var		23 (25,6)	-
Yok		67 (74,4)	-
Anjiolenfatik İstila			
Var		33 (36,7)	-
Yok		57 (63,3)	-
Perinöral İstila			
Var		31 (34,4)	-
Yok		59 (65,6)	-
MüsinözKomponent ^a			
Olumlu		16 (17,8)	-
Olumsuz		74 (82,2)	-

Tablo 4.2. CRC hastalarında (n = 90) ve kontrollerde (n = 99) GPX polimorfizminin genotip ve allel sıklıkları

PD-1.5 (C/T) Genotipler ve Alleller	Kolon Kanseri Hasta n (%)	Kontrol n (%)	P
Genotip Sıklığı			
CC (%)	22 (24,4)	21 (21,2)	<0,001
TT (%)	4 (4,4)	30 (30,3)	
CT (%)	64 (71,1)	48 (48,5)	
Allel Sıklığı			
CC+CT (%)	86 (95,6)	69 (69,7)	<0,001
TT (%)	4 (4,4)	30 (30,3)	
Allel Sıklığı			
CC +TT (%)	26 (28,9)	51 (51,5)	=0,002
CT (%)	64 (71,1)	48 (48,5)	
Allel Sıklığı			
C (%)	108 (60)	90 (45,5)	=0,005
T (%)	72 (40)	108 (54,5)	

GPX gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde C allel frekansının kolon kanserli hastalarda (%60) kontrol grubuna göre (%45,5) yüksek olduğu, T allel frekansının ise hasta grubunda (%40) kontrol grubuna (%54,5) göre düşük olduğu gözlenmiş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir (p= 0.005) (Tablo 4.2).

Hasta grubumuzda C alleli taşıma durumu (CC+CT) (%95,6) olarak kontrol grubuna göre (%69,7) daha yüksek bulunmuş ve aradaki fark istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlılığa ulaşmıştır (p<0,001, OR:1,371, %95CI:1,195-1,573). C alleleline sahip olmanın yaklaşık 1,371 kat hastalık riskini artırdığı tespit edilmiştir.

Tablo 4.3. GPX genotiplerinin dağılımı, klinikopatolojik parametrelerin karşılaştırılması

Parametreler	GPX Genotipi		
	CC n (%)	TT n (%)	CT n (%)
Cinsiyet			
Kadın	12 (33,3)	1 (2,8)	23 (63,9)
Erkek	10 (18,5)	3 (5,6)	41 (75,9)
Tümör Evresi			
III/IV	16 (23,9)	3 (4,5)	48 (71,6)
I/II	6 (26,1)	1 (4,3)	16 (69,6)
Lenf Nodu Durumu			
N+	14 (29,2)	1 (2,1)	33 (68,8)
N-	8 (19)	3 (7,1)	31 (73,8)
Metastaz			
Var	7 (30,4)	0 (0)	16 (69,6)
Yok	15 (22,4)	4 (6)	48 (71,6)
Anjiolenfatik İstila			
Var	8 (24,2)	4 (12,1)	21 (63,6)
Yok	14 (24,6)	0 (0)	43 (75,4)
Perinöral İstila			
Var	10 (32,3)	2 (6,5)	19 (61,3)
Yok	12 (20,3)	2 (3,4)	45 (76,3)
MüsinözKomponent			
Olumlu	7 (43,8)	0 (0)	9 (56,2)
Olumsuz	15 (20,3)	4 (5,4)	55 (74,3)

Tablo 4.4. *Selenyum seviyeleri, klinikopatolojik parametrelerin karşılaştırılması*

	Selenyum Düzeyi (nmol/ml) mean ± (SD)
Cinsiyet	
Kadın	70,02 ± 17,76
Erkek	77,61 ± 17,33
Tümör Evresi	
III/IV	70,96 ± 16,94
I/II	81,11 ± 18,92
Lenf Nodu Durumu	
N+	69,37 ± 19,53
N-	77,62 ± 15,16
Metastaz	
Var	68,54 ± 20,26
Yok	77,69 ± 14,51
Perinöral İstila	
Var	65,47 ± 18,34
Yok	76,17 ± 17,04
Anjiolenfatik İstila	
Var	72,49 ± 11,61
Yok	73,70 ± 18,81
Müsinöz Komponent	
Olumlu	76,78 ± 14,76
Olumsuz	70,21 ± 20,17

CT genotini taşıma durumu hasta grubunda (%71,1) olarak bulunurken kontrol grubunda ise (%48,5) olarak daha düşük bulunmuştur ve istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlık saptanmıştır ($p=0,002$, OR:1,467, %95CI:1,151-1,868). CT genotipine sahip olmanın yaklaşık 1,467 kat hastalık riskini artırdığı tespit edilmiştir.

Gerek kolon kanserli hasta grubu gerekse kontrol grubunda, grup içi ve gruplar arası bireylerin taşıdıkları genotipler ile selenyum serum düzeyleri değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.



