



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANDA DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN  
KOLOREKTAL KANSERLİ (CRC) HASTALARDA  
AKIM SİTOMETRİSİ İLE TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YETER DİLEK**

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2017

T.C.  
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANDA DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN  
KOLOREKTAL KANSERLİ (CRC) HASTALARDA  
AKIM SİTOMETRİSİ İLE TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YETER DİLEK**

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2017

**T.C.**  
**ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Kolorektal Kanserli (CRC) Hastalarda  
Akım Sitometrisi İle Tespiti

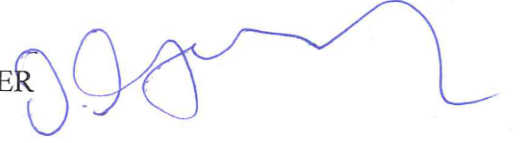
Yeter DİLEK

Yüksek Lisans Tezi

26/07/2017

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER



Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Doç. Dr. Pelin MUTLU

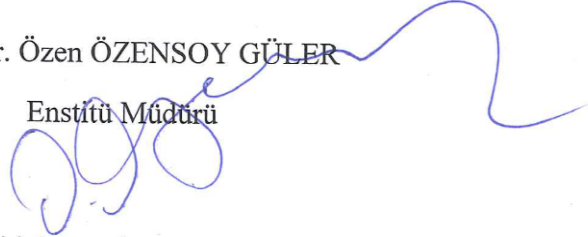
Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK



Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken  
tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Enstitü Müdürü



Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, yabancı kaynaklardan alınan tüm bilgilerin tarafımdan çevrildiğini, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

26-07-2017

Yeter DİLEK



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin her aşamasında bilgisinden ve akademik tecrübesinden her anlamda faydalandığım, her türlü desteğini benden esirgemeyen kıymetli danışmanım Sayın Prof. Dr. Özen Özensoy GÜLER'e en derinden teşekkürlerimi ve saygılarımı arz ederim. Aynı şekilde tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve her zaman destekleyen hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'e ve Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN'a, beni destekleyen ve yalnız bırakmayan, deneysel çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Emine TERZİ'ye, Arş. Gör. Beyza Ecem ÖZ BEDİR'e, Arş. Gör. Elif ERCAN'a, Arş. Gör. Tuğba Kevser UYSAL'a, Uzm. Bio. Bilgesu ERSAN'a teşekkürü borç bilirim. Tez çalışmamın ilerlemesinde emeği geçen Uzm. Dr. Ferda ALPARSLAN PINARLI'ya, Uzm. Bio. Meral TİRYAKİ'ye, Bio. Emrullah ÇALIŞIR'a ve Uzm. Bio. Cihan DALOĞLU'na teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezimi 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benim için emek veren, eğitim hayatım boyunca beni hep destekleyen, sevgisini ve saygısını benden esirgemeyen, hayatımda hep örnek aldığım ve örnek alacağım, beni yetiştiren ve her anlamda arkamda olan, benimle tek yürek olan canım AİLEM'e teşekkürü borç bilir her daim onlara minnettar olduğumu dile getirmek isterim.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Karsinogenez .....	3
2.1.2. Kanser Biyolojisi ve Hücre Döngüsü .....	5
2.1.3. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri.....	8
2.2. Kolorektal Kanser(CRC).....	14
2.2.1. CRC Epidemiyolojisi.....	14
2.2.2. CRC Etiyolojisi.....	16
2.2.3. Kolon ve rektumun Anatomisi ve Histolojisi.....	16
2.2.4. Kolonun Polipleri ve Neoplazileri.....	18
2.2.5. Kolorektal Karsinogenez .....	19
2.2.6. CRC'lerde Evrelendirme.....	21
2.3. Dolayan Tümör Hücreleri (CTC) .....	23
2.3.1. CTC ve Metastaz İlişkisi .....	23
2.3.2. CTC ve CRC İlişkisi.....	24
2.3.3. CTC Belirleme Teknolojileri.....	25
2.3.3.1. Biyolojik Özelliklere Dayalı CTC Zenginleştirme Stratejileri.....	26
2.3.3.2. Biyofiziksel Özelliklere Dayalı CTC Zenginleştirme Teknolojileri.....	30
2.3.3.3. Doğrudan Görüntüleme Yöntemleri .....	32
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>34</b>
3.1. Materyaller .....	34
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler ve Cihazlar .....	34
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler .....	35
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Antikorlar.....	36

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması.....	36
3.2. Yöntemler.....	37
3.2.1. Zenginleştirme Basamağı; Fikol Yoğunluk Gradientli Santrifüj .....	37
3.2.2. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı .....	38
3.2.3. Zenginleştirme basamağı; CD 45 Negatif İmmunomanyetik Ayrım.....	39
3.2.4. Akım Sitometrisi İle Pozitif Seçilim Görüntüleme Basamağı .	41
3.3. İstatistiksel Analizler .....	46
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>47</b>
4.1. Hasta ve Kontrol Profili .....	47
4.2. CTC Sayılarına İlişkin Bulgular.....	48
4.3. FC Analiz Verileri .....	49
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>70</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>77</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>81</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>104</b>
EK-1. Etik Kurul Raporu .....	104
EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu.....	108
EK-3. Tez Çalışmasında Kullanılan Tez Makalesi .....	110
EK-4. Uluslararası Bilimsel Toplantıda Sunulan ve Bildiri Kitabında Özeti Basılan Poster Bildirisi .....	111
EK-5. Özgeçmiş .....	112

## ÖZET

### **Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Kolorektal Kanseri (CRC) Hastalarda Akım Sitometrisi İle Tespiti**

Kolorektal kanser (CRC), dünyadaki ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. CRC gibi katı tümörlü hastalarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında metastatik CRC en sık rastlanan formdur. Metastaz, kanser hastalarının periferik kanlarındaki dolaşımdaki tümör hücrelerinin (CTC) varlığı ile ilişkilidir.

Çalışmamızda, CTC zenginleştirme ve saptama stratejileri için modifiye edilmiş uygun yöntemle kolorektal kanser hastalarının kan örneklerinde CTC'ler tespit edildi. İlk önce 7.5 mL periferik kan numuneleri toplandı ve periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC'ler) taze kan numunelerinden fikol gradyanı ayırımı ile izole edildi. Daha sonra, PBMC'lerdeki lökositler, negatif bir seçim için CD45 ile konjuge edilmiş manyetik mikro boncukları ile uzaklaştırıldı. Son olarak, elde edilen hücreler anti-epitelyal hücre adhezyon molekülü (anti-EpCAM), sitokeratinler (CK8, CK19 ve anti-CD45 olarak lökosit-spesifik işaretleyici) ile etiketlendi. Tüm numuneler BD FACS Aria III akış sitometrisi ile analiz edildi. 10 kolorektal kanseri hastası ve 7 sağlıklı birey ile çalışılmıştır.

Çalışmamızda, CK19 tabanlı kapılama stratejisi ile kolorektal kanseri hastaların kan örneklerinde 2-13 CTC tespit edilirken, sağlıklı bireylerin kan örneklerinde CTC'lerin saptanmadığı gözlenmiştir. Kanser hastalarının kan örneklerinden CTC saptanmasının, hastalık durumunun gerçek zamanlı izlenmesi ve kişisel terapi geliştirilmesi için bir tümör biyolojik belirteci olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kolorektal kanseri, dolaşan tümör hücreleri, akım sitometrisi



## **ABSTRACT**

### **The Detection Of Circulating Tumor Cells In Colorectal Cancer Patients By Flow Cytometry**

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of mortality worldwide. In solid tumors, such as colorectal cancer, metastatic CRC is the most common form of cancer-causing death. Metastasis is associated with the presence of circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of cancer patients.

In our study, CTCs were detected in blood samples of colorectal cancer patients, using with our modified convenient method for the strategies of CTC enrichment and detection. 7.5 mL peripheral blood samples were firstly collected and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the fresh blood samples by ficoll gradient separation. Next, the leukocytes in PBMCs were removed by magnetic microbeads conjugated with CD45 for a negative selection. Finally, the retained cells were labeled with anti-epithelial cell adhesion molecule (anti-EpCAM), cytokeratins (CK 8, CK 19 and the leukocyte-specific marker as anti-CD 45). All samples were analyzed by BD FACS Aria III flow cytometry. A total of 10 patients and 7 control group were included in this study.

In our study, 2-13 between CTCs were detected in blood samples of colorectal cancer patients with CK19-based gating strategy, and no CTCs were detected in blood samples of healthy individuals. As a consequence, the real-time monitoring of the disease state and personal therapy development may use to be a tumor biomarker for the detection of CTCs from blood samples.

**Keywords:** Colorectal cancer, circulating tumor cells, flow cytometry

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%:	:Yüzde
~	:Yaklaşık
°C	:Santrigrat Derece
AJCC	:Amerikan Birleşik Kanser Komitesi
APC	:Allophycocyanin
APC-H7	:Allophycocyanin-Hilite-7
ATP	:Adenozintrifosfat
Bcl-2	:Anti-apoptotik gen
BSA	:Bovin Serum Albümin
CA	:Karbonhidrat Antijeni
CAK	:CDK Aktive Edici Kinaz
CDK	:Siklin Bağımlı Kinaz
CDKI	:CDK İnhibitörü
CEA	:Karsinoembriyonik Antijen
CK	:Sitokeratin
c-Myc	:Proto-Onkogen Protein
CRC	:Kolonrektal Kanseri
CT	:Bilgisayarlı Tomografi Görüntüleme
CTC	:Dolaşan Tümör Hücreleri
DAPI	:4,2-Diamidino-2-Fenilindol Dihidroklorür
DCC	:Deleted In Colon Cancer
DEP-FFF	:Dielektroforetik Alan Akış Fraksiyonasyonu
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
DTC	:Dissemine Tümör Hücreleri
EGFR	:Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	:Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm
EpCAM	:Epitelyal Hücre Adezyon Molekülü
ESM	:Ekstraselüler Matriks
FAB	:Familyal Adenomatöz Polipozis Koli
FC	:Akım Sitometri
FDA	:Birleşik Devletler Gıda Ve İlaç İdaresi

FGF	:Fibroblast Büyüme Faktörü
FITC	:Fluorescein Isothiocyanate
FS	:Forward Scatter
g	:Relatif Santrifüj Kuvvetinin (Rcf)
GEDİ	:Güçlendirilmiş Diferansiyel İmmünokapasyon
GEM	:Geometrik Karıştırma Çipi
GLUT	:Glikoz Taşıyıcı Protein
GO	:Grafen Oksit Çipi
HB	:Balık Sırtı Çipi
HER2	:Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
HIF-1 $\alpha$	:Hipoksi İndükleyici Faktör-1 Alfa
HNPCC	:Hereditör Nonpolipozis Kolon Karsinomu
IgG	:İmmüoglobülin
kDa	:Kilo Dalton
KRAS	:Kristen Rat Sarcoma
LCA	:Ortak Lökosit Antijeni
LKB1	:Treonin Kinaz Proteini
MACS	:Manyetik Aktif Hücre Sıralama
MDM2	:Murine Double Minutes
MET	:Mezenkimal-Epitelial Dönüşüm
mL	:Mililitre
MLH1	:Mismatch Repair Protein
mM	:Milimolar
MR	:Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSH2	:Mismatch Repair Protein
MUC-1	:Musin 1
Na <sub>2</sub> EDTA	:Etilendiamidin Tetraasetik Asitli Disodyum
NF2	:Nörofibromatozis
p53	:Tümör Protein 53
PAFC	:Fotoakustik Akış Sitometrisi
PBMC	:Periferik Kandaki Mononükleer Hücreler
PBS	:Phosphate Buffered Saline
PDGF	:Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü

PE	:Phycoerythrin
PET	:Pozitron Emisyon Tomografisi
pH	:Potansiyel Hidrojen
PMS1	:Mismatch Repair Protein
PMS2	:Mismatch Repair Protein
pRb	:Retinablastoma Tümör Baskılayıcı Protein
Q RT-PCR	:Ters Transkriptaz Kantitatif Pcr
R	:Restriksiyon Noktası
RT-PCR	:Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SF	:Seyreltme Faktörü
SS	:Side Scatter
TGF- $\beta$	:Büyüme Faktörü
TNM	:Primer Tümör, Bölgesel Lenf Nodları, Uzak Metastaz
TROP-2	:Trofoblast Hücre Yüzey Antijeni-2
$\mu$ L	:Mikrolitre
UV	:Ultra Viyole
VEGF	:Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları .....	7
Şekil 2.2. Metastatik döngü .....	13
Şekil 2.3. Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları .....	15
Şekil 2.4. Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları .....	15
Şekil 2.5. Kolon ve rektumun anatomisi ve histolojik yapısı .....	17
Şekil 2.6. Klasik kolorektal adenom-karsinom dizisi .....	21
Şekil 2.7. Metastazların gelişimine yol açan başlıca adımlar .....	24
Şekil 2.8. CTC zenginleştirme ve saptama yöntemleri.....	26
Şekil 3.1. a) Kan örneği b) PBS ile seyreltilen kan örneği c) Fikol gradyan ayrımı öncesi kan örneği d) Santrifüj sonra kan örneği.....	38
Şekil 3.2. a) LD Kolon b) MACS hücre ayrımı sistemi .....	40
Şekil 3.3. FC analiz Sistemi .....	42
Şekil 3.4. BD FACSAria™ III Cell Sorter Akım sitometrisi cihazı.....	43
Şekil 4.1. H1'e ait ilk kür öncesi kontrol tüpünün FC analizinin kapılama grafiği ...	51
Şekil 4.2. H1'e ait ilk kür öncesi FC analizinin sonucu .....	51
Şekil 4.3. H1'e ait ilk kür öncesi deney tüpünün FC analizinin kapılama grafiği. ....	52
Şekil 4.4. H1'e ait ilk kür öncesi deney tüpünün FC analizinin sonucu .....	52
Şekil 4.5. H1'e ait ikinci kür öncesi kontrol tüpünün FC analizinin kapılama grafiği..	53
Şekil 4.6. H1'e ait ikinci kür öncesi kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.....	53
Şekil 4.7. H1'e ait ikinci kür öncesi izotip tüpünün FC analizinin kapılama grafiği.	54
Şekil 4.8. H1'e ait ikinci kür öncesi izotip tüpünün FC analizinin sonucu .....	54
Şekil 4.9. H1'e ait ikinci kür öncesi deney tüpünün FC analizinin kapılama grafiği.55	
Şekil 4.10. H1'e ait ikinci kür öncesi deney tüpünün FC analizinin sonucu.....	55
Şekil 4.11. H2'ye ait ilk kür öncesi kontrol tüpünün FC analizinin sonucu. ....	56
Şekil 4.12. H2'ye ait ilk kür öncesi deney tüpünün FC analizinin sonucu .....	56
Şekil 4.13. H2'ye ait ikinci kür öncesi kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.....	56
Şekil 4.14. H2'ye ait ikinci kür öncesi deney tüpünün FC analizinin sonucu.....	57
Şekil 4.15. H3'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu. ....	57
Şekil 4.16. H3'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu. ....	57
Şekil 4.17. H4'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu. ....	58

<b>Şekil 4.18.</b> H4'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu. ....	58
<b>Şekil 4.19.</b> H5'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.. ....	58
<b>Şekil 4.20.</b> H5'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu. ....	59
<b>Şekil 4.21.</b> H6'ya ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.... ....	59
<b>Şekil 4.22.</b> H6'ya ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.. ....	59
<b>Şekil 4.23.</b> H7'ya ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu... ....	60
<b>Şekil 4.24.</b> H7'ye ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.. ....	60
<b>Şekil 4.25.</b> H8'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.. ....	61
<b>Şekil 4.26.</b> H8'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu. ....	61
<b>Şekil 4.27.</b> H9'a ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu. ....	61
<b>Şekil 4.28.</b> H9'a ait deney tüpünün FC analizinin sonucu. ....	62
<b>Şekil 4.29.</b> H10'a ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.. ....	62
<b>Şekil 4.30.</b> H10'a ait deney tüpünün FC analizinin sonucu. ....	62
<b>Şekil 4.31.</b> K1'e ait kontrol tüpünün FC analizinin kapılama grafiği .....	64
<b>Şekil 4.32.</b> K1'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.. ....	64
<b>Şekil 4.33.</b> K1'e ait izotip tüpünün FC analizinin kapılama grafiği.....	65
<b>Şekil 4.34.</b> K1'e ait izotip tüpünün FC analizinin sonucu.....	65
<b>Şekil 4.35.</b> K1'e ait deney tüpünün FC analizinin kapılama grafiği .....	66
<b>Şekil 4.36.</b> K1'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.. ....	66
<b>Şekil 4.37.</b> K2'ye ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.. ....	67
<b>Şekil 4.38.</b> K2'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu. ....	67
<b>Şekil 4.39.</b> K3'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.. ....	67
<b>Şekil 4.40.</b> K3'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu. ....	67
<b>Şekil 4.41.</b> K4'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.. ....	68
<b>Şekil 4.42.</b> K4'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu. ....	68
<b>Şekil 4.43.</b> K5'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu. ....	68
<b>Şekil 4.44.</b> K5'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu .....	68
<b>Şekil 4.45.</b> K6'ya ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu .....	69
<b>Şekil 4.46.</b> K6'ya ait deney tüpünün FC analizinin sonucu. ....	69
<b>Şekil 4.47.</b> K7'ye ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu .....	69
<b>Şekil 4.48.</b> K7'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu. ....	69

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Benign ve malign tümörlerin karşılaştırılması.....	4
<b>Tablo 2.2.</b> TNM evrelendirmesi .....	22
<b>Tablo 3.1.</b> Çalışmada kullanılan alet ve cihazların listesi. ....	34
<b>Tablo 3.2.</b> Çalışmada kullanılan sarf malzemeler listesi.....	35
<b>Tablo 3.3.</b> Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi. ....	35
<b>Tablo 3.4.</b> Çalışmada kullanılan antikorlar listesi.....	36
<b>Tablo 4.1.</b> CRC hastalarının bilgileri.. ....	48
<b>Tablo 4.2.</b> Sağlıklı kontrol grubunun bilgileri.....	49
<b>Tablo 4.3.</b> CTC sayılarının hasta ve kontrol grubunda dağılımı .....	49

# 1. GİRİŞ

Kanser multifaktöriyel olup, bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar birçok sebeplerden dolayı hücre bölünme kontrol noktaları zarar gören hücrelerin kontrolsüz bir şekilde aşırı bölünmesiyle karakterize edilen bir hastalıktır (1,2). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre her yıl 1.3 milyon kişi kolorektal kansere (CRC) yakalanmakta ve yaklaşık 700 bin kişi CRC nedeniyle ölmektedir (3).