5. TARTIŞMA

Kanser insan sağlığı için bir endişe kaynağıdır. CRC, dünya çapında en sık teşhis edilen kanserlerden biridir ve kanser mortalitesinin ana nedenidir (Kumarasamy vd., 2017). Genetik ve çevresel risk faktörlerinin bir sonucu olarak gelişen karmaşık bir hastalıktır. CRC' nin birçok belirlenmiş çevresel risk faktörü vardır (Peters vd., 2015).

Oksijen hayat için gerekli olan bir elementtir ancak ROS ve serbest radikaller gibi, oksijen metabolizmasının yan ürünleri canlı organizmalar için toksiktir(Abele., 2002). ROS üretimi kendi kullanım kapasitelerini aştığında, bu; nükleik asitlerin, proteinlerin ve lipidlerin hasar görmesine ve hücre, doku veya organ fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır (Jablonska vd., 2009).

ROS ayrıca hücre büyümesi ve ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı için, yüksek GPX aktivitesi de prokarsinojeniktir(Hockenbery vd., 1993).

Oksidatif stres, kolonda kanserojeniz sürecinde rol oynayan faktörler arasında hayati öneme sahiptir. Oksidatif durumun artması, kanser hücrelerinde antioksidan savunmaya neden olur ve saldırganlıklarını artırır (Kanbagli vd., 2000)(Barrett vd., 2013).

Oksidatif stresin endikasyonlarından biri lipidperoksidasyondur; fosfolipidleri oluşturan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif reaksiyona girerek peroksitlerinin oluşumuna neden olduğu bir süreçtir. Aldehitler ve alkoller gibi lipidhidroksilasyonun son ürünleri, protein sentezini bozmakta ve membran geçirgenliği, immünolojik tepki üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmaktadır (Klaunig vd., 2004).

Karsinogenez ve tümör gelişimi ile ilişkili olan serbest radikallerin oluşturduğu hasarların ortadan kaldırılması açısından antioksidan mekanizmaların bilinmesi önemlidir. GPX, hücreleri reaktif oksijen türlerine karşı koruyan, hidrojen ve lipid

peroksitleri her yerde ifade eden ve detoksifiye eden hücre içi selenyum-bağımlı bir antioksidan enzimdir. Aktivitesi, enzimin aktif merkezinde bulunan Se konsantrasyonuna bağlıdır. GPX enzimini kodlayan genlerdeki genetik varyasyonlar enzimlerin aktivitelerinde azalmaya ve ROS detoksifikasyonunda değişimlere neden olabilmektedir.

Klasik hücrel GPX, cGPX, plazma GPX, pGPX ve gastrointestinal GPX, GI-GPX, H₂O₂ ve organik hidroperoksitleri detoksifiye eder. Fosfolipid hidroperoksit, kolesterol hidroperoksit ve linoleik asit hidroperoksitin azaltılması fosfolipid hidroperoksit GPX (Ravn-Haren vd. 2006) ile katalize edilir. Buna ek olarak, SeP fosfolipid hidroperoksiti, fosfolipid hidroperoksit GPX' den daha az etkili olsa da, azaltabilir (Raaschou-Nielsen vd., 2007).

Selenoprotein genlerinde [(GPx1, GPX4, 15 kDa selenoprotein (SEP15), SELS, SEPP1 ve tioredoksin redüktaz 2 (TXNRD2)] 12 SNP'nin analiz edildiği çalışmanın sonuçları; SEPP1, GPX4 ve SELS'deki SNP' lerin CRC riskini etkilediğini göstermektedir (Meplan vd., 2010).

Adenokarsinomlu 166 vaka, adenomlu 974 ve Norveç kohortu NORCCAP (The Norwegian Colorectal Cancer Prevention)'tan 397 kontrolle çalışılan araştırmada GPX Pro198Leu polimorfizmi ile kolorektal adenom veya karsinom arasında ilişki bulunamamıştır (Hansen vd., 2005).

Elmas ve Ratnasinghe ve diğerleri farklı bir polimorfizm çalışmış insan GPX1 geni, Pro198Leu ve daha düşük GPX aktivitesine sahip l0sin allelinin meme ve akciğer kanseri ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (Ratnasinghe vd., 2000)(Hu vd., 2003).

GPX'in aşırı ekspresyonu, tümör hücrelerinin daha hızlı büyümesi ile sonuçlandığı ileri sürülmüştür (Zhang vd., 2002). İnsan GPX1'inin tek başına veya insan SOD1 ile birlikte aşırı ekspresyonu farelerde kanser riskini artırmıştır (Li vd., 2000)(Lu vd., 1997).

Bu örnekler, GPX1'in aşırı ekspresyonunun apoptozu önleyebileceğini ve oksidatif hasara yol açan hücrelerin çoğalmasını sağlayabildiğini göstermektedir. GPX1 geni

insan osteojenik sarkom hücrelerinde ve kolon kanseri hücrelerinde p53 tümör baskılayıcısı tarafından indüklenmektedir; p53, G1 aşamasında hücre durmasını veya apoptozu uyararak ve böylece tümör hücresi büyümesini inhibe ederek genomun koruyucusu olarak bilinmektedir (Gladyshev vd., 1998)(Tan vd., 1999).

Tüm olgular göz önüne alındığında, normal hücrelerde GPX1 aktivitesinde bir artış antioksidan ve anti-inflamatuar aktiviteye sahip olabilir. Bununla birlikte, hücreler prekanseröz bir duruma dönüştürüldüğünde, artan GPX1 aktivitesi, oksidan aracılı hücre ölümünü önleyebilir ve prokarsinojenik hale gelebilir (Chu vd., 2004).

Rotruck ve Flohe tarafından yapılan çalışmalar, enzimin bir selenoprotein olduğunu ve her biri bir atom Se içeren dört adet 22 kDa alt birimden oluştuğunu ortaya koymuştur (Flohe vd., 1973). Tüm memelilerde olduğu gibi, Se, GPX1 yapısında TGA sonlandırma kodonu tarafından kodlanan bir amino asit olan Sec şeklinde bulunur. Sec, enzimin aktif bir bölgesidir ve Se eksik diyet, GPx1 aktivitesinde bir azalmaya neden olur (Lei vd., 2007)(Jablonska vd., 2009).

GPX1 aktivitesi ve selenyum bağlayıcı protein (SBP1) konsantrasyonları arasında bir ilişki vardır. SBP1, GPX1' in aktivitesini azaltır. Sırasıyla, GPX1, SBP1 ekspresyonunu transkripsiyon seviyesinde ve ayrıca epigenetik modifikasyonlarla inhibe etmektedir (Zmorzyński vd., 2015).

Hepatoselüler karsinomali hastalarda düşük SBP1 düzeyleri yüksek GPx1 aktivitesi, metastaz ve daha kısa sağ kalım süresi ile ilişkilidir. Prostat kanseri olan hastalarda da benzer gözlemler görülmüştür.

Çalışmalar düşük Se durumunun artmış CRC riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Selenoprotein genlerindeki genetik varyasyonlar CRC'ye duyarlılığı etkileyebilmektedir (Meplan vd., 2010).

Bununla birlikte, özellikle de adenomdan kansere ilerlemenin değişmiş Se alımından etkilenip etkilenmediği ile ilgili olarak, CRC'ye duyarlılığı modüle etmede Se alımı ve genetik arka plan arasındaki etkileşimleri açıklığa kavuşturmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Varyant allellerin belirli selenoproteinlerin fonksiyonel etkinliđini dūřurdūđu, artmıř CRC riskine katkıda bulunabileceđi, ancak bu etkilerin, selenoprotein sentezi için selenosistein tedarigiinin artmasıyla sonuçlanan artan bir Se alımı ile hafifletilebileceđi varsayılmaktadır.

Bu varyantların CRC riski üzerindeki etkileri goreceli olarak kucktur (en yaygın kanser duyarlılık varyantları ile uyumlu olarak), fakat adenom riski ile ilgili daha önceki çalışmanın sonuçlarından elde edilen uyum ve mevcut CRC riski, selenoprotein varyantlarının kuvvetle muhtemel olduğunu göstermektedir. Düşük Se durumu, hem adenom hem de kanser gelişiminde rol oynamaktadır ve CRC riskinin belirteçlerini temsil etmektedir.

Selenyumun etkilerinin, selenyum içeren proteinlerin bileşeni rolüyle aracılık etmesi muhtemeldir. İnsanlarda, birkaç grup, selenyumun diyet alımı ile akciğer, kolon ve prostat dahil olmak üzere çeşitli bölgelerde kanser insidansı arasında ters bir ilişki olduğunu bildirmiştir.

Yapılan alışmalar selenyumun akciğer, kolon, prostat ve karaciğerde kanser insidansını azaltmada etkili olduğunu göstermiştir (Hu vd., 2005).

Çalışmamızın sonucunda; kolon kanserli hastaların serum selenyum düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; kolon kanserli hastalarda serum selenyum düzeyleri ($73,50 \pm 17,61$) kontrol grubuna göre ($58,45 \pm 19,36$) daha yüksek oranda tespit edilmiş olup, aradaki fark ileri düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$).

GPX gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde CC, TT, CT genotip frekansları hasta grubunda sırasıyla %24,4, %4,4, %71,1 ve kontrol grubunda %21,2, %30,3, %48,5, olarak gözlenmiş olup genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve kolon kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlık saptanmıştır ($p < 0,001$).

CT genotipi taşıma durumu hasta grubunda (%71,1) olarak bulunurken kontrol grubunda ise (%48,5) olarak daha düşük bulunmuştur ve istatistiksel olarak ileri

düzeyde anlamlık saptanmıştır ($p=0,002$, OR:1,467, %95CI:1,151-1,868). CT genotipine sahip olmanın yaklaşık 1,467 kat hastalık riskini artırdığı tespit edilmiştir.