Kolorektal karsinom gelişmiş ülkelerde ciddi morbidite ve mortaliteye yol açan önemli bir hastalıktır. Görülme sıklığı; erkeklerde bronş ve prostat kanserinden sonra üçüncü sırayı, bayanlarda meme kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır (4). CRC'nin yaş faktörü ile birlikte sıklığı artmaktadır (4). CRC'nin patogenezi hücrenin hayatta kalması, farklılaşması ve çoğalması dahil olmak üzere çeşitli süreçleri içerir (5). Başlıca ölüm sebebi ise CRC hastalarında metastazdır ve CRC'nin metastaz yayılması en sık görülen bölge karaciğerdir (6).

Kanser hücrelerinin tek tek ya da küme halinde ayrılması, primer tümör dokusundan uzaklaşma yeteneği kazanması, çevre dokulara göç etmesi, kan dolaşımı ya da lenfatik sisteme girişi, belirli bir tümörün metastatik özelliğini belirgin hale getirmektedir (7). Epiteyal kanserli hastaların kanlarında dolaşan tümör hücreleri (CTC) olması ve sıklığı kanser metastazında önemli bir aşamadır ve hastalığın evresi ve tedavi değerlendirmeleri ile ilgili değerli bilgiler sağlar (8-10). Erken teşhis ve metastatik yayılmaların tedavisi için klinik değeri yüksek olan CTC'lerin metastatik odak olma yeteneği yüksektir (11).

Yüksek CTC sayısı kanser ile korelasyon yapıldığında metastazda artış gösterdiği ve nüks etme süresini kısalttığı belirlenmiştir (12). Bu tezde CTC'lerin *in vitro* olarak analiz edilmesi amaçlanmış olup periferik kan numuneleri kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. CTC'ler kanda çok nadir bulunduğu için birkaç basamak zenginleştirme tekniği kullanılmıştır.



Heterojen yapıya sahip olması sebebiyle CTC'lerin kantitatif (nicel) analizinin avantaj sağlayacağı düşünülerek akım sitometrisi (Flow Cytometry, FC) kullanılmıştır (13). Klinikte, hematoloji ve onkolojyi de içine alan çok sayıda disiplinde FC'nin kullanılması ile, FC'nin son derece önemli bir teknoloji olduğu kanıtlanmıştır (14,15). Aynı zamanda, cihazın belirteç ekspresyonunun varlığı ya da yokluğunun tespitine ek olarak ekspresyon seviyelerinin miktarını belirleyebilme niteliği ve çoklu biyobelirteç analizi gerçekleştirebilme olanağı sağlaması saptama basamağında kullanılma nedenleri arasında yer almaktadır.

Bu tez çalışmasında, kendi belirlediğimiz antikorlarla birleştirdiğimiz zenginleştirme ve saptama yöntemleri ile CRC hastalarının kanından CTC tespitinin yapılması hedeflenmiştir. Kan örneklerinin eldesi, basit ve minimal invazif olduğundan ülkemiz literatüründe bir öncü olacağı düşünülen bu yöntem ile CTC'ler gerçek zamanlı olarak kullanılabilir. Ülkemizde ilk sıralarda yer alan, erken teşhisin önemli olduğu CRC hastalarında büyük kolaylık sağlayarak hastalığın ilerlemesi açısından bilgi sağlayabilir ve sağ kalıma yönelik tedavilerin yönlendirilmesi için biyobelirteç görevi görebileceği düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser; ortaya çıkışı, gelişimi ve sonucu bir hastadan diğer hastaya oldukça değişkenlik gösteren ciddi bir sağlık sorunudur. Aynı zamanda kanser, hücrelerin köklü metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdiği çok aşamalı bir süreçtir (16). Kanserin en önemli tanımsal özelliği, vücudun çeşitli bölgelerinde ortaya çıkan ve diğer organlara yayılabilen anormal hücre bölünmesidir. Yapılan bilimsel çalışmalarla kanserin teşhis oranı durmadan artarken kanser nedenli ölüm oranı hemen hemen sabit kalmaktadır (17).

Kanser, hücrenin büyümesi ve hücre döngüsünü kontrol eden hücre genlerinin mutasyonu veya anormal aktivasyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır (2). Genel olarak genetik, sistemik ve çevresel olmak üzere üç değişik faktörün birbiri ile etkileşimi sonucunda gelişir (18). Çevresel faktörler arasında beslenme, endüstriyel kirlilik ve virüsler yer alırken immün sistemde görülen bozulmalar sistemiktir. Onkogenlerin etkileşimine yol açan mutasyonlar, aileden kalıtılan bazı mutasyonlar ve genleri etkileyen kromozomal değişiklikler de genetik faktörleri oluşturur (19).

#### 2.1.1. Karsinogenez

Karsinogenez, somatik evrim olarak tanımlanan karmaşık, çok adımlı bir süreçtir. Karsinogenez genellikle genetik veya epigenetik değişiklikler gerektirir ve hücreler için yeni fenotipler oluşturur (20). Karsinogenez neden olan genetik değişiklikler hücrenin birkaç temel özelliğini değiştirerek hücrelerin normal büyüme kontrolünden kaçmalarına ve sonunda tam kanser fenotipinin ortaya çıkmasına neden olurlar (21).

Hücreleri, işlev ve yapı olarak normal hücrelere çok benzeyen, genelde bölgesel ve küçük boyutlu tümörler “benign tümör” olarak adlandırılır. Fibröz bir kapsül genelde benign tümörlerin büyüklüğünü belirler. Normal hücrelerde olduğu gibi benign tümör hücrelerinin bir arada tutulması hücre-yapışma molekülleri aracılığıyla olup, köken aldıkları dokularda bulunurlar (22). Normal hücrelerden

daha hızlı büyüeyebilen ve bölünen, genellikle normal hücre ölümü seyri göstermeyen hücreler “malign tümörler”dir. Malign tümör hücrelerinin kilit özellikleri yakın dokuları istila edebilme yetenekleri olup, hücreler çoğalmaya devam ettikçe yayılır ve yeni tümör kaynakları oluştururlar (Tablo 2.1) (23,24).

**Tablo 2.1.** Benign ve malign tümörlerin karşılaştırılması (24).

Karakteristik	Benign	Malign
<b>Diferansiyasyon/anaplazi</b>	İyi diferansiye; yapı orjin doku için tipik olabilir.	Anaplazi ile diferansiyasyonda kayıp, yapı sıklıkla atipik.
<b>Büyüme hızı</b>	Genellikle ilerleyici ve yavaş; durabilir veya gerileyebilir; mitoz seyrek ve normal.	Kararsızdır ve yavaştan hızlıya doğru değişebilir; mitoz çok sayıda ve anormal.
<b>Lokal invazyon</b>	Genellikle yapışık ve itici, çevre normal dokuları invaze ve infiltre etmeyen iyi sınırlı kitle.	Çevre normal dokulara lokal olarak invaziv ve infiltre, bazen yapışık ve itici görülebilir.
<b>Metastaz</b>	Yoktur.	Sıklıkla vardır; daha büyük ve daha az diferansiye tümör daha sık metastaz yapmaz.

Genetik değişiklik replikasyonla aktarıldığından dolayı karsinogenez için hedef hücreler, dokularda sürekli yenilenen kök hücrelerdir (18). Tümör oluşumu, genetik defektlerin gelişimiyle normal hücrenin neoplastik hücreye dönüşümü ve neoplastik gelişim olarak ikiye ayrılır (25). Neoplastik transformasyon, spontan olabileceği gibi çeşitli şekillerde indüklenerek de baz çifti değişiklikleri, yanlış baz eşleşmeleri, delesyonlar, translokasyonlar ve amplifikasyonlar sonucu oluşabilir (18). Başka bir deyişle oluşan neoplastik transformasyon, DNA replikasyonunun ve tamir mekanizmalarının düzgün çalışmaması sonucu hücrelerde oluşan mutasyonların sonucudur. Mutasyonlar, büyüme kontrolünün kaybı (26) ile sonuçlanarak, proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler, tümör baskılayıcı genleri düzenleyici genler ve büyüme kontrol eden genlerden oluşur (18,27). Karsinogenezin ikinci basamağında yer alan neoplastik gelişme, kanser hücresinin klonal proliferasyonuna yol açarak , önce çevre dokulara sonra da uzak dokulara yayılarak büyümesini sağlar (28). Sonuç olarak kanserde değişikliğe uğramış genler, normalde doku homeostasisi ve hücre

büyümesini düzenleyen üç ana biyolojik yolu olan hücre siklusu, apoptoz ve diferansiyasyonu etkiler (29).

### **2.1.2. Kanser Biyolojisi ve Hücre Döngüsü**

Hücre döngüsü, bir hücrenin bölünmeye başlamasından itibaren onu takip eden diğer hücre bölünmesine kadar geçen zamanda, hücrede gerçekleşen geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü süreçtir. Genetik olarak birbirinin aynısı iki hücre oluşumu ile sonuçlanır (30).

Hücre döngüsü dört aktif fazdan M (mitoz) fazı, S (DNA sentez) fazı, G1 (pre-dublikasyon) fazı ve G2 (post-dublikasyon) fazı) oluşur. Proliferasyon göstermeyen hücreler genellikle M ve S evreleri arasında durur ve G0 (alfa fazı) hücreleri olarak adlandırılır. Normal dokulardaki hücrelerin büyük çoğunluğu G0'da bulunur. Hücreler, büyüme faktörleri ve hücre yapışması da dahil olmak üzere dış faktörlere tepki olarak hücre döngüsüne girmeye teşvik edilir. Hücre döngüsünün G1 evresi sırasında hücreler mitojenik sinyallere cevap verir. Hücre döngüsü G1 evresindeki restriksiyon noktasını (R) geçtikten sonra, hücre döngüsü geçişleri bağımsız hale gelir (31).

Hücre döngüsü boyunca ilerleme, siklin bağımlı kinazlar (CDK'ler) olarak adlandırılan bir protein sınıfının sıralı aktivasyonu ve inaktivasyonu tarafından yönlendirilir. CDK'lar, inaktif bir korunmuş katalitik çekirdekten oluşur ve aşağıdaki üç seviyede düzenlenir:

1. CDK aktivitesi, siklinler olarak bilinen düzenleyici alt birimlerle ilişkiyi gerektirir. CDK seviyesi hücre döngüsü boyunca sabit kalır; bununla birlikte, siklin konsantrasyonu, hücre döngüsü boyunca faza özgü bir şekilde değişir. Siklinlerin periyodik sentezi ve yok edilmesi birincil düzeyde hücre döngüsü kontrolü sağlar (32,33).

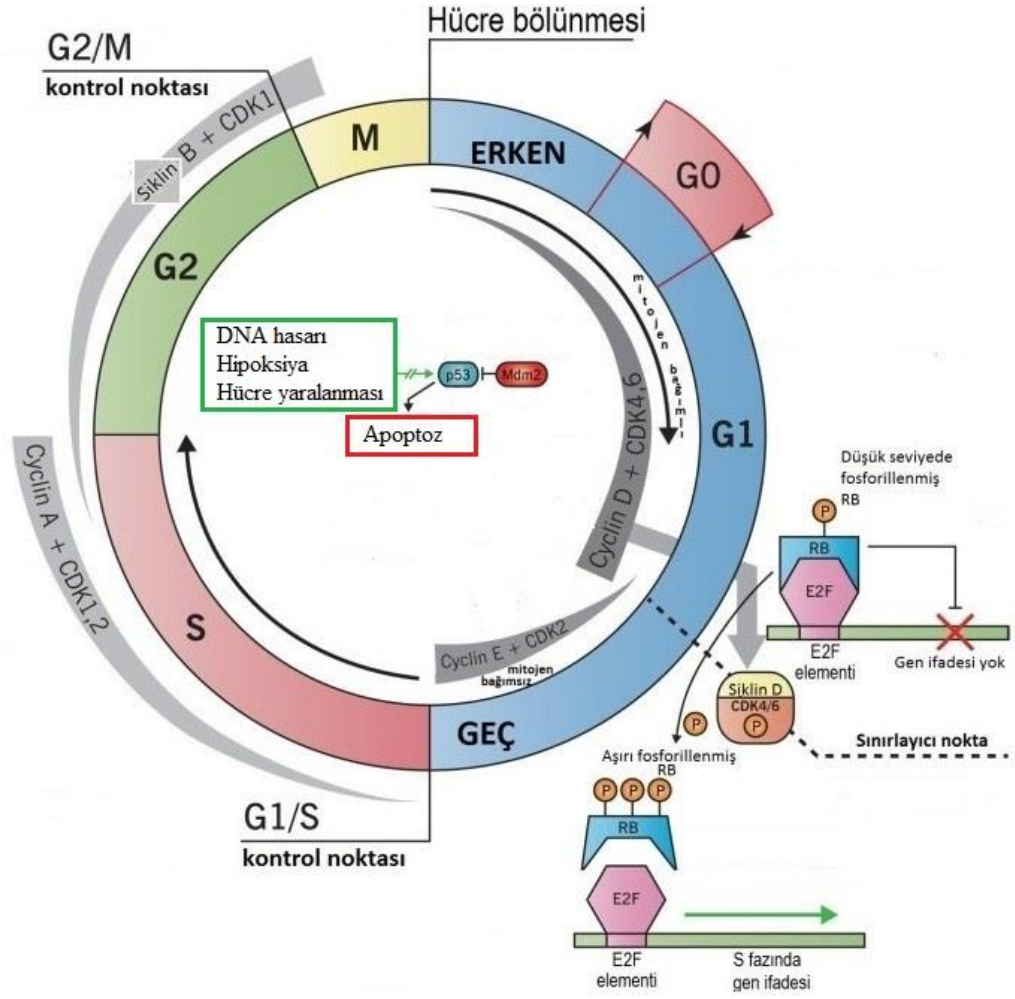
2. Siklin/CDK komplekslerinin aktivitesi, fosforilasyon ile de düzenlenir. Siklin/CDK komplekslerinin aktivasyonu, CDK-aktive edici kinazlar (CAK) tarafından fosforilasyona ihtiyaç duyar (32,33).

3. CDK'ler ayrıca CDK inhibitörleri (CDKI) olarak bilinen bir inhibitör protein sınıfı ile sıkı bir şekilde düzenlenir. CDKI'ler, CDK/siklin komplekslerini bağlayarak G1/S geçişini bloke edebilir (Şekil 2.1) (32,33).

Hücre döngüsünün kontrolünün kaybının sıklıkla gözlemlendiği yerlerden biri de restriksiyon noktasıdır. Restriksiyon noktası, hücre döngüsünün G1 fazının sonlarında bulunan anahtar bir kontrol noktasıdır ve hücre bölünmeden önce DNA replikasyonunun yönlendirildiği yerdir. Bu kontrol noktasındaki hatalar önemli sonuçlar doğurur (28).

İlk olarak, bu kontrol noktasının kontrolünün kaybı hücreyi anormal replikasyona yönlendirir. Bu kontrol noktası aynı zamanda kanser şekillenmesinde önemli olan iki yolağın bağlantı noktasıdır. pRb yolağı adını pRb tümör baskılayıcı proteinden almaktadır. pRb normalde hücrede fosforile değildir ve aktiftir. Aktif durumda pRb hücre bölünmesini önler. pRb proteini fosforlandığında inaktif hale gelir ve hücre bölünmesine izin verir. pRb oluşumunu etkileyen mutasyonlar pRb inaktivasyonunu da etkiler. Bu mutasyonu taşıyan hücreler fonksiyonel G1 restriksiyon noktasına sahip değildirler. G1'de kalmak ya da G0'a girmek için yetersizdirler, devamlı ve yetersiz replikasyon yaparlar (34).

Diğer bir hücre döngüsü yolağı, c-Myc yolağıdır ve adını c-Myc proto-onkogeninden almaktadır. c-Myc yolağı, hücre bir mitojen ile uyarıldığında aktiftir. c-Myc geninin ürünü bir transkripsiyon faktörüdür ve bu protein diğer genlerin ifade edilmesi için bir sinyal olarak işlev görmektedir. Mutasyonlar c-Myc aktivitesini arttırarak hücre bölünmesinde artışa ve kansere neden olduğundan dolayı c-Myc bir proto-onkogen olarak adlandırılmaktadır (35,36).



**Şekil 2.1.** Hücre döngüsü ve kontrol noktaları (37).

Normal hücreler; stres sinyalleri, radyasyon, DNA hasarı veya oksijen tükenmesine maruz kaldıklarında, hücrelerin büyük çoğunluğu G1, S ve G2'de hücre döngüsünün durmasına veya programlanmış hücre ölümüne (apoptozis) neden olabilir. Apoptozis; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür (38).

Apoptozis, genetik olarak düzenlenir ve kanserli hücrelerde bozulabilir. Hücreler içinde kontrol noktaları olarak adlandırılan gözetim sistemleri, DNA hasarını tanıma ve DNA hasarının onarım işlevini görür. DNA lezyonu saptandığında, p53 hücre siklusunu G1 fazında durdurur, böylece hücrenin S fazına girişini önler. Ardından, ya tamir mekanizması proteinlerini ya da apoptozise yol açan proteinleri indükler. Ayrıca Bcl-2 onkogeni ise apoptozisi inhibe eder (39).

p53'ün fonksiyon kaybı veya Bcl-2'nin aşırı artması apoptozisi engeller ve kanser hücrelerinin proliferasyonu devam eder (40).

### 2.1.3. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

Büyüme Sinyallerinden Bağımsız Öz Yeterlilik: Normal hücreler, büyüme ve proliferasyon için mitojenik uyarılara ihtiyaç duymaktadır. Bu sinyaller, sinyal moleküllerinin belirli reseptörlere bağlanması, büyüme faktörlerinin hücreye difüzyonu, ekstraselüler matriks (ESM) bileşenleri, hücre adhezyonları veya etkileşimleri yoluyla çekirdeğe iletilmektedir. Birçok onkojen normal büyüme sinyallerini taklit ederek hareket eder. Tümör hücreleri, çoğalma ve sürekli büyüme için hücre dışından gelen mitojenik uyarılara bağımlı değildir. Hücre dışı sinyallere bağımlılığın serbest bırakılması, normal hücre homeostazı ciddi derecede bozmaktadır. Bundan dolayı kanser hücrelerinin en temel özelliği, kronik proliferasyonu sürdürebilme yeteneğidir (30).