6. SONUÇ

Çalışmamızda kolon kanserli hastalarda GPX enzim polimorfizmi ve selenyum miktarı değerlendirilmiştir. Selenyum durumları kıyaslandığında; kolorektal kanserli bireylerde selenyum miktarının daha yüksek olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bireylerin taşıdıkları genotipler ile selenyum serum düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

GPX gen polimorfizmine bakıldığında; kolon kanserli hastalarda anjiyolenfatik invazyon varlığında TT genotipi gözlemlenirken, anjiyolenfatik invazyon rastlanmayan hastalarda TT genotipi gözlemlenmemiştir. Müsinöz komponent varlığında, CC genotip taşıma frekansı hastalarda, müsinöz komponent olmayanlara oranla 2 kat fazla olarak tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasındaki genotip frekansları değerlendirildiğinde genotip dağılımı yönünden ileri düzeyde anlamlık bulunmuştur. C ve T allel frekansları değerlendirildiğinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel anlamlık gözlemlenmiştir. CT genotipi taşıma durumu hasta grubunda daha yüksek bulunmuş, istatistiksel anlamlık tespit edilmiştir. C alleleline sahip olmanın yaklaşık 1,371 kat, CT genotipine sahip olmanın yaklaşık 1,467 kat hastalık riskini artırdığı tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abele, Doris. (2002). Toxic oxygen: The radical life-giver. *Nature*, 420(6911): 27–27. doi: 10.1038/420027a.
- Adair, L S vd. (2014). The emergence of cardiometabolic disease risk in Chinese children and adults: consequences of changes in diet, physical activity and obesity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 15 S1: 49–59. doi:10.1111/obr.12123.
- Al-Taie, Hatem, O., vd. (2004). Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis. *Nutrition and cancer* 48 (1) 6–14. doi:10.1207/s15327914nc4801_2.
- Alteri, R., vd. (2018) Can Colorectal Cancer Be Prevented?.
<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/causes-risks-prevention/prevention.html#references>. Erişim tarihi: 07/06/2018.
- Arnér, Elias S.J. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases Important selenoproteins with versatile functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790(6): 495–526. doi:10.1016/j.bbagen.2009.01.014.
- Arnold, M., Pandeya, N., Byrnes G., vd. (2015). Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study. *The Lancet Oncology*. 16(1),36–46. doi:10.1016/S1470-2045(14)711234
- Awasthi, Y., Dao D., Lal A., Srivastava S., (1979). Purification and Properties of Glutathione Peroxidase from Human Placenta. *The Biochemical journal*, 177, 471–76. doi:10.1042/BJ1770471
- Barrett, C., Ning W., Chen X. vd. (2013). Tumor suppressor function of the plasma glutathione peroxidase Gpx3 in colitis-associated carcinoma. *Cancer research* 73(3),1245–55. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3150.
- Bellinger, F., Raman, A., Reeves, M., Berry, M. (2009). Regulation and function of selenoproteins in human disease. *The Biochemical journal* 422(1),11–22. doi:10.1042/BJ20090219
- Berardi, R., Maccaroni, E., Mandolesi, A., vd. (2012). Nuclear factor- κ B predicts outcome in locally advanced rectal cancer patients receiving neoadjuvant radio-chemotherapy. *Digestive and liver disease* , 44(7),617–22. doi:10.1016/j.dld.2012.02.006

- Betteridge, D., (2000). What is oxidative stress? *Metabolism: clinical and experimental*, 49(2 Suppl 1), 3–8. doi:10.1016/S0026-0495(00)80077-3.
- Binefa, G., Rodríguez-Moranta, F., Teule, A., Medina-Hayas M. (2014). Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology* 20(22), 6786-6808. doi:10.3748/wjg.v20.i22.6786.
- Borek, C., (2004). Dietary Antioxidants and Human Cancer. *Integrative Cancer Therapies*, 3(4),333–41. doi:10.1177/1534735404270578.
- Bruce, W., Giacca, A., Medline, A., (2000). Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* , 9(12), 1271–79. ISBN:10559965 (ISSN).
- Burk, R., Hill, K., (2005). Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annual review of nutrition* 25(1), 215–35. doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132120.
- Carini, F., Mazzola, M., Rappa, F., vd. (2017). Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants. *Anticancer Research* 37(9), 4759–66.doi:10.21873/anticanres.11882.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, B., vd. (1986). The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the ‘termination’ codon, TGA. *The EMBO journal*, 5(6), 1221–27. doi:10.1002/J.1460-2075.1986.TB04350.X.
- Chandrasena, L., Chackrewarthy, S., Perera, P., De Silva, D. (2006). Erythrocyte antioxidant enzymes in patients with cataract. *Annals of clinical and laboratory science* 36(2), 201–4.
- Chu, F., Doroshov, J., Esworthy, R. (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *The Journal of biological chemistry* 268(4), 2571–76.
- Chu, F., Esworthy R., Chu, P., vd. (2004). Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer research*, 64(3), 962–68. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2272.
- Chu, F., Esworthy, R., Doroshov, J. (2004). Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free radical biology & medicine*, 36(12), 1481–95. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.010.
- Clark, L., Combs, G., Turnbull, B. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA*,

276(24), 1957–63.