Normal hücrelerde büyüme teşvik eden proteinleri kodlayan genlere proto-onkogenler denir. Hücrelere çevresel sinyallerden kendi kendine yeterlilik kazandıran mutasyona uğramış genlere ise onkogenler denir. Mutasyona uğrayan genlerin sinyallerinin düzenlenmesiyle, kanser hücreleri kendi hayatlarını yönetebilir hale gelir ve hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi, hücre boyutunda artışları, hücrenin hayatta kalma oranını ve enerji metabolizmasındaki değişiklikleri yönetmek için sinyal verebilir (41).

Kanser hücresi bu kabiliyeti aşağıdaki şekillerde kazanabilir:

- ❖ Büyüme faktörü ligandlarını kendileri üreterek kendi kendilerine sinyal verebilir.
- ❖ Stromal hücrelerin büyüme faktörü ligandları gibi ligandları üretmesini sağlayabilir.
- ❖ Hücre yüzeyinde, reseptör homo-dimerizasyonuna veya hetero-dimerizasyonuna yol açan reseptör konsantrasyonunda bir artış olabilir. Bu durum hücreyi ligandlara aşırı duyarlı hale getirir.

- ❖ Liganttan bağımsız aktiviteyi destekleyen reseptör üzerinde yapısal değişiklikler olabilir.
- ❖ Sinyal yolunun yapısal olarak aktivasyonunu sağlayabilir (30).

Büyüme Faktörlerinden İnhibitör Sinyallerine Karşı Duyarsızlık: Normal hücrede, hücre sel durgunluk ve homeostazı korumak için birden fazla anti-büyüme sinyali çalışmaktadır. Hücrenin büyümesini ve çoğalmasını olumsuz şekilde kontrol eden çoğu hücre sel program, tümör baskılayıcı genlerin etkilerine bağlıdır (30). Temel seviyede, anti-büyüme sinyallerinden çoğu Rb proteini ile yakın ilişki içindedir. Rb proteini, çeşitli hücre dışı ve hücre içi kaynaklardan gelen sinyalleri bütünleştirir ve hücreyi döngü ilerlemesini sağlar. Rb'nin bozulması, hücreyi transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) tarafından sağlanan anti-büyüme sinyalleri gibi sinyallere duyarsız hale getirerek hücre proliferasyonu ile karakterize eder (42). Diğer önemli tümör süpresör p53, hücre içi sinyalleri bütünleştirir ve hücre döngüsü durdurma, hücre sel stres veya hasar derecesine bağlı olarak apoptozu teşvik edebilir. Dolayısıyla Rb veya p53'ün kaybı, hücrenin anti-büyüme sinyallerinden kaçınma yeteneği aracılığıyla malign fenotip ile ilişkilidir (43).

Tümör süpresör gen kaybına ek olarak, hücreler farklı alternatif hücre sel programlarla anti-büyüme sinyallerinden kaçabilirler. Kanser hücre selinin diğer bir özelliği, kontak inhibisyonundan kaçınmasıdır. Çoğu normal hücrede hücre-hücre teması, başka hücre çoğalmasına karşı bir önleyici sinyal oluşturur. Nörofibromatoz tip 2 (NF2) ve karaciğer kinaz B1 (LKB1) genleri kanserlerin ilerlemesine katkıda bulunan kontak inhibisyonunun kaybolmasını teşvik edebilir (21). Her ne kadar TGF- $\beta$  kanserde antiproliferatif etkilere sahip olsa da, TGF- $\beta$  yolağının malignite sonrasındaki evrelerinde bozulabileceği ve kanser ilerlemesine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. TGF- $\beta$ 'nın, invazyon ve metastazı teşvik eden epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMT) olarak adlandırılan hücre sel programı aktive ettiği bulunmuştur (30).

Apoptozisten Kaçış: Kanser hücreleri, çeşitli stratejilerle hücre ölümü ve apoptoz direnci kazanabilir. En yaygın yollardan biri, tümör süpresör proteini p53'ün fonksiyon kaybıdır. p53 protein fonksiyon kaybı genellikle mutasyon yoluyla gerçekleşir. Aynı zamanda, viral proteinler tarafından tutulması, inaktivasyonu veya



MDM2 (Murine double minüte-2) gibi diğer onkojenlerin çoğaltılması da p53 proteininin fonksiyon kaybına yol açabilir (44).

Hücrenin UV radyasyonu, hipoksi ve DNA'ya zarar veren ajanlara maruz kalması, hücre döngüsünün durdurulması veya apoptoza geçmesi için p53 harekete geçirilir. Bu mekanizmanın başarısızlığı, hücrenin malignite ilerlemesine katkıda bulunur ve hücre döngüsünün ilerlemesinde tanımlanmış kontrol noktalarında düzeltilmeyen ek genetik defektlerin birikimine sebep olabilir (30,45).

Sınırsız Replikasyon Potansiyeli: Hücrenel yaşlanmaya ilişkin çalışmalar sonucunda, telomeraz enzimi ekspresyonu, kanser hücrelerinin ölümsüz fenotipinin altında yatan merkezi bir birleştirici mekanizma olarak ortaya çıkmıştır. Telomeraz, ökaryotik kromozomların uçlarındaki telomerlerde koruyucu yapıları koruyan bir ribonükleoprotein enzimidir (46). Telomeraz kompleksi, TTAGGG telomerik tekrar dizisine tamamlayıcı bir alan ve bir katalitik protein bileşeni içeren bir RNA alt biriminden oluşur. İnsanlarda telomeraz ifadesi çoğu somatik dokuda bastırılır ve telomer her hücre bölünmesi ile kısılır. Fakat, kanser hücrelerinde ve kök hücrelerde telomerler, telomeraz enziminin etkisiyle yenilenmektedir. Böylelikle, telomerlerin uzunluğu sabit kalmakta ve hücre sınırsız sayıda çoğalmaktadır (46,47).

Enerji Metabolizmasını Yeniden Programlama: Bir kanserin sürekli büyümesi ve çoğalması, bu büyümenin sağlanabilmesi için enerji metabolizmasında karşılık gelen bir ayarlamayı gerektirir. Normal koşullar altında hücreler, aerobik ortamda, glikozu pirüvata metabolize ederek net bir ATP kazanımı sağlarlar (30).

Kanserli dokuda intrasellüler ortamda oksijen az, glukoz bol olduğundan, beklenen temel metabolik yolak anaerobik glikoliz olup, bol miktarda pirüvattan laktatın sentezlendiği metabolizma Warburg etkisi olarak adlandırılır (48). Bu durumun oluşmasında en büyük rol, spesifik bir transkripsiyon faktörüne aittir. Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) olarak bilinen bu faktörün temel görevi kan damarı gelişimini sağlamak ve metabolik adaptasyondur. HIF-1 $\alpha$ , glukoz metabolizmasıyla birlikte aminoasit ve nükleotid metabolizması ve pH'ın düzenlenmesinde de görevlidir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salınımı üzerinden anjiyogenezi kontrol eder, anjiyogenez önceden mevcut olan

küçük damarlardan yeni kan damarlarının oluşmasıdır (49). Kanser hücresinin kandan glukozu 5-10 kat daha fazla almasından sorumlu başka mekanizmalar da bulunmaktadır. Örneğin, glukoz taşıyıcılarından (GLUT) GLUT1, GLUT3 ve GLUT4'ün aktivasyonları söz konusudur. Bu aktivasyon, tümör supressör gen olan p53'ün, GLUT'lar üzerindeki inhibitör etkisinin kalkmasına bağlıdır. Ayrıca HIF-1 $\alpha$  da kanser hücre yüzeyindeki GLUT miktarını artırarak bu mekanizmada da rol oynar (50,51).

Tümör hücresine özgü bu metabolizma, tümör büyümesi açısından önemli avantajlara sahiptir. Hücreler, değişen oksijen düzeylerinden etkilenmeden yaşamlarını sürdürebilirler. Glikoliz ile tümör hücreleri, bikarbonik asit ve laktik asit oluştururlar. Tümör hücreleri tarafından üretilen laktik asit tümör mikroçevresinde asidik bir ortam oluşturarak tümör invazyonunu kolaylaştırırken yine mikroçevrede bulunan anti-kanser immün efektör mekanizmaları baskılamaktadır (30,52). Ayrıca tümör hücreleri tarafından oluşturulan laktat, ortamdaki stromal hücreler tarafından alınarak pürivata dönüştürülür. Stromal hücreler tarafından üretilen piruvat oksidatif fosforilasyonda kullanılabilmesi gibi, besin olarak kanser hücresine de verilebilir. Böylece kanser hücresindeki anaerobik komponentler ve stromal hücredeki aerobik komponentler arasında tümörün canlılığını devam ettirmesi ve büyümesi için gerekli enerjiyi sağlar (21).

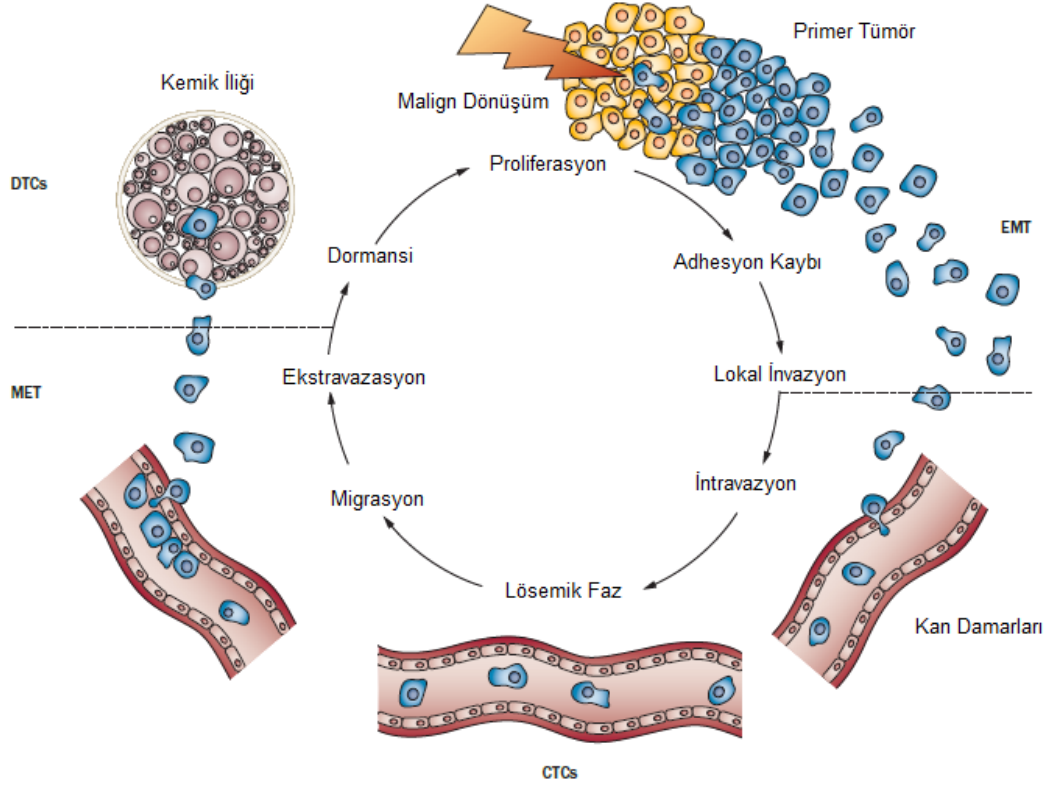
Kanser hücresi, glukozu pentoz fosfat yolağı ile metabolize edebilme yeteneğine de sahiptir. Tümör hücreleri bu yoldan hücreyi kemoterapötiklere karşı koruyan antioksidan olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oluşumunu sağlar (53).

Kanser hücresi, glikolitik yolun ara ürünlerini anabolik reaksiyonlar için kullanır. Eğer glukoz oksidatif fosforilasyon ile tam olarak karbondioksit metabolize edilirse, biyosentetik reaksiyonlar için gerekli ara bileşikler elde edilemez. Dolayısıyla kanser hücre metabolizması, büyüme ve proliferasyon üzerine kurulmuştur ve temel besin kaynağı ise glukozdur (54).

Sürekli Anjiyogenez: Hücrelerin malign fenotipe ilerlemesindeki en önemli değişikliklerden birisi de anjiyogenezin gelişimi ve devamıdır. Normalde tümörler

damarlanma olmaksızın 3-4 mm'den daha fazla büyümezler. Bu büyüklüğe ulaşınca kadar besin ve oksijen ihtiyacını difüzyon ile sağlarlar (55). Tümörün büyüüp ilerlemesi için yeni kapillerlerin oluşması gerekmektedir. Anjiyogenez sadece tümör büyümesi için değil aynı zamanda metastaz için de gereklidir (56). Tümörlerde kan akımının sağlanması birtakım faktörler ile sağlanmaktadır. Tümör büyümesi, anjiyogenik faktör ve anjiyogenezi inhibe eden faktörler arasındaki denge ile sağlanmaktadır (57). Tümör anjiyogenezi ile ilgili şimdiye kadar açıklanan anjiyogenik faktörlerden en önemlisi VEGF'dir. VEGF ile birlikte fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) anjiyogenezde dört evrenin gerçekleşmesini sağlayan en önemli faktörlerdir (58). Ayrıca dokulara gelen oksijenin azalmasıyla artışı gerçekleşen HIF-1 regülasyon proteininin VEGF'nin ekspresyonunu onkogeninin kontrolü altındadır. Tümörlerin anjiyogenik özellik kazanması için anjiyogenik faktörlerin artıp, anjiyogenik inhibitörlerin azalması gerekmektedir. Anti-anjiyogenik faktörlerin üretimini tümör hücreleri gerçekleştirir veya ekspresyonu uyarır. Anti-anjiyogenik faktörler kanser tedavisinde ilaç geliştirilmesinde oldukça büyük öneme sahiptir ve çalışmalar devam etmektedir (59,60).

Doku İnvazyonu ve Metastaz: Bir metastazın gelişebilmesi için tümör hücrelerinin primer kitleden ayrılıp, çevre dokuya invazyonu ile başlayan kompleks bir süreci tamamlaması gerekmektedir. Metastaz süreci iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama mikrometastatik lezyonların intravazasyon, diseminasyon ve ekstravazasyon safhalarını içeren migrasyonu, ikincisi ise makroskopik tümörlerde büyüme ile karakterize olan kolonizasyondur (Şekil 2.2) (30,61).



**Şekil 2.2.** Metastatik döngü (62).

Tümör hücreleri genetik ve biyokimyasal olarak heterojen olup, metastaz yapma potansiyelleri de bu faktörlere bağlı olarak değişkendir. Tümör hücreleri primer dokudan kopup, hipoksi, yetersiz besin kaynağı, hipoperfüzyon, savunma sistemi gibi çevresel zorluklara rağmen uzak bölgelere metastaz yapabilirler. Metastatik süreçte bu hücrelerin, çevre dokulara invazyon, yayılım, yeni doku bölümlerine yapışma ve yeni damar oluşumunu başlatabilme özellikleri mevcuttur (63).

Normal dokuda yapısal bütünlüğün sağlanması için epitel hücreleri bir takım proteinler ile sıkı birliktelik gösterir. E-kaderinler gibi bu tarzda proteinlerin etkinliğinin azalması artmış metastatik potansiyel ile ilişkilidir. E-kaderin fonksiyonu epitel kanserlerinin çoğunda, E-kaderin veya  $\beta$ -katenin genlerinin mutasyonu ile inaktivasyonu, transkripsiyonel baskılama veya hücre dışı kaderin alanının proteolizi ile kaybolur. İnvazyon gösteren tümör hücreleri epitel bazal membranı parçalayan protein yıkıcı enzimler salgırlar. Göç eden hücreler sonrasında dolaşıma katılabilmek için ince duvarlı damarların endotel bazal membranını kateder. Kapiller

yatakta yoğunlaşan ve bulunduğu doku parankimine ulaşma imkanı bulan hücreler anjiyogenik programları başlatırlar ve çoğalırlar (64,65).

Primer tümör dokusu içinde kanser kök hücresi, kısmen farklılaşmış progenitör hücreler, tam farklılaşmış ve son aşamaya gelmiş hücreler gibi farklı seriler bulunmaktadır. Kanser kök hücreleri, ESM'in parçalanması, kan damarları ve lenf nodüllerinin invazyonu, göç, damar dışına çıkıp, yeni yerleşkede çoğalabilme gibi özellikleriyle primer tümörün malignite potansiyelinin artışına katkıda bulunmaktadır (65,66).

## **2.2. Kolorektal Kanser (CRC)**

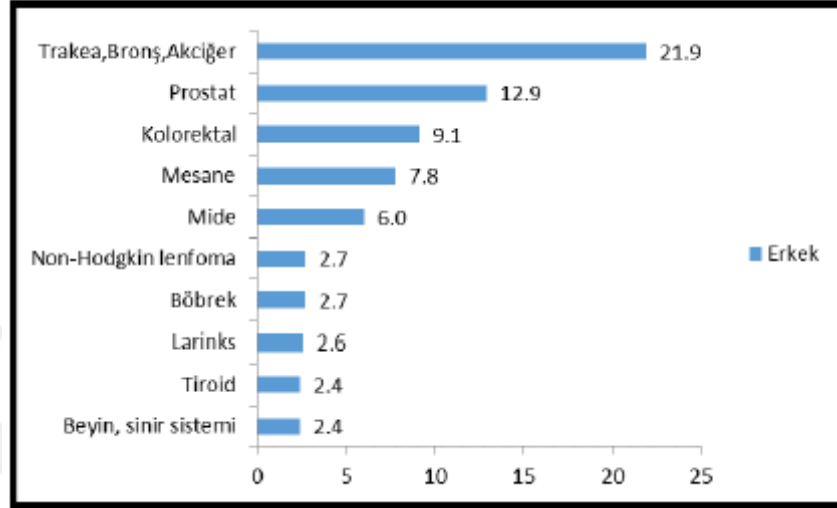
### **2.2.1. CRC Epidemiyolojisi**

WHO'nün kapsamlı bir projesi olan Globocan verilerine göre 2012 yılında dünya genelinde 14.1 milyon yeni kanser hastası ve 8.2 milyon kansere bağlı ölüm olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda WHO verilerine göre her yıl 1.3 milyon kişi kolorektal kansere yakalanmakta ve yaklaşık 700 bin kişi CRC nedeniyle ölmektedir (3).