- Cohen, G., Hochstein, P. (1963). Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*, 2, 1420–28. doi:10.1021/BI00906A038.
- Dedina, J., Tsalev, D. (1995). *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. Wiley, 130, 526.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3217–66. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.018.
- Diplock, A., vd. (1998). *Healthy lifestyle nutrition*. Life sciences.
- Di Mascio, P., Murphy, M., Sies, H., (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American journal of clinical nutrition*, 53(1 Suppl), 194S–200S. doi:10.1093/ajcn/53.1.194S.
- Dow, L.E., Simon, J., Clevers, H., vd. (2015). APC Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. *Cell*, (161) 1539 - 1552. doi: <http://doi.org/10.16/j.cell.2015.05.033>.
- Ekoue, D., He, C., Diamond, A., Bonini, M. (2017). Manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 contribute to the rise and fall of mitochondrial reactive oxygen species which drive oncogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1858(8), 628–32. doi:10.1016/j.bbabi.2017.01.006.
- Elliott, J. (1999). Application of Antioxidant Vitamins in Foods and Beverages. *Food technology* 53(2), 46–48.
- Eroglu, M., Yılmaz, N., Yalçınkaya, S., vd. (2013). Enhanced HDL-cholesterol-associated anti-oxidant PON-1 activity in prostate cancer patients. *The Kaohsiung journal of medical sciences* 29(7), 368–73. doi:10.1016/j.kjms.2012.11.004.
- Estrela, J., Ortega A., Obrador, E. (2006). Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 43(2), 143–81. doi:10.1080/10408360500523878.
- Fearon, E., Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5): 759–67. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-I.
- Feng, J., Lu, L., Zeng, P., vd. (2012). Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients. *International Journal of Clinical*

Oncology, 17(6), 575–83. doi:10.1007/s10147-011-0327-y.

Fernández-Checa, J., Kaplowitz, N., Colell, A., García-Ruiz, C. (1997). Oxidative stress and alcoholic liver disease. 21(4).

Flohe, L., Günzler, W., Schock, H. (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. FEBS letters, 32(1), 132–34. doi:10.1016/0014-5793(73)80755-0.

Flohé, L., Günzler, W., Eichele, E. (1972). Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 353(6), 987–99.

Flohe, L., (1988). Glutathione peroxidase. Basic Life Sci 49: 663–68.

Forsberg, L., De Faire, U., Morgenstern, R. (2001). Oxidative stress, human genetic variation, and disease. Archives of biochemistry and biophysics, 389(1), 84–93. doi:10.1006/abbi.2001.2295.

Futreal, P., Kasprzyk, A., Birney, E. (2001). Cancer and genomics. Nature, 409(6822), 850–52. doi:10.1038/35057046.

Garcia-Closas, M., Gunsoy, N., Chatterjee, N. (2014). Combined Associations of Genetic and Environmental Risk Factors: Implications for Prevention of Breast Cancer. JNCI Journal of the National Cancer Institute, 106(11). doi:10.1093/jnci/dju305.

Ghadirian, P., Maisonneuve, P., Perret, C., vd. (2000). A case-control study of toenail selenium and cancer of the breast, colon, and prostate. Cancer detection and prevention, 24(4), 305–13.

Gladyshev, V., Factor, M., Housseau, F., Hatfield, D. (1998). Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. Biochemical and biophysical research communications, 251(2), 488–93. doi:10.1006/bbrc.1998.9495.

Goldstein, J., Tran, B., Ensor, J., vd. (2014). Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). Annals of oncology : official journal of the European Society for 4 Medical Oncology, 25(5), 1032–38. doi:10.1093/annonc/mdu100.

Guina, T., Biasi, F., Calfapietra, S., vd. (2015). Inflammatory and redox reactions in colorectal carcinogenesis. Annals of the New York Academy of Sciences, 1340(1), 95–103. doi:10.1111/nyas.12734.

Günzler, W., Steffens, G., Grossmann, A., vd. (1984). The amino-acid sequence of bovine glutathione peroxidase. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische

Chemie, 365(1), 195–212. doi:10.1515/bchm2.1984.365.1.195.

- Hansen, R., Sæbø, M., Skjelbred, C., vd. (2005). GPX Pro198Leu and OGG1 Ser326Cys polymorphisms and risk of development of colorectal adenomas and colorectal cancer. *Cancer Letters*, 229(1), 85–91. doi:10.1016/j.canlet.2005.04.019.
- Hill, M., (1999). Mechanisms of diet and colon carcinogenesis. *European journal of cancer prevention*, 8 Suppl 1, 95-8.
- Hockenbery, D., Oltvai, Z, Yin, X., vd. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75(2), 241–51. doi:10.1016/0092-8674(93)80066-N.
- Holak, W., (1969). Gas-sampling technique for arsenic determination by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, 41(12), 1712–13. doi:10.1021/ac60281a025.
- Hu, Y., Diamond, A., (2003). Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer research*, 63(12), 3347–51.
- Hu, Y., Benya, R., Carroll, R., Diamond, A., (2005). Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium containing protein is a common event in cancer. *The Journal of nutrition*, 135(12 Suppl), 3021S–3024S. doi:135/12/3021S [pii].
- Jablonska, E., Gromadzinska, J., Reszka, E., vd. (2009). Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. *European Journal of Nutrition*, 48(6), 383–86. doi:10.1007/s00394-009-0023-0.
- Jacobs, E., Jiang, R., Alberts, D., vd. (2004). Selenium and colorectal adenoma: results of a pooled analysis. *Journal of The National Cancer Institute*, 96(22), 1669–75. doi:10.1093/jnci/djh310.
- Jayasekara, H., MacInnis, R., Room, R., English, D., (2016). Long-Term Alcohol Consumption and Breast, Upper Aero-Digestive Tract and Colorectal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Alcohol and alcoholism*, 51(3), 315–30. doi:10.1093/alcalc/aggv110.
- Jemal, A., Vineis, P., Bray, F., Torre, L., & Forman, D., (2014). *The Cancer Atlas*. <http://canceratlas.cancer.org/>, Erişim Tarihi: 14/03/2018
- Juhasz, A., Ge, Y., Markel, S., vd. (2009). Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues. *Free Radical Research*, 43(6), 523–32.

doi:10.1080/10715760902918683.

Kanbagli, O., Ozdemirler, G., Bulut, T., vd. (2000). Mitochondrial lipid peroxides and antioxidant enzymes in colorectal adenocarcinoma tissues. *Japanese Journal of Cancer Research*, 91(12), 1258–63.

doi:10.1111/j.1349-7006.2000.tb00912.x.

Karabulut, H., Gülay, M.Ş., (2016). Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50–59.

Karsa, L., Lignini, T., Patnick, J., vd. (2010). The dimensions of the CRC problem. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 24(4), 381–96.

doi:10.1016/j.bpg.2010.06.004.

Kayaalp, Y. (2012). Saroz Körfezi Balık Türlerinde Selenyum Hidrür Oluşturmalı Atomik Absorpsiyon ve Grafit Fırın Atomik Absorpsiyon Spektrometre ile Tayini. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trakya Üniversitesi.

Keskinkılıç, B. (2017). Dünya’da Ölüm Nedenleri. www.thsk.gov.tr. Erişim tarihi: 11/01/2018.

Kim, J., Cha, Y., Surh, Y., (2010). A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 690(1–2), 12–23. doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.09.007.

Klaunig, J., Kamendulis, L., (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44(1), 239–67.

doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851.

Kovacic, P., Jacintho, J., (2001). Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Current medicinal chemistry*, 8(7), 773–96.

doi:10.2174/0929867013373084.

Kramer, H., Goodyear, Y., (2007). Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 103(1), 388–95.

doi:10.1152/jappphysiol.00085.2007.

Kryukov, G., Castellano, S., Novoselov, S., vd. (2003). Characterization of Mammalian Selenoproteomes. *Science*, 300(5624), 1439–43.

doi:10.1126/science.1083516.

Kryukov, G., Kryukov, V., Gladyshev, V., (1999). New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *The Journal Of Biological Chemistry*, 274(48), 33888–97. doi: 10.1074/jbc.274.48.33888.

- Kumarasamy, V., Kuppusamy, U., Jayalakshmi, P., vd. (2017). Exacerbation of colon carcinogenesis by *Blastocystis* sp. *Plos One*, 12(8), e0183097. doi:10.1371/journal.pone.0183097.
- Lachance, P., Nakat, Z., Jeong, W., (2001). Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition*, 17(10), 835–38. doi:10.1016/S0899-9007(01)00636-0.
- Lamprecht, S., Lipkin, M., (2003). Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3(8),601–14. doi:10.1038/nrc1144.
- Lanfeer, J., Fleming J., Wu, L., (1994). The selenium metabolite selenodiglutathione induces p53 and apoptosis: relevance to the chemopreventive effects of selenium? *Carcinogenesis*, 15(7), 1387–92. doi:10.1093/carcin/15.7.1387.
- Larson, R., (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27(4), 969–78. doi:10.1016/0031-9422(88)80254-1.
- Lei, X., Cheng, W., McClung, J., (2007). Metabolic Regulation and Function of Glutathione Peroxidase-1. *Annual Review of Nutrition*, 27(1), 41–61. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093716.
- Li, S., Yan, T., Yang, J., vd. (2000). The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Research*, 60(14), 3927–39.
- Little, C., O'Brien, P., (1968). An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 31(2), 145–50. doi:10.1016/0006-291X(68)90721-3.
- Lu, Y., Lou, Y., Yen, P., vd. (1997). Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase. *Cancer Research*, 57(8), 1468–74.
- Mäbert, K., Cojoc, M., Peithzch, C., vd. (2014). Cancer biomarker discovery: Current status and future perspectives. *International Journal of Radiation Biology*, 90(8), 659–77. doi:10.3109/09553002.2014.892229.
- Maiorino, M., Chu, F., Ursini, F., vd. (1991). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *The Journal Of Biological Chemistry*, 266(12), 7728–32.
- Mármol, I., Diego, S., Dieste, P., vd. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal Of Molecular Sciences*, 18(1), 197. doi:10.3390/ijms18010197.