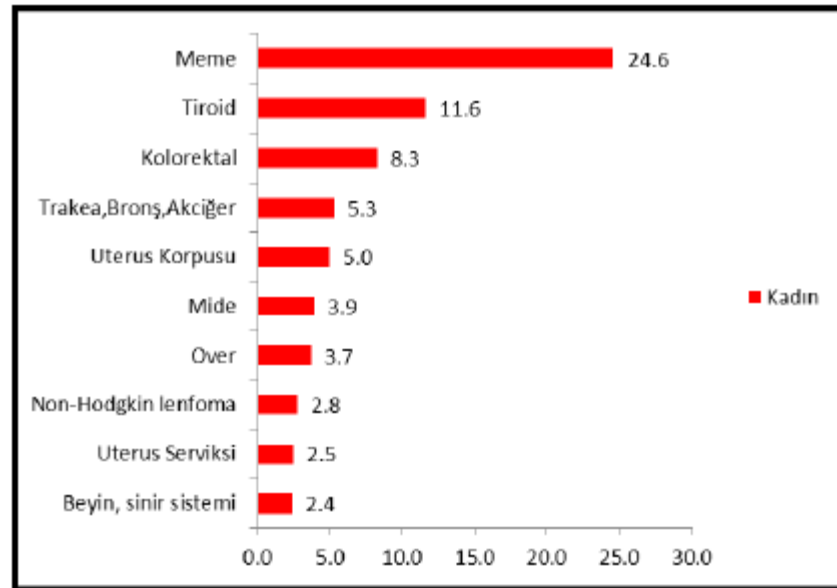
WHO'nün 2015 yılı yayınladığı verilere göre, dünyada 8 milyon 200 bin olan kanser ölümlerinde 1 milyon 590 bin vakayla akciğer kanseri ilk sırayı alırken, CRC'ler dördüncü sırayı almıştır. Kolorektal karsinom gelişmiş ülkelerde ciddi morbidite ve mortaliteye yol açan önemli bir hastalıktır. Bir insanın yaşam boyunca kolorektal kansere yakalanma olasılığı %5'dir. CRC sıklığı yaş ile artmaktadır (3).

Sağlık Bakanlığı'nın 2013'te yayınladığı Türkiye Birleşik Veri Tabanı'na göre 25-49 yaş aralığında kanser yüzde dağılım verilerinde erkeklerde %8.7 ile ikinci sırada yer alırken, kadınlarda %5,1 ile üçüncü sırada yer almaktadır. 50-69 yaş grupları arasında bu oran erkeklerde % 9,2 'ye yükselirken kadınlarda %8,9 olmuştur. Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde ve kadınlarda ayrı ayrı en sık görülen kanserlerin yüzde dağılımlarına bakıldığında, CRC'nin her ikisinde de üçüncü sırada olduğu sonucuna ulaşılmaktadır (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4). Aynı veri tabanına göre CRC,

histolojik tiplendirmesi yapıldığında adenokarsinom %96,1 oranında görülürken kalan yüzdede karsinoid tümör, epitelyal karsinom, taşlı yüzük hücreli ve diğerleri görülmüştür. Evrelerin yüzde dağılımı değerlendirildiğinde %44 bölgesel, %33 lokalize iken %23'ü uzak metastaz yapmıştır (67).



**Şekil 2.3.** Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (67).



**Şekil 2.4.** Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (67).

### **2.2.2. CRC Etyolojisi**

CRC gelişiminde diyet, çevresel faktörler, yaş, adenom ve karsinom öyküsü, özellikle inflamatuvar bağırsak hastalıkları, faktörler predispozan hastalıklar ve aile öyküsünün etkisi olduğu düşünülmektedir (68).

Çoğu CRC'nin, en az üçte ikisi, bağırsak duvarı büyüyen villöz bir görünüme sahip benign, adenomatöz polipler ya da displastik hücreler ihtiva ederler. Elli yaş altında sık görülmez iken yetmiş yaş ve üstünde görülme sıklıkları %53-%63 arasında olan adenomlar erkeklerde kadınlardan üç kat fazla görülmektedir. Adenomların kansere dönüşme riski polipin çapı, sayısı, histolojik tipi ile ilişkilidir (69,70).

Kolon kanserinin %90'dan fazlası 50 yaşından büyük hastalarda meydana gelmektedir. Yaşla birlikte artan kolonik mutasyonlar buna sebep olarak gösterilmektedir (71). Sigara ve alkol tüketimi CRC gelişiminde yüksek oranda etkili risk faktörleri arasındadır (68). Diyet, obezite, D vitamini eksikliği, diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalıkları da CRC artışına sebep olan faktörler arasındadır (72,73).

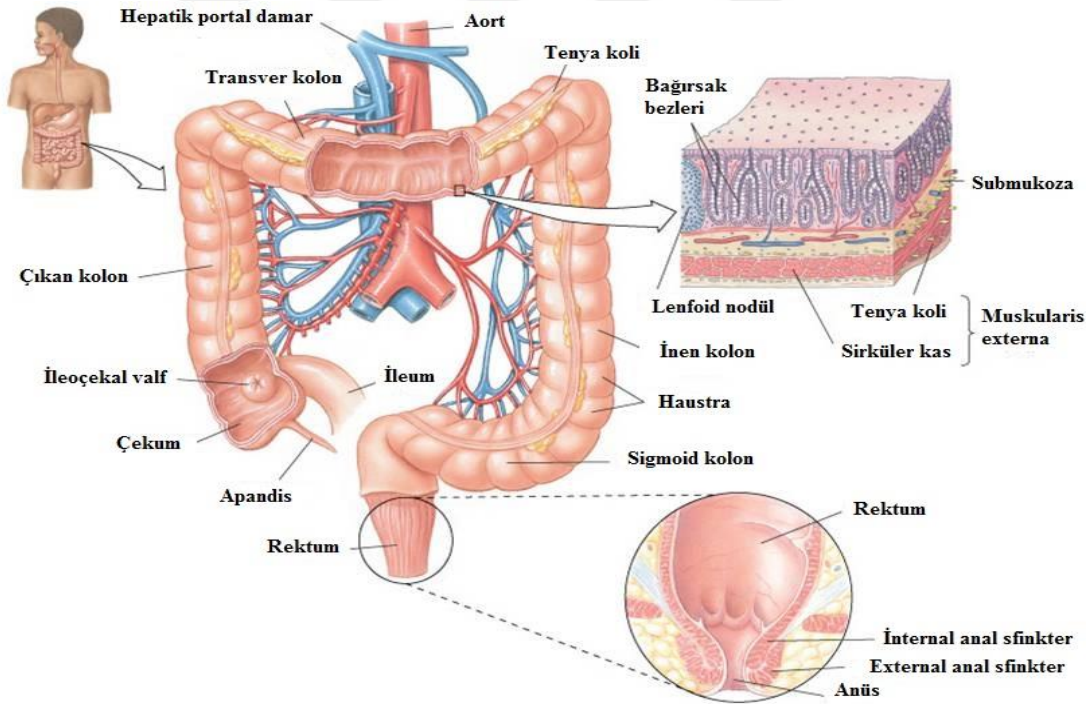
### **2.2.3. Kolon ve Rektumun Anatomisi ve Histolojisi**

Kalın bağırsaklar; sindirim sistemini ince bağırsaklardan sonra gelen ve çekumdan başlayarak anüse kadar devam eden kısmı olup 6,5 cm genişliğinde, yaklaşık 1,5 m uzunluğundadır. İnce bağırsaklardan en önemli farkı, üzerlerinde tenia coli adı verilen şeritlere sahip olmalarıdır. Karın boşluğu ve pelvis boşluğuna yerleşmişlerdir. Sağ iliak fossa'dan başlar önce yukarı doğru devam eder, sonra sola ve tekrar aşağıya yönelerek sol iliak fossa'ya gelerek 'S' şeklinde bir kıvrımla pelvis'e geçer. Pelvis'te rektum adı ile düz bir seyir oluşturarak anüste sonlanır (Şekil 2.5) (73,74).

Kalın bağırsak kısımları; çekum, apendiks vermiformisin, çıkan kolon, transver kolon, inen kolon, sigmoid kolon, rektum, anal kanal ve anüsten oluşmaktadır (73).

Rektum; yaklaşık 10-14 cm uzunluğunda olan bu kısım sigmoid kolonun devamı olarak promontoryum seviyesinde başlar. Sakrum ve koksiks eğriliğini izleyerek diyafram ve pelvisi geçip anal kanal ile devam eder. Sigmoid kolondan farklı olarak rektumda haustra coli (büzölmüş tenia coli şeritleri), appendices epiploicae (yağ parçacıkları), mezenteriyum ve tenia coli bulunmaz (74,75).

Kalın bağırsağın tabakaları; mukoza, submukoza, kas tabakası ve seroza olmak üzere dört kısımdan oluşmaktadır. Kolonun mukozası katlamalar ya da villuslar içermeyen bir yapıya sahiptir. Çok sayıdaki düz, tübuler bezler ya da Lieberkühn kriptaları kolon mukozası için karakteristik bir özelliktir (76).



Şekil 2.5. Kolon ve rektumun anatomisi ve histolojik yapısı (77).



#### 2.2.4. Kolonun Polipleri ve Neoplazileri

Bir organın lümenine doğru büyüyen kitleye polip denir. Polipler nondisplastik ya da displastik olabilirler. Mukozaya tutunma şekline göre saplı ve sesil olarak sınıflandırılabilirler. Saplı polipler mukozaya, sıklıkla çıkarılmasını kolaylaştıran, belirgin bir sapla tutunurlar. Sesil polipler ise geniş tabanlı olup, sapları yoktur. Bu durum çıkarılmalarını ve displastik olgularda patoloğun sınırlarını değerlendirmesini güçleştirir (24).

İnflamatuvar polipler; mukozal yüzeyden kabarıklık oluşturan inflame ve rejenera mukoza alanlarıdır. Bu lezyonlar nondisplastiktir ve malignite potansiyelinin olmadığı varsayılır (78).

Hamartomatöz polipler; benign, ancak disorganize doku nodülleridir. Sıklıkla tek polip olarak görülürler ya da bir sendromun parçası olarak yüzlerce görülebilirler. Displazi gelişebilir ve hamartomatöz polipozis sendromunda displazi gelişmesi daha kuvvetle muhtemeldir (78).

Prekürsör lezyonlar, adenomatöz poliplerde ve serrated poliplerin belli tiplerinde karsinom gelişimi yönünde süreci ilerleten genetik anormallikler vardır (24).

Serrated polipler, arasında hiperplastik polipler, sesil serrated polipler, mikst hiperplastik adenomatöz polipler ve geleneksel serrated adenomlar yer alır (27).

Hiperplastik polipler, azalmış yüzey migrasyonu ve dökülme ile katlanan, kript bazallerinde artmış epitelyal proliferasyon sonucu gelişen serrated poliplerdir. Genellikle küçüktürler ve özellikle rektumda sık görülürler (79).

Adenomlar, genelde saplı küçük tümörlerden sesil büyük lezyonlara kadar değişen çeşitli yapı ve büyüklüklere sahip neoplastik poliplerdir. İnce barsaklarda adenom sıklığı oldukça düşüktür. Kolondaki adenomların yaygınlığı, 40 yaştan önce %30-40 iken, 60 yaştan sonra %40-50'ye yükselmektedir. Sporadik adenomlar

ailesel bir eğilime sahiptir. Birinci derece akrabalarda adenom oluşma riski normalin 4 katıyken, adenomlu hastalarda kolorektal karsinom gelişimi ise normalden 4 kat daha fazladır (24).

Bütün adenomatöz lezyonlar in-sitü karsinoma kadar değişen derecelerde displaziden kaynaklanan lezyonlardır. Ayrıca, invaziv kolorektal karsinomların çoğunun daha önceden var olan adenomatöz lezyonlardan kaynaklandığını gösteren çok güçlü kanıtlar mevcuttur. Adenomatöz polipler, epitelyal karakterleri temel alınarak 3 tipe ayrılmıştır (80).

Tübüler adenomlar, kolonda herhangi bir bölgeden kaynaklanabilen, yaklaşık yarısı rektosigmoidde yer alan adenomlardır. Villöz adenomlar; daha büyük ve daha kötü huylu epitelyal poliplerdir. Tübülovillöz adenomlar; tübüler ve villöz bölgelerin karışımından oluşmuşlardır (24,80). Bunlar arasında en sık tübüler adenomlar görülmektedir ve geriye kalan adenomların %5-10'u tübülovillöz ve %1'i villöz yapısındadır. Çoğu tübüler adenomlar küçük ve saplıdır, villöz adenomlar ise daha büyük ve sesil yapıda olmaya meyillidirler. Diğer taraftan çoğu büyük ve sesil yapıdaki villöz özellikler gösterirler (24).

### **2.2.5. Kolorektal Karsinogenez**

Bütün kolorektal karsinomlar, genetik alterasyonlar göstermektedirler. Bu alterasyonlar, karsinogenezin genel mekanizmasını anlamaya yönelik araştırmaların başlıca konularındandır (81).

Adenomatöz Polipozis Koli (APC): FAP ve Gardner Sendromlarının altında yatan kalıtsal eksikliğin kromozom 5q21'de olduğu tanımlanmıştır. APC tümör baskılayıcı gen burada bulunmaktadır. Kodlanan proteinin hücre adezyonunda rolü olduğuna inanılmaktadır. APC'de gözlenen mutasyon, sporadik kolon kanserinin gelişiminde meydana gelen bir olaydır (81,82).

Hereditör Nonpolipozis Kolon Karsinomu (HNPCC): DNA tamir mekanizması ile ilişkili; hMSH2 (kromozom 2p22), hMLH1 (kromozom 3p21),

hPMS1 (kromozom 2q31-33) ve hPMS2(kromozom 7p22) genlerinde meydana gelen herhangi bir kalıtsal mutasyon HNPCC ailesel sendromundan sorumludur (24).

İnsan genomundaki dinükleotid sıralanmasında 50000-100000 kadar dinükleotid tekrarı vardır. Yanlış eşleme tamiri genlerinde meydana gelen mutasyonlar, bu tekrarlardaki yaygın alterasyonların varlığı sayesinde saptanabilir. Buna mikrosatellit dengesizliği adı verilir. Mikrosatellit dengesizliği gösteren çoğu HNPCC tümörlerinde, normalden 1000 katı fazla mutasyon oranı gözlenir (24,83).

Metilasyon Anomaliler: Kolon neoplazmlarında erken tanınan bir değişimde, DNA'daki metil gruplarının kaybıdır (84).

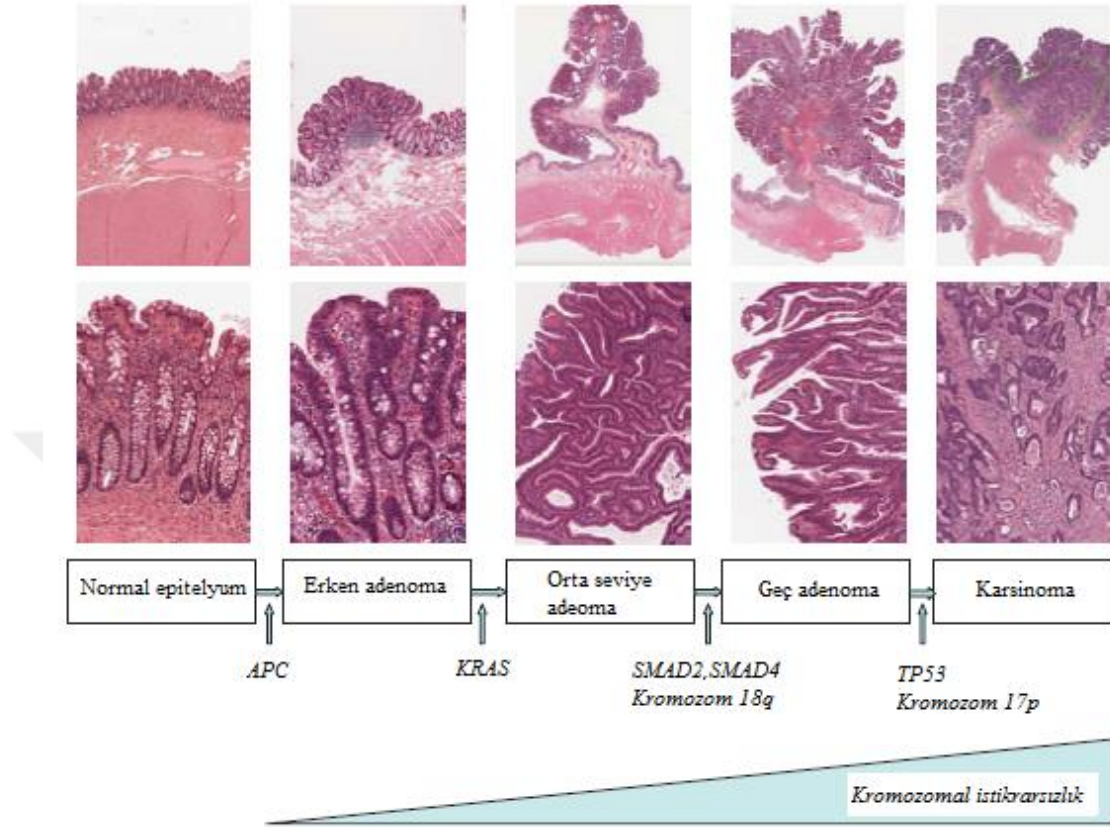
KRAS: K-ras geni, adenomlarda ve kolon kanserlerinde en çok rastlanan aktive onkogendir. K-ras (kromozom 12p12), intraselüler sinyal transdüksiyonunda rol oynar ve 1 cm'den küçük çaplı adenomların %10'undan azında, 1 cm'den büyük çaplı adenomların %50'sinde ve karsinomların %50'sinde mutasyona uğramıştır (85,86).

DCC (Deleted in Colon Cancer): DCC adı verilen tümör supresör gen kromozom 18q21'de lokalize olup, kolon kanserlerinde sıklıkla inaktiftir. Kodladığı protein kolon mukozasında yaygın olarak eksprese edilen bir hücre adhezyon molekülüdür. Kolon kanserlerinin %70-75'inde ekspresyonu azalmıştır ya da yoktur (24).

P53: kolon kanserlerinin %70-80'inde kromozom 17p kayıpları görülmektedir. P53'ü etkileyen bu kromozom delesyonları, p53 mutasyonlarının kolon karsinogenezinde geç bir dönemde gerçekleştiğini göstermektedir (24).

Sonuç olarak CRC karsinogenezinde birden fazla basamak, birden fazla anahtar olay olduğu sonucuna varılmasını sağlamıştır. APC mutasyonları, sporadik kolon kanserlerin %80'inde en erken ve bir olasılıkla başlangıç olayıdır. Adenomdan karsinoma gidişte meydana gelen mutasyonlar sırasında, bir takım ek mutasyonlar gerçekleşir. Fakat bunların mutlaka sırası ile oluşması zorunluluğu yoktur. Sadece bir tek olaylar dizisi değil, genomdaki alterasyonların tamamının birikimi ile neoplastik

lezyonun boyutlarının, displazi seviyesinin ve invazyon potansiyelinin artışı gerçekleşir (Şekil 2.6) (24).