- Mazzola, M., Carini, F., Leone, A., vd. (2016). Euro Mediterranean Biomedical Journal For Young Doctors. 11(17), 123–29. doi: 10.3269/1970-5492.2016.11.17.
- McGuire, S., (2016). World Cancer Report (2014). Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. Advances in nutrition, 7(2), 418–19. doi:10.3945/an.116.012211.
- Meplan, C., Hughes, D., Pardini, B., vd. (2010). Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 31(6), 1074–79. doi:10.1093/carcin/bgq076.
- Mills, G., (1957), Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal Of Biological Chemistry*, 229(1), 189–97. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Moscow, J., Schmidt, L., Ingram, D., vd. (1994). Loss of heterozygosity of the human cytosolic glutathione peroxidase I gene in lung cancer. *Carcinogenesis*, 15(12), 2769–73. doi:10.1016/0169-5002(95)98726-Q.
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., vd. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 384(9945), 766–81. doi:10.1016/S0140-6736(14)60460-8.
- Ng, M., Freeman, M., Fleming, T., vd. (2014). Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980–2012. *JAMA*, 311(2), 183–92. doi:10.1001/jama.2013.284692.
- Nogueira, V., Hay, N., (2013). Molecular Pathways: Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 19(16), 4309–14. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1424.
- Nordlund, P., Reichard, P., (2006). Ribonucleotide Reductases. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 681–706. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142443.
- Osterreicher, C., Schultsheiss, J., Wehler, M., vd. (2007). Genetic polymorphisms of manganese superoxide dismutase and glutathione S transferase in chronic alcoholic pancreatitis. *Mutagenesis*, 22(5), 305–10. doi:10.1093/mutage/gem017.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., vd. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays:

A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3122–28. doi:10.1021/jf0116606.

Pais, R., Dumitrașcu, D., (2013). Do antioxidants prevent colorectal cancer? A meta-analysis. *Romanian Journal of Internal Medicine*, 51(3–4), 152–63.

Peters, U., Chatterjee, N., Hayes, R., vd. (2008). Variation in the selenoenzyme genes and risk of advanced distal colorectal adenoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17(5), 1144–54. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-2947.

Peters, U., Bien, S., Zubair, N., (2015). Genetic architecture of colorectal cancer. *Gut*, 64(10), 1623–36. doi:10.1136/gutjnl-2013-306705.

Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., vd. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1499–1503. doi:10.1016/S0006-2952(03)00504-5.

Porru, S., Pavanello, S., Carta, A., vd. (2014). Complex relationships between occupation, environment, DNA adducts, genetic polymorphisms and bladder cancer in a case-control study using a structural equation modeling. *PloS One*, 9(4), e94566. doi:10.1371/journal.pone.0094566.

Raaschou-Nielsen, O., Sørensen, M., Hansen, R., vd. (2007). GPX1 Pro198Leu polymorphism, interactions with smoking and alcohol consumption, and risk for lung cancer. *Cancer Letters*, 247(2), 293–300. doi:10.1016/j.canlet.2006.05.006

Ratnasinghe, D., Tangrea, J., Andersen, M., vd. (2000). Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Research*, 60(22), 6381–83.

Ravn-Haren, G., Olsen, A., Tjønneland, A., vd. (2006). Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis*, 27(4), 820–25. doi:10.1093/carcin/bgi267.

Rayman, M., (2009). Selenoproteins and human health: insights from epidemiological data. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(11), 1533–40. doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.014.

Reuter, S., Gupta, S., Chaturvedi, M., Aggarwal, B., (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine* 49(11), 1603–16. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.

Rokutan, K., Kawahara, T., Kuwano, Y., vd. (2006). NADPH oxidases in the

- gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), 1573–82. doi:10.1089/ars.2006.8.1573.
- Russo, M., Murray, S., Wurzelmann, J., vd. (1997). Plasma selenium levels and the risk of colorectal adenomas. *Nutrition and Cancer*, 28(2), 125–29. doi:10.1080/01635589709514563.
- Sambrook, J., Green, M., (1989). *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2. baskı, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saud, S., Li, W., Mornis, N., vd. (2014). Resveratrol prevents tumorigenesis in mouse model of Kras activated sporadic colorectal cancer by suppressing oncogenic Kras expression. *Carcinogenesis*, 35(12), 2778–86. doi:10.1093/carcin/bgu209.
- Scully, T., (2014). Public health: Society at large. *Nature*, 508(7496), S50-1. doi:10.1038/508S50a.
- Shchedrina, V., Zhang, Y., Labunskyy, V., vd. (2010). Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(7), 839–49. doi:10.1089/ars.2009.2865.
- Shringarpure, R., Davies, K., (2002). Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radical Biology & Medicine* 32(11), 1084–89. doi:10.1016/S0891-5849(02)00824-9.
- Siegel, R., Miller, K., Jemal, A., (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 66(1), 7–30. doi:10.3322/caac.21332.
- Sies, H., (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal Of Medicine*, 91(3C), 31S–38S. doi:10.1016/0002-9343(91)90281-2.
- Slattery, M., Lundgreen, A., Welbourn, B., vd. (2012). Oxidative balance and colon and rectal cancer: interaction of lifestyle factors and genes. *Mutation Research*, 734(1–2), 30–40. doi:10.1016/j.mrfmmm.2012.04.002.
- Slattery, M., Pellatt, D., Mullany, L., Wolff, R., (2015). Differential Gene Expression in Colon Tissue Associated With Diet, Lifestyle, and Related Oxidative Stress. *PLoS One*, 10(7), e0134406. doi:10.1371/journal.pone.0134406.
- Souglakos, J., (2007). Genetic alterations in sporadic and hereditary colorectal cancer: implementations for screening and follow-up. *Digestive Diseases*, 25(1), 9–19. doi:10.1159/000099166.

- Soyutan, İ., Güler, C., Aygün, A., vd (2019) T.C.Sağlık Bakanlığı İstatistikleri Yıllığı. <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/13183,sy2016turkcepdf.pdf?0>, Erişimtarihi: 14/01/2018.
- Sreevalsan, S., Safe, S., (2013). Reactive Oxygen Species and Colorectal Cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*, 9(4), 350–57. doi:10.1007/s11888-013-0190-5.
- Stewart, B., Bray, F., Forman, D., vd. (2016). Cancer prevention as part of precision medicine: ‘plenty to be done’. *Carcinogenesis*, 37(1), 2–9. doi:10.1093/carcin/bgv166.
- Sudhakar, A., (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal Of Cancer Science & Therapy*, 1(2), 1–4. doi:10.4172/1948-5956.100000e2.
- Takahashi, K., Akasaka, M., Yamamoto, Y., vd. (1990). Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *Journal Of Biochemistry*, 108(2), 145–48. doi:10.1080/10426509208045871.
- Tan, M., Li, S., Swaroop, M., vd. (1999). Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *The Journal Of Biological Chemistry*, 274(17), 12061–66. doi:S0014-5793(99)00135-0 [pii].
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., Hiai, H., (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*, 358(1), 1–3. doi:10.1016/0014-5793(94)01368-B.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M., vd. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(8), 1343–74. doi:10.1089/ars.2007.1957.
- Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P., (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(7), 579–91. doi:10.1038/nrd2803.
- Tunç, M., (2006). Biyolojik Sıvılarda Bazı Eser Elementlerin Tayin ve Metot Geliştirme. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yıldız Teknik Üniversitesi.
- Upadhyaya, P., El-Bayoumy, K., vd. (1992). Chemoprevention of colon carcinogenesis by the synthetic organoselenium compound 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Cancer Research*, 52(20), 5635–40.
- URL-1 TÜİK Web Sitesi, 04/06/2018 tarihinde <http://www.tuik.gov.tr> adresinden alınmıştır.

- URL-2 06/04/2018 tarihinde <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/causes-risks-prevention/prevention.html>. adresinden alınmıştır.
- URL-3 06/04/2018 tarihinde <https://curesearch.org/Cancer-Resources> adresinden alınmıştır.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., vd. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., vd. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- Watters, J., Satia, J., Kupper, L., vd. (2007). Associations of antioxidant nutrients and oxidative DNA damage in healthy African-American and white adults. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16(7), 1428–36. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-1030 .
- Welz, B., Melcher, M., (1985). Decomposition of marine biological tissues for determination of arsenic, selenium, and mercury using hydride-generation and cold-vapor atomic absorption spectrometries. *Analytical Chemistry*, 57(2), 427–31. doi:10.1021/ac50001a024.
- Wu, R., Feng, J., Yang, Y., vd. (2017). Significance of Serum Total Oxidant/Antioxidant Status in Patients with Colorectal Cancer. ed. Reza Khodarahmi. *PloS One*, 12(1), e0170003. doi:10.1371/journal.pone.0170003.
- Yildirim, Z., Yildirim, F., Ucgun, N., Kilic, N., (2009). The Evaluation Of The Oxidative Stress Parameters In Nondiabetic And Diabetic Senile Cataract Patients. *Biological Trace Element Research*, 128(2), 135–43. doi:10.1007/s12011-008-8258-9.
- Yoshizawa, K., Willett, W., Morris, S., vd. (1998). Study Of Prediagnostic Selenium Level In Toenails And The Risk Of Advanced Prostate Cancer. *Journal Of The National Cancer Institute*, 90(16), 1219–24. doi:10.1093/jnci/90.16.1219.
- Yu, S., Zhu, Y., Li, W., (1997). Protective Role Of Selenium Against Hepatitis B Virus And Primary Liver Cancer In Qidong. *Biological Trace Element Research*, 56(1), 117–24. doi:10.1007/BF02778987 .
- Yung, L., Leung, F., Yao, X., vd. (2006). Reactive Oxygen Species In Vascular Wall. *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets*, 6(1), 1–19.
- Zhang, Y., Zhang, L., Sun, D., vd. (2011). Genetic Polymorphisms Of Superoxide

Dismutases, Catalase, And Glutathione Peroxidase In Age-Related Cataract. *Molecular Vision*, 17, 2325–32.

Zhang, Y., Zhao, W., Zhang, H., vd. (2002). Overexpression Of Copper Zinc Superoxide Dismutase Suppresses Human Glioma Cell Growth. *Cancer Research*, 62(4), 1205–12.

Zmorzyński, S., Świdarska-Kołacz, G., Koczkodaj, D., Filip, A., (2015). Significance of Polymorphisms and Expression of Enzyme-Encoding Genes Related to Glutathione in Hematopoietic Cancers and Solid Tumors. *Biomed Research International*, 6. doi:10.1155/2015/853573.