Şekil 2.6. Klasik kolorektal adenom-karsinom dizisi (87).

### 2.2.6. CRC'lerde Evrelendirme

Kolorektal kansinomları evrelemede üç farklı sistem kullanılır:

- Dukes sistemi
- Astler-Coller sistemi
- TNM sistemi

Dukes 1932'de rektal kansinomların evrelemede yeni bir sistem oluşturdu ve Dukes'in bu evrelendirmesi kolon kansinomlarına da uygulanmıştır. Prognozla direkt ilişkisi olduğundan dolayı Dukes sistemi günümüzde pek çok kişi tarafından kullanılmaktadır. Bu sistemde sınıflama lenf bezi tutulumu ve tümörün derinliğine göre A,B,C olarak yapılmıştır. 1936 yılında Dukes, kendi sınıflamasını modifiye

ederek C evresini C1 ve C2 şeklinde değiştirmiştir. Dukes sınıflaması kolay ve anlaşılır olması nedeniyle önemini korumaktadır. 1954 yılında Astler ve Coller yeni bir evreleme sistemi geliştirmiştir ve temelde Dukes sistemine benzemekle birlikte, derinlikleri farklı olan tümörlerde lenf düğümü tutulumunu da değerlendirmesiyle farklılık göstermektedir (Tablo 2.2) (88).

TNM sınıflamasını kullanan Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) kolon kanseri evrelemesi 2003 yılında güncellenmiştir. Evre II ve III hastalar bölünerek ayrıca sınıflandırılmış ve vasküler ya da lenfatik invazyonlar dahil edilmiştir. Tümör ya da T evresi, tümör boyutunun aksine barsak duvarına penetrasyon derinliğini tanımlamaktadır. AJCC evreleme sistemi, tutulu lenf nodu sayısını sağkalımın önemli bir göstergesi olarak sorumlu tutmaktadır. Dört ya da daha fazla sayıda pozitif lenf nodu veya bağırsak duvarına gros ve mikroskopik penetrasyon düşük sağkalıma neden olmaktadır. Bazı evre II hastalar heterojen sonuçlar sergilemektedirler ve yüksek relaps riskiyle, nod pozitif hastalarının benzer sonuçlara sahiptirler (89).

**Tablo 2.2.** TNM evrelendirmesi (90).

Evre	TNM	Dukes sınıflaması	Tümör invazyon derecesi	5 yıllık yaşam
<b>0</b>	T0,N0,M0		Gözle görülür tümör yok	%97
<b>I</b>	T1,N0,M0	A	Tümör mükülaris mukoza ve submukoza sınırlı	%90
<b>I</b>	T2, N0,M0			
<b>II</b>	T3,N0,M0	B1 B2	Tümör mükülaris propriaya sınırlı	%78
<b>II</b>	T4,N0,M0			%63
<b>III</b>	T1-4,N1,M0	C1 C2	Tümör serozaya ulaşmış, komşu organ tutulumu olabilir.	%56-65
<b>III</b>	T1-4,N2,M0			%26-37
<b>IV</b>	T1-4,N1-2,M1	D	Uzak metastaz var	%1
<b>T1s: İnsitu karsinom</b> <b>T1: Submukoza invazyonu</b> <b>T2: Mükülaris propriaya invazyon</b> <b>T3: Seroza invazyonu</b> <b>T4: Komşu organ invazyonu</b>			N0: Lenf nodu tutulumu yok N1: 1-3 lenf nodu tutulumu N2: > 4 lenf nodu tutulumu M0: Uzak metastaz yok M1: Uzak metastaz var	

### **2.3. Dolaşan Tümör Hücreleri (CTC)**

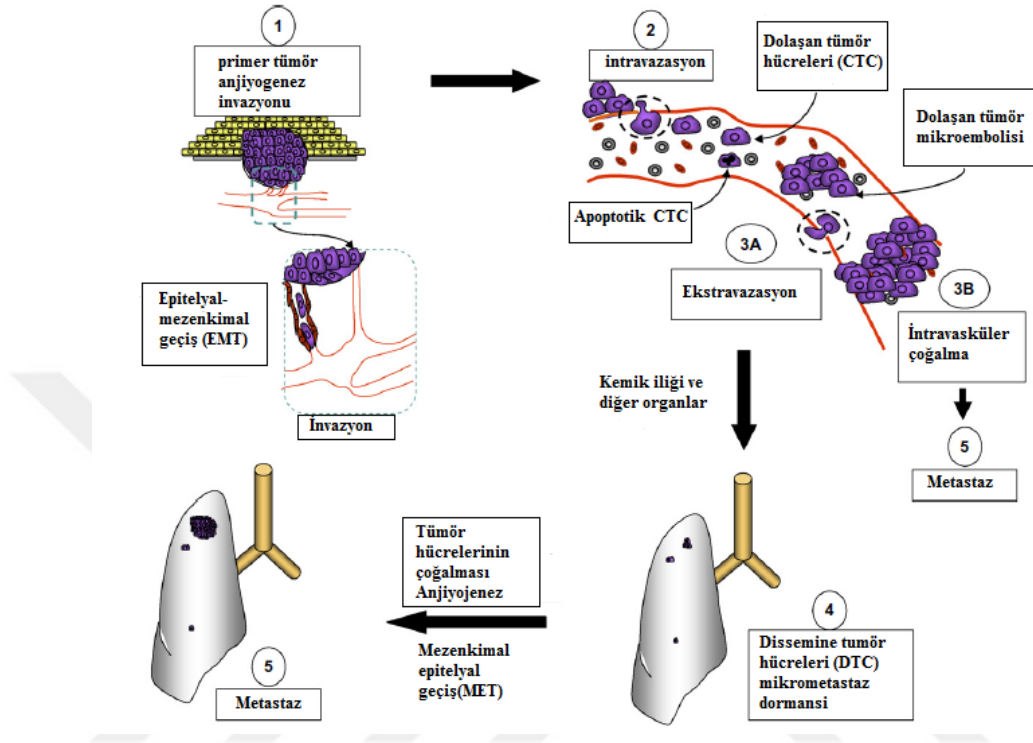
CTC'ler primer tümörler ve/veya metastatik bölgelerden türemiş periferik kanda dolaşan tümör hücreleridir (91). Kanser hastalarında CTC'lerin varlığı ilk olarak Thomas Ashworth tarafından 1869 yılında saptanmıştır (92). CTC'leri 1959 Salgado ve arkadaşları tarafından filtreleme, 1960 yılında Alexander ve Spriggs tarafından ise sedimentasyon yoluyla algılama yöntemleri hakkında ilk raporlar yaklaşık 100 yıl sonra ortaya çıkmıştır (93).

CTC'lerin metastatik lezyonların başlatılmasında yüksek etkisinin olduğu bir çok çalışmada kanıtlanmıştır. Fakat CTC'lerin metastatik yayılıma ve metastazın ilerlemesine katkısı olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır (11). CTC'lerin kanda buldukları süre kısadır ve morfolojisi oldukça heterojendir. CTC'lerin bu süreçte rastgele ya da belirlenen özel bir biyolojik programının olup olmadığı hala tartışmalı bir konudur (94).

#### **2.3.1. CTC ve Metastaz İlişkisi**

Kanserle ilişkili mortalitenin ana nedeni tümör metastazıdır, ancak bu süreç henüz net aydınlatılmamıştır (12). Malign bir tümörün metastatik yeteneği kazanması invaziv ve motilite özellikleri ile başlar (23,30). Kanser hücrelerinin tek tek ya da küme halinde ayrılması, primer tümör dokusundan uzaklaşma yeteneği kazanması, çevre dokulara göç etmesi, kan dolaşımı ya da lenfatik sisteme girişi, belirli bir tümörün metastatik özelliğini belirgin hale getirir (7). CTC'lerin yabancı dokularda metastaz başlatabileceği düşünülmektedir (95). Kanserlin CTC sayısı ile korelasyonu yapıldığında, CTC sayısının metastazda artış gösterdiği ve nüks etme süresini kısalttığı belirlenmiştir (12). Ayrıca CTC'lerin henüz metastatik hücreler oldukları kanıtlanmasa da akside henüz kanıtlanmış değildir (96). CTC'lerin metastaz hücrelerinin kaynağı olduğu kanıtlanırsa, tümör evreleme kriterlerinde ayrılmaz bir parça haline geleceği aşikardır. Bundan dolayı şu anda primer tümörlere odaklanılmıştır (11). Epiteyal kanserli hastaların kanlarında CTC olması ve sıklığı kanser metastazında önemli bir aşamadır ve hastalığın evresi ve tedavi değerlendirmeleri ile ilgili değerli bilgiler sağlar (8-10). Bu nedenle CTC

biyolojisinin aydınlatılması da metastaz karakterizasyonu ve tedavilerde hücre odaklı yöntemlere katkıda bulunacaktır (Şekil 2.7) (97,98).



Şekil 2.7. Metastazların gelişimine yol açan başlıca adımlar (63).

### 2.3.2. CTC ve CRC İlişkisi

CTC'nin analizi, hastalığa karşı yanıtı değerlendiren ve hastalar için terapiyi hedefleyen, minimal invaziv bir “sıvı biyopsisi” için bir fırsat sunmaktadır (99). Doku biyopsisi, sıvı biyopsi ile karşılaştırıldığında genellikle teknik zorluğu vardır ve hasta açısından sıkıntılıdır, ancak CTC belirlenmesi için sıvı biyopsi yapılması kan alımı kolaylığı nedeniyle rutin gerçekleştirilebilir (100,101). Klinik önemine rağmen CTC araştırmaları üzerinde ilerleme kanda nadir görülmesi, verimli ve sağlam CTC ayırma tekniklerinin eksikliğinden dolayı engellenmektedir (102). CTC'ler yalnızca kanser hastalarının periferik kanlarındaki  $10^5$ - $10^8$  lökosit sayısında 1'dir (103). Bu nedenle CTC'leri zenginleştirmek ve tespit etmek için son derece hassas ölçümler gereklidir (104,105).

CRC'in patogenezi gelişmiş hücrenin hayatta kalması, farklılaşması ve çoğalması dahil olmak üzere çeşitli süreçleri içerir (5). Aslında, metastaz CRC hastalarında başlıca ölüm sebebidir ve karaciğer kolorektal karsinomunun metastaz yayılım yaptığı en sık bölgedir (6). Birçok grup real-time PCR (RT-PCR) ya da immünolojik teknikler kullanılarak CTC tespitinin CRC ilerlemesi ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (106-108). CRC'de CTC sayımları ve metastatik nüks arasında önemli korelasyonlar olduğu belirlenmiştir (109). CTC'lerin cut-off değerleri 7.5 ml kana dayalı olarak değerlendirildiğinde metastatik meme ( $\geq 5$ ), prostat ( $\geq 5$ ) ve kolorektal ( $\geq 3$ ) kanserinde genel sağkalımda kötü prognoz olmasını tahmin edilebileceği gösterilmiştir (110).

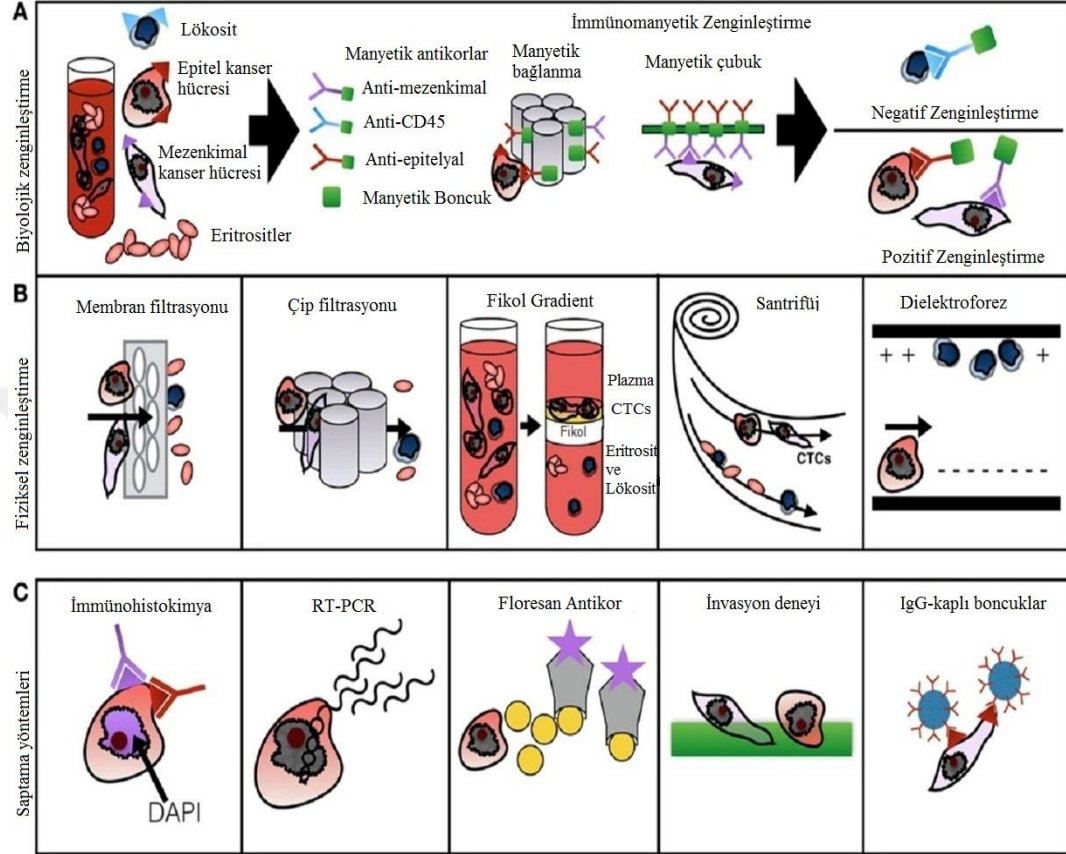
CTC'lerin yüksek heterojenik morfolojileri ve moleküler yapıları birleştirildiğinde kandan izolasyonu teknik açıdan zor hale getirir ve klinikte potansiyel belirteç olarak kullanımını sınırlandırmaktadır (97). Ek olarak epitelyal-mezenkimal dönüşüm nedeniyle CTC sayılarının tespiti zordur. Son 10 yılda, mezenkimal kan hücrelerinin EpCAM ve CK ekspresyonu olmadığından dolayı CTC'lerin belirlenmesinde bu epitelyal belirteçler kullanılmıştır. Ancak epitelyal tümör hücreleri EMT geçirebilir. EMT sonrası migrasyon ve invazyonun plastisite ve kapasitesi artarken, CTC'ler arasında epitelyal belirteçlerin ekspresyonu azalır (111). Ayrıca genel kriter olarak CTC'ler lökosit antijeni CD 45 için negatif, bazı sitokeratinler için pozitif tanımlanmaktadır (112).

### **2.3.3. CTC Belirleme Teknolojileri**

Son yıllarda CTC'lerin tespiti ve zenginleştirilmesi için çeşitli cihazlar geliştirilmiştir (111). CTC alanında yayılan tümörlerin biyolojisi ve özellikle de potansiyel kök hücre benzeri özellikleri ile tümör hücreleri etkileyen EMT üzerinde yoğunlaşmıştır (113). Sonuç olarak bir çok grup EMT olan CTC'leri seçen ve belirleyen yeni araçları optimize etmiştir (Şekil 28). Son çalışmalarda, CTC ölçümleri genellikle bir zenginleştirme aşaması ile başlamaktadır. Bu basamak CTC'lerin yoğunluğunu artırır ve tümör hücrelerinin kolay algılanmasını sağlamaktadır. Bu zenginleştirme basamakları biyolojik ve fiziksel özelliklere dayalı olarak ya pozitif zenginleştirme ya da negatif zenginleştirme olabilir. Aynı cihazda



fiziksel ve biyolojik özelliklere dayalı olarak pozitif ya da negatif CTC zenginleştirme kombine edilebilir. CTC'ler daha sonra immünolojik, moleküler ya da işlevsel ölçümleri kullanarak tespit edilebilir (111).



Şekil 2.8. CTC zenginleştirme ve saptama yöntemleri (114).

### 2.3.3.1 Biyolojik Özelliklere Dayalı CTC Zenginleştirme Stratejileri

1998'de Racila ve arkadaşları, immün affinite ile CTC zenginleştirmesini rapor etmiştir ve bu yöntem en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu strateji Birleşik Devletler Gıda Ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış ve kullanılan bir stratejidir. Hücreleri yakalamak için bu yöntemde ifade edilen spesifik biyolojik belirteçler olan EpCAM ve CD45 gibi biyolojik belirteçler kullanılır. Hücrelerin seçimi için kullanılan antikolar hücrelerin bir manyetik alan üzerinden yakalanmasına izin verir. CTC'ler tarafından ifade edilen heterojen yüzey belirteçleri

dizisi bugüne kadar CTC'ye spesifik evrensel bir antijenin tanımlanmasını imkansız hale getirmiştir (115).

Afinite tabanlı CTC zenginleştirme teknolojileri, CTC'leri tümör ilişkili antijenler ile özel olarak hedefleyerek yakalar yani pozitif zenginleştirme yapmaktadır veya hematopoietik hücreleri hedef alan CD45 ile negatif zenginleştirme yapmaktadır. Pozitif zenginleştirme yüksek hücre saflığına sahiptir bu da antikor özgülüğüne bağlıdır (95,116,117).

Biyolojik Özelliklere Dayalı Pozitif Zenginleştirme Teknolojileri: Pozitif seçim için epitel belirteçlerini kullanan teknolojilerin karşılaştığı dezavantajlara rağmen, CellSearch'ün prognostik değeri ile periferik kandaki EpCAM+/CK+/CD45-hücrelerinin biyolojik ilgisi iyi ispatlanmıştır. CellSearch sistemi, metastatik meme, prostat ve kolorektal kanserler hastaların izlenmesine yardımcı olmak için FDA tarafından onaylanan tek CTC teknolojisidir (9,10).

CTC tespiti için piyasada bulunan diğer bir platform AdnaTest'dir. AdnaTest manyetik, antikor kaplı boncuklar kullanarak CTC'leri zenginleştirir. Yalnızca anti-EpCAM antikorunu kullanan CellSearch'ün, aksine AdnaTest bir antikor kokteyli kullanmaktadır. Kanser türüne spesifik antikorlar seçildikten sonra, yakalanan CTC'ler izlenir ve test edilir. Çeşitli kansere bağlı Musin-1 (MUC-1) ve Epidermal büyüme faktör reseptörü-2 (HER2) gibi tümör işaretleyicilerinin çoklu ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanarak; ölçülen tümör tanımlayıcıları belirlenmiş bir eşiğin üzerindeyse (Adnagen,>0.1 ng/μL'yi önerir) CTC pozitif olarak tanımlanmaktadır (118).

İmmün manyetik ayırma dayalı bir diğer zenginleştirme teknolojisi manyetik hücre ayırıcı (MACS)dir. MACS, zenginleştirme (anti-EpCAM) veya azaltma (anti - CD45) için antikorlara konjuge edilmiş manyetik nanopartiküller (10 - 85 nm çap) ile etiketlenmiş hücreleri yakalamak için yüksek gradyanlı manyetik ayırma kullanmaktadır. Numune, manyetik olarak işaretlenmiş hücrelerin yakalanmasını ve daha sonra da elüsyon edilmesini sağlayan manyetik alan varlığında ve yokluğunda manyetikleşebilen plastik kaplı çelik tutucu dolu bir kolondan geçirilmektedir. MACS teknolojisinin benzersiz tasarımı, büyük bir yüzey alanı/hacim oranı olan

malzemeler boyunca üretilen güçlü manyetik alanlar içeren, istenilen hücre popülasyonlarının etkin şekilde yakalanmasını sağlar (119).

İmmün manyetik zenginleştirme teknolojisi olan MagSweeper, nispeten yüksek saflıkta CTC'leri izole etmektedir ve birçok CTC izolasyon teknolojisinden farklı olarak, tam kanı santrifüleme veya kırmızı kan hücresi lizisi olmadan işleme yeteneğine sahiptir (120). CTC'ler robotik olarak kontrol edilen bir manyetik çubuğu kullanarak önceden karıştırılmış örnekler içeren oyuklar yoluyla adsorbe edilmiş antikor kaplı manyetik boncuklar ile manyetik olmayan etiketli hücrelerin, ayrılmasını sağlayan otomatik bir sistemdir (121).

Nagrath ve arkadaşları tarafından geliştirilen CTC-Chip Anti-EpCAM antikorlu ile kimyasal olarak işlevselleştirilen 78.000 mikrotablon dizisinden oluşmaktadır. Mikro-direklerin geometrik düzeni ve akışkan akış hızı, antikor kaplı direklere hücre bağlanmasını teşvik etmek için optimize edilmiştir. Mikroakışkan teknolojilerin karakteristik dezavantajlarından birini vurgulayan optimum yakalama için 1-2 ml/saat'lik bir akışkan akışı seçilmesidir; düşük üretim oranı ve büyük numune hacimlerine dayanıksız olmasıdır (122).

CTC-Chip'in geliştirilmesinin ardından, CTC zenginleştirme için bir dizi farklı mikroakışkan tabanlı stratejiler ortaya çıkmıştır. Bu cihazlardan biri olan geometrik olarak güçlendirilmiş diferansiyel immünokapilyon (GEDI) cihazı, spesifik olmayan lökosit yapışmasını en aza indirmek için antikor kaplı mikro-direkleri kullanarak pozitif zenginleşmeyi hidrodinamik kromatografiyle birleştirir (123,124).

OncoCEE (hücre zenginleştirme ve ekstraksiyon), CTC yakalama için bir antikor kokteyli kullanarak klasik anti-EpCAM yaklaşımına ters düşen mikro-posta dayalı bir cihazdır. Anti-EpCAM'a ek olarak, OncoCEE antikorlu kokteyli, diğer tümör bağlantılı HER2, MUC-1, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR), trofoblast hücre yüzey antijeni-2 (TROP-2) ve mezankimal işaretleyici antikorlar da içermektedir. CTC tespitini daha da geliştirmek için OncoCEE sistemi CTC'lere bağlı yakalama antikorlarını floresan olarak etiketleyen in situ boyama protokolü kullanılmaktadır (125).

Yüzeý kimyasının değişiklikleri gerektiren kompleks mikro-posta dayalı cihazların büyük ölçekli üretiminde doğal sınırlamalar vardır (126). Buna ek olarak, CTC'lerin tespiti ve karakterizasyonu için günümüzde kullanılan teknikler yüksek çözünürlüklü görüntülemeyi gerektiren diğer teknikler üzerinde yoğunlaşmaktadır (127). Bu kısıtlamalar, balık sırtı (HB) çipi, geometrik olarak arttırılmış karıştırma (GEM) çipi, grafen oksit (GO) çipi gibi yüzeý tutucu mikroakışkan aygıtların geliştirilmesine yol açmıştır. Mikropost dizileri yerine bu cihazlar CTC'nin yakalanmasını kolaylaştırmak için antikör kaplamalı yüzeýler kullanılır (128).

Mikro ölçekte bir immünomanyetik stratejiyi uygulayan bir teknolojinin örneği, Ephesia çipidir. Ephesia çipi, mikroakışkan bir kanaldaki 48.000 sütun dizisine işlevselleştirilmiş manyetik boncukların kendi kendine montajını teşvik eden manyetik tuzaklar oluşturmak için mikro kontak kullanmaktadır (129). Daha önceki mikro-post teknolojilerinin sınırlamalardan bazılarını yenerek Ephesia çipi immünomanyetik sıralama ve mikro-post tabanlı zenginleştirme tasarımlarını birleştirir (130).

Başka bir mikroakışkan tabanlı immünomanyetik yakalama teknolojisi eşsiz bir mimariye sahip olan Magnetic Sifter'dir. Diğer mikroakışkan tasarımların aksine, Manyetik Sifter yönteminde 3.808 kare manyetik gözenek (40 x 40 um) petek deseninde düzenlenmiştir. Yoğun gözenek dizileri boyunca dikey bir akış yapılandırması ile numune geçirilmektedir (131).

Mikroakışkan kullanan, diğer iki otomatik immünomanyetik strateji; LiquidBiopsy (Cyvenio) ve IsoFlux™ (Fluxion Biosciences)'de CTC zenginleştirilmesi için kullanılan ticari sistemler içerisinde yer almaktadır. LiquidBiopsy, mıknatıslanmış yüzeýlere spesifik olmayan bağlanmayı en aza indirmek için çok tabakalı bir kılıf akışı kullanılmaktadır (132). Manyetik nanopartiküller ile etiketlenmiş sabit numune, yoğunluğu ayarlanmış iki tampon akımı arasında merkezi bir kanal vasıtasıyla mikroakışkan cihaza girmektedir. Aslında numune cihazın yakalama bölgesinden akarken, büyük bir manyetik alandan geçer ve etiketli hücreler saptırılarak cam yüzeý üzerinde tutulur. LiquidBiopsy'ye benzer şekilde, Isoflux™ ayrıca sürekli bir akış prosesi kullanır. IsoFlux™ platformu, mikroakışkan kanallarla

birbirine bağılı üç akışkan rezervuardan (numune kuyusu, izolasyon bölgesi ve atık kuyusu) oluşur (132,133).

CTC-iChip, mononükleer hücreleri, daha küçük kan bileşenleri (kırmızı kan hücreleri, trombositler) ile hidro dinamik boyuta dayalı sıralama ile ayıran bir mikro pil dizisini kullanarak tam kan işlemlerine izin vermektedir (134). CTC'leri, pozitif veya negatif zenginleştirme kullanarak immünomanyetik olarak arka plan hücrelerinden ayıran mikroakışkan bir immünomanyetik tabanlı CTC zenginleştirme teknolojisidir (134,135).

CellCollector™, CTC'leri akarken yakalamak için EpCAM'ı hedefleyen bir antikor ile fonksiyonelize edilmiş yapılandırılmış, bir tıbbi teknik olan Seldinger teli kullanılan yöntemdir (136).

Biyolojik Özelliklere Dayalı Negatif Zenginleştirme Teknolojileri: Negatif zenginleştirme, CTC'leri izole etmek için dolaylı bir yöntem kullanmaktadır; CTC ile zenginleştirilmiş bir numuneyi elde etmek için lökosit gibi arka plan hücrelerini hedefler ve ortamda uzaklaştırır. Araştırmacıların CTC'leri klinik örneklerden ayırmak için kullandıkları iki negatif zenginleştirme platformu, ticari olarak satılan EasySep® sistemi ve Quadrupole Manyetik Ayırıcı (QMS) sistemlerdir (116,119). Ek olarak hem zenginleştirme hem de tüketme yoluyla CTC'leri yakalayan MACS ve CTC-iChip cihazlarında bu teknoloji platformuna dahildir (134,135).

### **2.3.3.2. Biyofiziksel Özelliklere Dayalı CTC Zenginleştirme Teknolojileri**

Boyut tabanlı CTC zenginleştirme teknolojileri, CTC'lerin genellikle lökositlerden daha büyük bir morfolojiye sahip oldukları bilgisi üzerinde işlev görür (137). Bir çok çalışma, tümör hücreleri, lökositlerin ve diğer kan hücreleri boyutlarının farklı olduğunu belirtmiştir (137,138). Yapılan bir çalışmada mikroakışkan teknoloji kullanılarak toplanan numuneler de, sırasıyla CTC'ler ve beyaz kan hücrelerinin 12 - 25 µm ve 8 - 14 µm çapında olduğu gösterilmiştir (139). Bir başka çalışmada ise, CTC'leri tanımlamak için otomatik dijital mikroskopi

kullanılmış ve ortalama olarak CTC'lerin, beyaz kan hücrelerinden iki kat daha büyük bir sitoplazmik alana sahip olduğu bildirmiştir (138).

Yoğunluk Tabanlı Ayrımlar: Santrifüj, CTC izolasyonu için kaydedilen ilk yöntemlerden biridir (140). 1959 yılında Seal, kırmızı kan hücreleri, lökositler ve kanser hücreleri için özgül ağırlık sırasıyla 1.092, 1.065 ve 1.056 g/mL'dir ve bu farklılıkları kullanarak ayırım yapan cihaz icat edilebileceği teorileştirmiştir (140).

Günümüzde, farklı parçacıkları yoğunluklarına dayanarak ayırmada yoğunluğa dayalı gradyan kullanılır. CTC izolasyonu için geliştirilmiş olmasa da araştırmacılar, bu uygulamada Ficoll-Paque® kullanmışlardır. CTC izolasyonu için tasarlanmış OncoQuick® yoğunluk temelli degrade santrifüjü ve ayırma ortamının üstünde gözenekli bir bariyerin sisteme entegre edilmesiyle eritrositler ve bazı lökositler geçmesine izin verirken CTC'lerin yakalanmasını sağlar (141).

RosetteSep™ CTC Zenginleştirme kokteyli kullanarak istenmeyen hücrelerin daha da tükenmesi için benzersiz bir yöntem sunmakta olan yoğunluk santrifüjü ile immünoafinite dayalı zenginleştirme yöntemidir (142).

AccuCyte zenginleştirme hedef hücreleri izole etmek için sıralı yoğunluk fraksiyonlamayı kullanan yoğunluk tabanlı başka bir zenginleştirme yöntemidir (143).

#### İki ve Üç Boyutlu Alanlarda Mikro Filtreleme:

*İki Boyutlu Mikrofiltrasyon Sistemleri:* 1964'de Seal, CTC'lerin kan hücrelerinden daha büyük, daha katı bir fenotip sergilediğini göz önüne alarak, CTC zenginleştirme için ilk mikrofiltrasyon düzeneğini yapılandığında, CTC izolasyonu için yeni bir yöntem ortaya koymuştur (144). ISET® (Rarecells Diagnostics) ve ScreenCell® (ScreenCell), CTC zenginleştirmek için track-etched membranları kullanan iki ticari sistemdir (145,146).

*Üç Boyutlu Mikrofiltrasyon Sistemleri:* FaCTChecker (Circulogix) mikrofiltresi iki gözenekli parylene-C tabakasından oluşur; alt katman, altıgen olarak

düzenlenmiş 8 µm'lik gözenekler içerirken, üst katman alttaki zardaki ilgili altıgen desenlerle hizalanan daha büyük 40-µm gözenekler içerir (147). Sarıoğlu ve arkadaşlarının geliştirdiği bir diğer yöntem ise üç boyutlu Cluster-Chip adı verilen CTC kümelerini yakalamak için özel olarak tasarlanmış bir mikrofiltrasyon sistemi olup zenginleştirme teknolojileri arasında bulunmaktadır (148).

Inertial Odaklama: İntertial odaklama, iki kuvveti kullanarak mikroakışkan aygıtlardaki momentum etkilerinin uygulanması yoluyla, boyutu temel alarak dolaşımdaki tümör hücrelerini diğer kan hücrelerinden pasif olarak ayırmaktadır (149).

Dielektroforez: Hücre ayırımında yenilikçi bir yaklaşım olan dielektroforez (DEP), hücre yapısına (hücre zarı, çekirdek, organeller), morfolojiye (boyut, şekil) ve hücrenin fenotipine bağlı olarak farklı hücrelerin farklı elektriksel yaklaşımlarını kullanmaktadır (150). ApoStream®, CTC zenginleştirme için Dielektroforetik alan akış fraksiyonasyonu (DEP-FFF) kullanan ticari bir sistemdir. Ticari teknoloji DEPARray™, tek tek kontrol edilebilen elektrotlar dizisi vasıtasıyla üretilen DEP kafeslerinde tek hücrelerin tutulması sağlayan bir sistemdir (151).

### **2.3.3.3. Doğrudan Görüntüleme Yöntemleri**

Zenginleştirme teknolojilerinin tümü, zenginleştirme basamağında yakalanan hücrelerin kimliğinin daha sonra doğrulanmasını gerektirir. Genel olarak, bu doğrulama, CTC'lerin DAPI+/CK+/CD45- olarak tanımlandığı DAPI, CK ve CD45 immün boyama ile yüksek çözünürlüklü görüntüleme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmektedir (152). Zenginleştirme, incelenmekte olan toplam hücre sayısını azaltmasına rağmen, örneklem görüntüleme çok zaman almaktadır. Bu nedenle, araştırmacılar zenginleştirmeyi takiben görüntülemenin verimliliğini artırmak için CellSearch, DEPArray ve Modular CTC Sinusoidal Microsystem gibi teknolojiler kullanmaya başlamışlardır (153). Bu sistemlerin ortak özelliği minimum hücre kaybı ve kısa sürede görüntüleme yapabilmesidir (152).

Zenginleştirmesiz Görüntüleme Yöntemleri: Yalnızca görüntülemeye dayanan CTC algılama platformu FASTcell™ ve CytoTrack'i içermektedir. FASTcell™ sisteminin merkezindeki fiber optik dizi tarama teknolojisi sitometrisi, geleneksel optik sistemlerden çok daha geniş bir görüş alanı sağlayan geniş bir toplama deliği oluşturmak için bir dizi optik fiber kullanmaktadır (154). Buna ek olarak, bir lazer ışığı kaynağının ve hassas bir dedektörün kullanılması görüntüleme için gerekli poz süresini azaltır. FASTcell™'e benzer şekilde, CytoTrack sistemi örnekleri yüksek oranlarda önceden ekranlar ve ek olarak görüntü analiz ve doğrulama için olası CTC hedeflerini kaydeder. CTC'leri saptamak için bir başka benzersiz, etiketsiz yöntem fotoakustik akış sitometrisidir (PAFC). PAFC, gerçek zamanlı algılama için lazer tabanlı teknoloji kullanmaktadır (154,155).

Fonksiyonel Teknikler: CTC zenginleştirme ve izolasyonu için canlı hücresel aktivitenin özelliklerini kullanmaktadır (27). Spesifik salgılanmış/salınan/bırakılan tümör bağlantılı proteinlere dayanan CTC'leri yakalayan Epithelial immunoSPOT Assay (EPISPOT) gibi CTC'lerin fonksiyonel özelliklerini kullanan teknolojiler, birkaç farklı kanserde doğrulanmıştır (156). İnvaziv CTC'lerin matrislere tercihli olarak yapışmasından istifade eden bir başka fonksiyonel test olan Vita-Assay™ (Vitatex) metastatik prostat ve meme kanserinde de test edilmiştir (157,158).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Etik Kurulu'ndan 02.02.2015 - 10 No'lu karar ile “Kanda dolaşan tümör hücrelerinin kolorektal kanserli (CRC) hastalarda FC ile tespiti” çalışması için izin alınmıştır (EK-1). CRC hastalarından alınan ve çalışmada kullanılan kan numuneleri Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Kliniği'nden temin edilmiştir. CRC teşhisi konulmuş, evrelendirilmesi yapılmış olup hiç tedavi almamış ve tedavi planı yapılmış 10 birey deney grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak ise hiçbir kanser şüphesi taşımayan 7 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Gönüllü deney ve kontrol grubu bireylerine çalışma ile ilgili bilgi vererek çalışmaya dahil edilmeleri için onayları alınmıştır (EK-2).

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan alet ve cihazların listesi.

Adı	Markası ve Modeli
Buzdolabı (+4 C°):	Klimasan/S 900 SC DD
Soğutmalı Santrifüj	Hettich/Universal 320 R
Hassas Terazi	MRC/ASB-220-C2
Otomatik Pipetler	Eppendorf, A.B.T.
Manuel Pipet Kontroler	Eppendorf/Easypet 3
Dijital Kronometre	İsolab
Vorteks	İsolab/622.01.001
Karıştırıcı	IKA/RH Basic 2
Işık Mikroskop	Nikon/Eclipse E100
Distile Su Cihazı	ELGA/LA621
Akım Sitometri Cihazı	BD FACSAria™ III Cell Sorter
Thoma Lamı	İsolab
MACS LD Kolon, Miknatis ve Stand	Miltenyi Biotec

### 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve sarf malzemeler Tablo 3.2. ve Tablo 3.3.'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.2.** Çalışmada kullanılan sarf malzemeler listesi.

Adı	Üretici Firma
Pastör Pipeti ( 3 mL'lik)	ISOLAB, Wertheim, Almanya
EDTA'lı Vakumlu Kan Tüpü	LP ITALIANA SPA, Milano, İtalya
Falkon Tüpler 15mL, 50mL	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Otomatik Pipet Uçları	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Serolojik Cam Pipetler	Corning, New York, ABD
Lamel	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Tartım Kapları	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Spatül	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Akım Sitometri Tüpü	BD Biosciences, San Jose, ABD

**Tablo 3.3.** Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi.

Adı	Üretici Firma
Fosfat Tamponu	DPBS(1X) Gibco, Life Tech, ABD
Fikol	Merck Millipore, Darmstadt, Almanya
Bovin Serum Albümin(BSA):	Biowest, Nuaille, Fransa
Etilendiamidin Tetraasetik Asitli Disodyum (Na <sub>2</sub> EDTA):	Genaxxon, Almanya
Cellwash Solüsyon	BD Biosciences, San Jose, ABD
Cytofix Fiksasyon Tampon Çözeltisi	BD Biosciences, San Jose, ABD
Stainbuffer Solüsyon	BD Biosciences, San Jose, ABD
10x Perm Wash Tampon Çözeltisi	BD Biosciences, San Jose, ABD
Perm Buffer III Tampon Çözeltisi	BD Biosciences, San Jose, ABD

### 3.1.3. Çalışmada Kullanılan Antikorlar

Çalışmada kullanılan antikorlar Tablo 3.4.'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.4.** Çalışmada kullanılan antikorlar listesi.

Adı	İzotipi	Üretici Firma
Mouse Anti-Human CD45-APC-H7	APC-H7 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, ABD
Anti-EpCAM-PE	PE Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, ABD
Mouse Anti-Human Cytokeratin 14,15,16 and 19-Alexa Fluor 647 (Poliklonal)	Alexa Fluor 647 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, ABD
Anti-Cytokeratin 7,8-FITC (Poliklonal)	FITC Mouse IgG2a Kappa Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, ABD
CD45 Mikro-boncuklar		Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Almanya

### 3.1.4. Çalışmada Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

MACS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: CD 45 manyetik ayırım basamağında her bir kan örneği için 20 mL PBS (pH 7.2), 0.1 g BSA (%0.5'lik) ve 0.015 g Na<sub>2</sub>EDTA (2mM) kullanılarak karıştırıcı üzerinde tapon çözelti hazırlanmıştır. MACS tampon çözeltisi taze olarak kullanılmış ve 2-8°C' de saklanmıştır.

1X Perm/Wash Tampon Çözeltisi Hazırlanması: 10X olan Perm/ Wash buffer 1/10 oranında alınarak distile su ile dilüe edilir. Her bir kan örneği için 800 µL Perm/Wash buffer 7200 uL distile su ile karıştırılır.

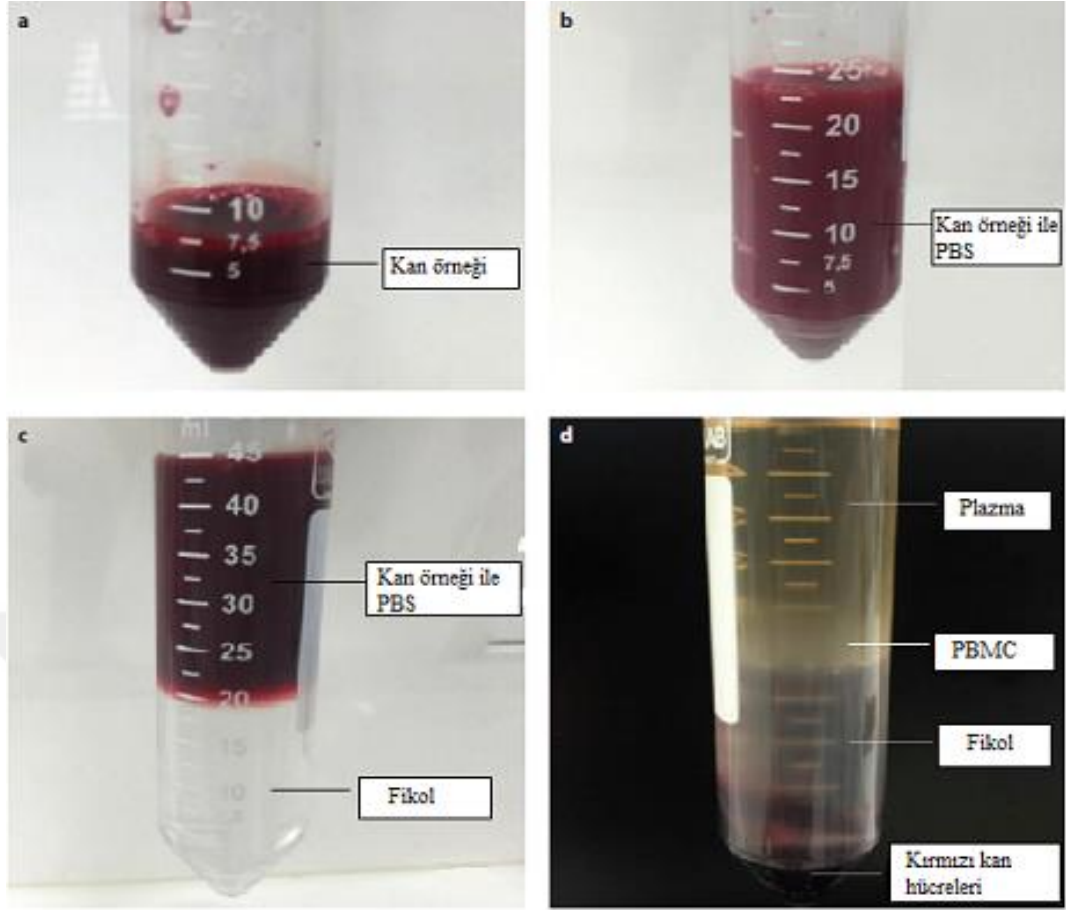
## **3.2. Yöntemler**

CRC hastaları ve sağlıklı bireylerin kan örnekleri EDTA içeren 7.5 mL'lik tüplere alınmış CTC tespit protokolü uygulanmıştır (159).

### **3.2.1. Zenginleştirme Basamağı: Fikol Yoğunluk Gradientli Santrifüj**

Periferik kanda bulunan mononükleer hücreler veya çoğunlukla PBMC olarak bilinen hücre kümesinin izolasyonunda kullanılan en popüler yöntemdir. PBMC öncelikle %60-90 lenfosit, %10-30 monosit ve %2 dentritik hücre içerir. Lenfositlerin alt popülasyonları da mevcuttur. Yöntemde kullanılan en önemli bileşen fikoldür. Fikol nötr, yüksek kütleli, çok dallı, hidrofilik bir polisakkarittir (160,161).

7.5 mL kan örneği 50 ml'lik falkon tüpe alındıktan sonra 1:2 oranında PBS ile kan örneği dilüe edilmiştir. 1:1 oranında fikol üzerine yavaş ve seri olarak eklenmiştir. Hazırlanan örnek 20°C, 300 g'de, 25 dakika (hız: 9/1) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan plazma tabakası PBMC'yi dağıtmadan pastör pipet ile uzaklaştırılıp, yeni bir 50 mL'lik falkon tüpe PBMC toplanmıştır (159).



**Şekil 3.1.** a) Kan örneği b) PBS ile seyreltilen kan örneği c) Fikol gradyan ayırımı öncesi kan örneği d) Santrifüj sonra kan örneği (159).

Toplanan PBMC üzerine 10 mL PBS eklenir ve aynı şekilde 20°C, 300 g'de, 10 dakika (hız: 9/1) santrifüj edilerek yıkama gerçekleştirilir. İkinci bir defa yıkama işlemi aynı şekilde tekrar edilmiştir. Pelet, 500 µL PBS ile kırılır ve üzerine 9,5 mL PBS eklenerek son hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır (159).

### 3.2.2. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

Thoma lamında 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Sayım bu karelerde yapılır. Thoma lamında sayım sonucu  $A \times SF \times 10.000$  formülü kullanılarak hesaplanır. Burada  $A = 16$  büyük karede sayılan hücre sayısı,  $SF$  ise seyreltme faktörüdür. 10.000 ise  $0,1 \text{ mm}^3$  'deki sayım sonucunu 1 ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmez olarak kabul edilmektedir (162).

Elimizde bulunan 10 mL'lik örnek pipetaj yapılarak 10 µL alınmış ve Thoma lamına yüklenmiştir. Mikroskopta 3 ayrı kare sayılarak ortalaması alınmış ve toplam hücre sayısı hesaplanmıştır (159).

### 3.2.3. Zenginleştirme basamağı: CD 45 Negatif İmmunomanyetik Ayırım

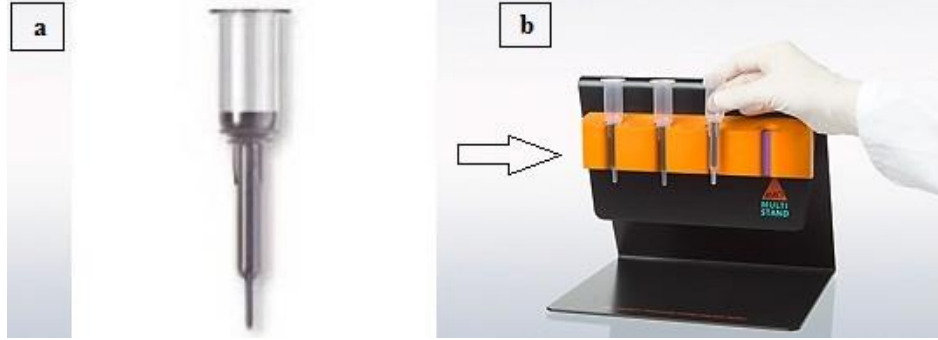
Fikol sonrası lökositleri ortadan uzaklaştırıp, CTC bulunan PBMC yoğunluğunu artırmak için MACS teknolojisi kullanılmıştır (159). Hücre yüzeyindeki spesifik antijenler kullanılarak manyetik mikro boncuklar ile etiketlenerek CD45 negatif seçim yapılmıştır. MACS teknolojisi, MACS Microbeads, MACS LD kolon ve separatörden oluşmaktadır. Matris tabanlı canlı hücre ayırımı yüksek saflık sağlayan kolonlar kullanılarak sağlanır (163).

MACS microbeads, hücre yüzeyi üzerinde belirli bir antijene karşı yüksek düzeyde spesifik antikorlara konjuge edilmiş 50 nm süper paramanyetik parçacıklardır (159). Küçük boyutlarıyla hücreleri aktive etmezler ve hücre yüzeyi epitoplarnı doyurmazlar. MicroBeads toksik değildir ve biyolojik olarak parçalanabilir. Biyolojik uyumluluk için Uluslararası Standart (ISO) ve Amerikan Farmakopesi (USP) kurallarına göre test edilmiştir. MACS microbeads her zaman süspansiyon halindedir, hızlı bağlama kinetiği ve kısa etiketleme prosedürlerine izin verir (163).

MACS kolonlar, hücre için uygun bir kaplama ile kaplanmış ferromanyetik kürelerden oluşan bir matris içerir. Bir manyetik ayırıcı üzerine yerleştirildiğinde, küre manyetik alanı 10.000 kat artırır, böylece kolonda yüksek bir gradyan oluşturur. Manyetik olarak etiketlenmiş hücreler süspansiyon halinde sütun içerisinde tutulur ve aslında sütun matrisini "bağlamaz". Bu süspansiyon, hücreler üzerindeki stresleri en aza indirir ve hücre agregasyonunu önleyerek etkin steril yıkama sağlar (Şekil 3.2) (163).

Etiketsiz hücreler geçerken manyetik olarak işaretlenmiş hücreler sütun içinde tutulurlar. Akış, etiketsiz hücre fraksiyonu olarak toplanabilir. Kısa bir yıkama

adımından sonra, kolon ayırıcından çıkarılır ve manyetik olarak işaretlenmiş hücreler kolondan ayrıştırılır. Böylece, MACS MicroBead Teknolojisi ile etiketli ve etiketlenmemiş hücreler kolayca yüksek saflıkta izole edilebilir (163).



**Şekil 3.2.** a) LD Kolon b) MACS hücre ayırımı sistemi (163).

Hücre sayısı bilinen örnek 20°C, 300 g'de, 10 dakika (hız: 9/1) santrifüj edilmiştir. Sadece pelet kalacak şekilde süpernatant pastör pipet ile atılmıştır. Hücre sayısına göre oranlanarak pelet üzerine  $10^7$  hücreye karşılık 80µL olacak şekilde MACS tampon çözeltisi eklenerek pelet kırılmıştır. Tekrar üzerine  $10^7$  hücreye karşılık 20µL CD45 manyetik boncuk olacak şekilde hesaplanarak eklenmiştir. 4-8°C'de 15 dakika karanlıkta inkübe edilerek bu aşamadan sonra deneyin geri kalan basamakları 4° C'de gerçekleştirilmiştir (159).

İnkübasyon sonrası, hücre sayısına göre  $10^7$  hücreye 1 mL karşılık gelecek şekilde hesaplanan MACS tampon çözeltisi hücre solüsyonu üzerine eklenerek 4°C, 300 g'de, 10 dakika (hız: 9/1) santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra pelet kalacak şekilde süpernatant atılmış ve LD kolon kullanıldığı için  $1.25 \times 10^8$  hücreye karşılık 500µL MACS tampon çözeltisi eklenmiştir (159).

Manyetik ayırım için kullanılacak magnet standı yerleştirilmiş ve üzerine LD kolon yerleştirilmiştir. Kolon gözeneklerinin açılması için 2 mL MACS tampon çözeltisi ile kolon yıkanmış ve akan çözelti toplanarak atılmıştır. Tüm çözelti kolondan aktıktan sonra örneğin toplanacağı yeni bir 15 mL'lik falkon tüp kolon altına yerleştirilmiş ve örnek kolondan geçirilmiştir. Örnek kolondan geçtikten sonra kolon 2 kez 1 mL MACS tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkamaların ardından

lökositleri ayrılmış ve CTC içeren PBMC solüsyonu kolondan uzaklaştırılmıştır. Thoma lamında tekrar sayım yapılarak hücre sayısı hesaplanmıştır (159).

### 3.2.4. Akım Sitometrisi İle Pozitif Seçilim Görüntüleme Basamağı

Akım sitometri, tek hücre süspansiyonu halindeki hücrelerin bir akış kanalı boyunca tek hücre seviyesinde lazer önünden geçerken yansıyan foton seviyesinin ölçümüne bağlı olarak hücrelerin büyüklük (0.2-150 $\mu$ m), granülarite ve floresans özelliklerine göre hücre popülasyonlarını, organelleri veya benzer büyüklükteki partikülleri kantitatif olarak araştırma imkanı sağlayan bir cihazdır (164,165).

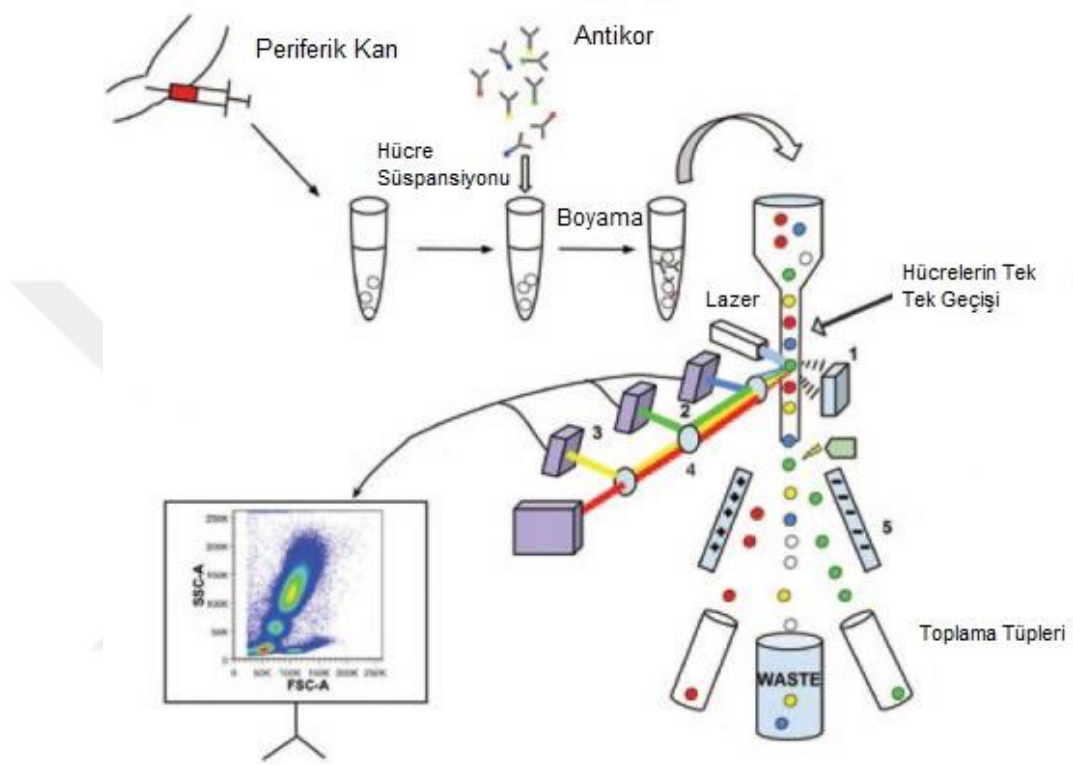
FC 3 ana sistemden oluşmaktadır. Hidrolik sistem akış sistemidir ve partiküllerin lazer önünden geçişi için taşıyıcı sistem olarak görev almaktadır. Optik sistem lazer önünden geçen hücrelerden açığa çıkan saçılımın çapraz ve silindirik filtreler ile toplanarak düzgün bir şekilde foto-dedektöre aktarılmasında görev almaktadır. Elektronik sistem elde edilen optik sinyalin elektrik sinyaline çevrim ve analiz için bilgisayara aktarımından sorumludur (164,165).

Süspansiyon halinde hazırlanan hücreler analiz için floresan işaretli monoklonal antikorlar ile direkt/indirekt yoldan işaretlenir. Sistem floresan yoğunluğu ölçümü prensibine dayalı olduğundan işaretli hücrelerden floresanı açığa çıkaracak güç kaynağı olarak lazer kullanılmaktadır. Süspansiyon halindeki hücreler hava basıncı ile sıvı içinden geçirilir. Sıvının çok hızlı akışı yüksek bir hidrostatik basınç oluşturur ve bu basınçla hücreler akış kabineye gelirler. Kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı hücrelerin tek bir sıra halinde lazer kaynağı önünden geçişini sağlar (Şekil 3.3) (164,165).

Tek hücre olarak lazer kaynağının önünden geçen floresan işaretli hücrelerin analizi için sistemde Forward Scatter (FS), Side Scatter (SS), ve Floresan dedektörleri bulunmaktadır. FS hücre yüzey alanı veya büyüklüğü hakkında bilgi verirken, SS granülarite veya hücre iç yapısı hakkında bilgi verir. Hücreler FS/SS histogramında farklı bölgelerde dağılım gösterirler. Süspansiyon hücre popülasyonları büyüklük ve granülarite özelliklerine göre ayrıldıktan sonra bu farklı hücre popülasyonları içinden bilgi edinilmek istenen hücre veya hücre gruplarının

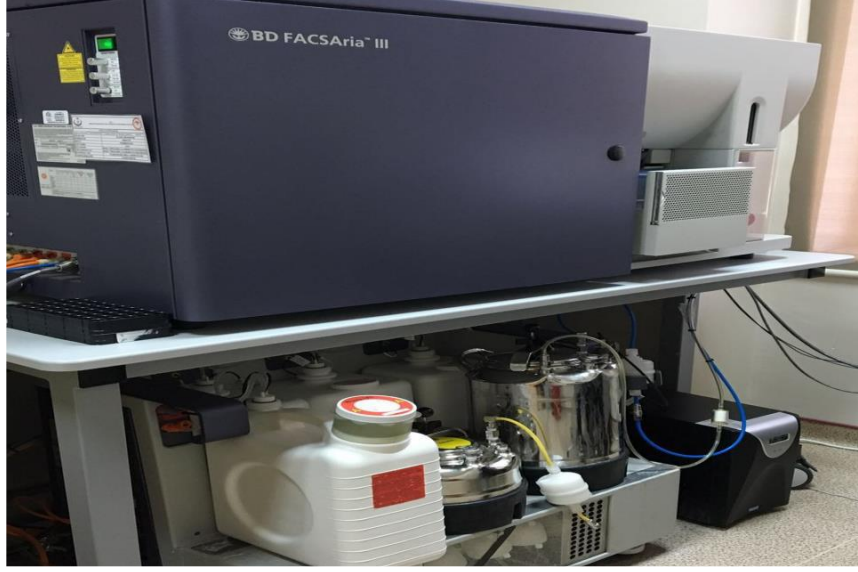


grafik bir çerçeve ile belirlenmesi işlemine kapılama (gating) işlemi olarak adlandırılmaktadır. Kapılama işleminden sonra, sistem verilen komutlara uygun olarak sadece kapı içindeki hücreler hakkında bilgi vermektedir ve parametrenin (fenotipik özellikler/canlılık/DNA miktarı) değerlendirmesi ile raporlamasını yapmaktadır (164-167).



**Şekil 3.3.** FC analiz Sistemi (165).

MACS zenginleştirme basamağı sonrasında elde ettiğimiz hücre süspansiyonu üç ayrı tüpe aktararak BD FACSAria™ III Cell Sorter cihazı kullanılarak FC analizi yapılmıştır. Kontrol, izotip kontrol ve deney örnekleri için ayrı protokol kullanılmıştır (159).



**Şekil 3.4.** BD FACSAria™ III Cell Sorter Akım sitometrisi cihazı.

FC Analizinde Kullanılan Antikorlar:

*CD 45:* 180 ile 220 kDa arasında değişen moleküler ağırlıklara sahip birkaç izoformu bulunan tip I transmembran glikoproteinidir. CD45, hematopoetik kaynaklı tüm çekirdekli hücrelerinde eksprese edilir ve aynı zamanda lökosit ortak antijen (LCA) olarak da bilinir. CD45 en çok lenfositler üzerinde ifade edilir. CD45 için diğer sinyal molekülleri değiştirerek lökosit fonksiyonlarını düzenlemede, sinyal iletiminde, immünolojik olayların inhibisyon veya upregülasyonunda önemli bir rol oynar (168,169).

*EpCAM:* Epitelyal hücre adezyon molekülü (EpCAM), 40 kDa ağırlığında bir hücre yüzey antijenidir. Epitelyal karsinomlarda tümör spesifik molekül olan EpCAM'a karşı birçok monoklonal antikor geliştirilmiştir. EpCAM tip I transmembran glikoproteinidir. Erişkin skuamöz epiteli, hepatosit ve gastrik epitel gibi bazı spesifik epitelyal hücreler dışında, epitelyal dokuların çoğunda bazolateral membranda eksprese edilmektedir. Ayrıca displastik skuamöz epitelde de novo ekspresyonu görülebilir (170, 171).

*CK 19:* KA4 monoklonal antikor insanın temel epitelinin bir çok türünün sitoplazması içinde sitokeratin 14, 15, 16 ve 19 spesifik bağlanır. İnsan epitelinin

sitokeratin tiplerinin sitoplazmik filamanlarını içerdiği gösterilmiştir. Tanımlanmış 19 farklı polipeptidleri vardır (172).

*CK 7,8:* Anti-Sitokeratin antikoru insan sitokeratin proteinleri ile birincil dereceden bir reaktiviteye sahiptir, sitokeratin 7 ve sitokeratin 8 sırasıyla 54 ve 53 kDa ağırlığındadır. Sitokeratin 7 ve 8 antijenler, normal insan dokusunun salgı epitelyumu üzerinde bulunur, ancak tabakalı skuamöz epitel üzerinde mevcut değildir. Anti-Sitokeratin antikoru, karaciğer, renal tübüler epitel ve hepatosellüler ve renal hücreli karsinomalar da dahil olmak üzere epitelden türetilen dokularda aktiftir. Anti-Sitokeratin antikoru bazı skuamöz hücreli karsinomlarla reaksiyona girmeyebilir (173).

Kontrol Tüpü Örneğinin Hazırlanması: Kontrol tüpüne alınan hücre süspansiyonu üzerine 100 µL Cellwash solüsyonu eklenerek 4<sup>0</sup>C 350 g'de 5 dakika (hız: 9/1) santrifüj edilmiştir. Süpernatant pipet yardımıyla atılır ve pelet kırılarak 500 µL Cytofix fiksasyon tampon çözeltisi eklenerek 4-8<sup>0</sup>C'de karanlıkta gece boyu inkübe edilmiştir (159).

İnkübasyon sonrasında, kontrol tüpü tekrardan 4<sup>0</sup>C 350 g'de 5 dakika (hız: 9/1) santrifüj edilmiş ve süpernatantı atılarak peleti kırılmıştır. Kırılan pelet üzerine 500 µL FC boyama tamponu eklenmiş ve bu tüp FC cihazında okunma aşamasına kadar 4-8<sup>0</sup>C'de karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır (159).

Deney Tüpü Örneğinin Hazırlanması: Deney tüpüne alınan hücre süspansiyonu 4<sup>0</sup>C 350 g'de 5 dakika (hız: 9/1) santrifüj edilmiştir. 100 µL Cellwash solüsyonu içerisinde 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde orantılanarak pelet üzerine Cellwash solüsyonu eklenmiştir. Yine hücre sayısına göre hesaplanarak üzerine hücre yüzey antikorları olan Anti-CD45 ve Anti-EpCAM antikorları eklenmiş ve 4-8<sup>0</sup>C'de 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir (159).

İnkübasyon sonrasında deney tüpüne 2 mL FC boyama tamponu eklenmiş ve 4<sup>0</sup>C 350 g'de 5 dakika (hız: 9/1) santrifüj edilmiştir. Pipet yardımıyla süpernatant atılarak pelet üzerine 500 µL Cytofix fiksasyon tampon çözeltisi eklenmiş ve 4-8<sup>0</sup>C'de karanlıkta gece boyu inkübe edilmiştir (159).

Ertesi gün tekrardan 4<sup>0</sup>C 350 g'de 5 dakika (hız: 9/1) santrifüj edilen deney tüpünde süpernatant atılarak pelet kırılmıştır. Pelet üzerine 1X olarak dilüe edilen Perm/Wash tampon çözeltisinden 2 mL eklenerek 4<sup>0</sup>C 350 g'de 5 dakika (hız: 9/1) santrifüj edilir ve bu işlem ikinci defa tekrarlanmıştır. Pelet üzerine 100 µL Phosflow Perm III tampon çözeltisi eklenmiş ve 4-8<sup>0</sup>C'de 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir (159).

İnkübasyon sonrasında deney tüpüne 2 mL Perm/Wash tampon çözeltisi eklenmiş ve 4<sup>0</sup>C 350 g'de 5 dakika (hız: 9/1) santrifüj edilmiştir. Pipet yardımıyla süpernatant atılarak pelet üzerine 100 µL FC boyama tamponu eklenmiştir. Bu şekilde permeablize olan hücrelerin işaretlenmesi için, hücre sayısına göre miktarı hesaplanan hücre içi antikorları olan Anti-CK 14, 15, 16, 19 ve Anti-CK 7, 8 antikorları eklenerek 4-8<sup>0</sup>C'de 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır (159).

İnkübasyon sonrasında 2 mL Perm/Wash tampon çözeltisi eklenmiş ve 4<sup>0</sup>C 350 g'de 5 dakika (hız: 9/1) santrifüj edilen deney tüpünün süpernatantı atılarak peleti kırılmıştır. Pelet üzerine 500 µL FC boyama tamponu eklenmiş ve deney tüpü FC analizi için son aşamaya getirilmiştir (159).

İzotip Kontrol Tüpü Örneğinin Hazırlanması: Deney tüpü örneği için kullanılan protokol aynı şekilde izotip kontrol tüpü örneğinde uygulanmıştır. Ancak, deney tüpünde kullanılan hücre yüzey ve hücre içi antikorlarının yerine bu tüpte izotip kontrol antikorları ile çalışılmıştır (159).

Hazırlanan Örneklerin FC Cihazında Okunması: CTC'lerin tespiti için önce kontrol tüpü ve izotip kontrol tüpü, ardından deney tüpü okutulmuştur. Kontrol tüpü ve izotip kontrol tüpü kullanılarak deney tüpünün kapılama işlemleri FC cihazında güvenilir bir şekilde gerçekleştirilmiştir. FC cihazında CTC tespitinde sırası ile Anti-CK 14, 15, 16, 19, Anti-CK 7, 8, Anti-EpCAM ve Anti-CD45 kapılamaları yapılmıştır. CK 14, 15, 16, 19 pozitif, CK 7, 8 pozitif ve EpCAM pozitif, CD45 negatif hücreler CTC kabul edilerek sayımı gerçekleştirilmiştir (159).

### 3.3. İstatistiksel Analizler

Çalışmada bulunan yaş dağılımı Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Yaş normal dağılım gösterdiği için ortalama  $\pm$  standart sapma ile; CTC sayıları ortanca (min-maks: minimum-maksimum) ile ve evre, tanı ve opere durumu sayı (%) ile ifade edilmiştir.

Hasta grubuyla kontrol grubunun CTC sayıları Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda test istatistiği ve p değeri verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  kabul edilmiştir.

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hasta ve Kontrol Profili

Bu çalışmada, tanısı yeni konulmuş fakat hiçbir tedavi almamış 10 CRC hasta kanı ile çalışılmıştır. 7 hasta (%70.0) kolon kanseri, 3 hasta (%30.0) rektum kanseridir. Kontrol olarakta hiçbir kanser şüphesi taşımayan 7 sağlıklı bireyin kan örnekleri kullanılmıştır. Çalışmaya alınan 10 CRC hastası ile 7 sağlıklı bireyin yaş ortalaması sırasıyla  $59.60 \pm 12.41$  yıl ve  $58.43 \pm 13.21$  yıl olarak hesaplanmıştır. 7 hastanın (%70.0) opere olduğu belirlenmiştir. Kolon kanseri hastalarından 4'ü opere olmuş diğer 3'ü opere olmamıştır. Rektum kanseri hastalarının 3'ü de opere olmuştur. (Tablo 4.1, Tablo 4.2).

Çalışmaya dahil edilen hasta bireyler rastgele seçilirken, kontrol olarak çalışılan sağlıklı bireyler hastaların yaşlarına oranla  $\pm 5$  olacak şekilde seçilmiştir. Yaşları birbirine yakın olan ya da aynı olan hastalar için aynı kontrol kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan hastaların hepsi rastgele seçilmesine rağmen erkek olmasından dolayı kontrol olarak değerlendirilen sağlıklı bireylerde aynı cinsiyetten seçilmiştir.

CRC hastaları TNM evrelendirmesine göre evrelendirilmiştir. Evre I ve evre II erken evre olarak, evre III ve evre IV ileri evre olarak kabul edilmiştir.

CTC sayısı ortancası tüm hastalarda 4 (min-maks: 2 – 13), kolon kanseri hastalarında 6 (min-maks: 3 – 13) şeklinde hesaplanmıştır (Tablo 4.3). Kontrol grubunda CTC elde edilmemiştir. Tüm hastalarda CTC sayısının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ( $Z=3.551$ ;  $p<0,001$ ). Kolon kanseri hastalarının CTC sayısının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür ( $Z=3.347$ ;  $p<0.001$ ).

## 4.2. CTC Sayılarına İlişkin Bulgular

Yeni teşhis konulmuş, erken evre olan hastalardan 2 kolon kanseri hasta takip edilmiştir. Hastalardan biri öncesinde opere olmuş ve opere üzerinden en az 1 ay geçmiştir. Takip çalışmaları her kür öncesinde 7.5 ml kan alınarak CTC sayısı 0 olana kadar devam etmiştir (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** CRC hastalarının bilgileri.

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Tanı	Evre	Ameliyat Durumu	Takip Durumu	1. CTC Analizi	2. CTC Analizi
H1	E	40	Kolon Kanseri	Evre II	X	✓	7	0
H2	E	62	Kolon Kanseri	Evre II	✓	✓	6	0
H3	E	56	Kolon Kanseri	Evre II	✓	X	10	-
H4	E	35	Kolon Kanseri	Evre II	✓	X	4	-
H5	E	60	Kolon Kanseri	Evre IV	X	X	13	-
H6	E	60	Kolon Kanseri	Evre III	✓	X	3	-
H7	E	78	Kolon Kanseri	Evre III	X	X	4	-
H8	E	68	Rektum Kanseri	Evre II	✓	X	4	-
H9	E	55	Rektum Kanseri	Evre IV	✓	X	3	-
H10	E	55	Rektum Kanseri	Evre III	✓	X	2	-

**Tablo 4.2.** Sağlıklı kontrol grubunun bilgileri.

Kontrol No	Cinsiyet	Yaş	Sağlık Durumu	CTC Sayısı
K1	E	69	Hiç bir kanser teşhisi konulmamış.	0
K2	E	35	Hiç bir kanser teşhisi konulmamış.	0
K3	E	66	Hiç bir kanser teşhisi konulmamış.	0
K4	E	75	Hiç bir kanser teşhisi konulmamış.	0
K5	E	57	Hiç bir kanser teşhisi konulmamış.	0
K6	E	55	Hiç bir kanser teşhisi konulmamış.	0
K7	E	52	Hiç bir kanser teşhisi konulmamış.	0

**Tablo 4.3.** CTC sayılarının hasta ve kontrol grubunda dağılımı.

Grup değişkeni	CTC Sayısı Ortanca (min-maks)	Test istatistiği	p
Grup		3.551	<0.001
Hasta	4 (2-13)		
Kontrol	0 (0-0)		
Grup2		3.347	<0.001
Kolon kanseri	6 (3-13)		
Kontrol	0 (0-0)		

### 4.3. FC Analiz Verileri

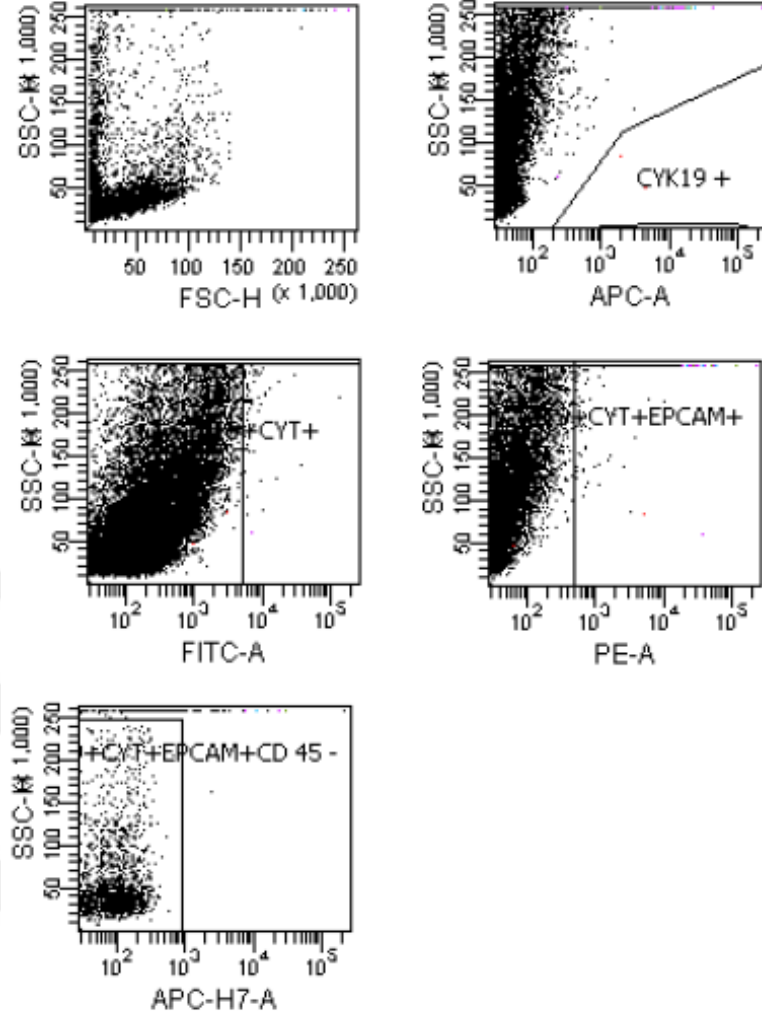
Hasta ve kontrol numunelerine ait bulguları FC analizlerine göre değerlendirilmiştir. Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de olduğu gibi hasta bireyler ve kontrol bireyleri kendi içerisinde numaralandırılmıştır. Analiz verileri program üzerinden kapılama alınarak oluşturulup değerlendirilmiştir.

H1 yeni teşhis konulmuş, hiçbir tedavi almamış, T4N0M0, evresi II olan yani erken evre kolon kanseri bir hastaya aittir. H1 daha öncesinde ameliyat olmamıştır ve



erken tanı konulan bir hastadır. Bu bireyde hem izotip çalışması yapılmış hem de hasta takip edilmiştir. Analiz verilerinde değerlendirmesi cut-off değerlerine göre alınmış ve cut-off  $\geq 3$  CTC pozitif değerlendirilmiştir. İlk kür öncesinde alınan kandan yapılan analizde 7 CTC saptanmıştır. Hasta bir ay arayla tam kür almaktadır ve ikinci kür öncesi alınan kandan yapılan analizde CTC sayısı 0'a düşmüştür (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10).

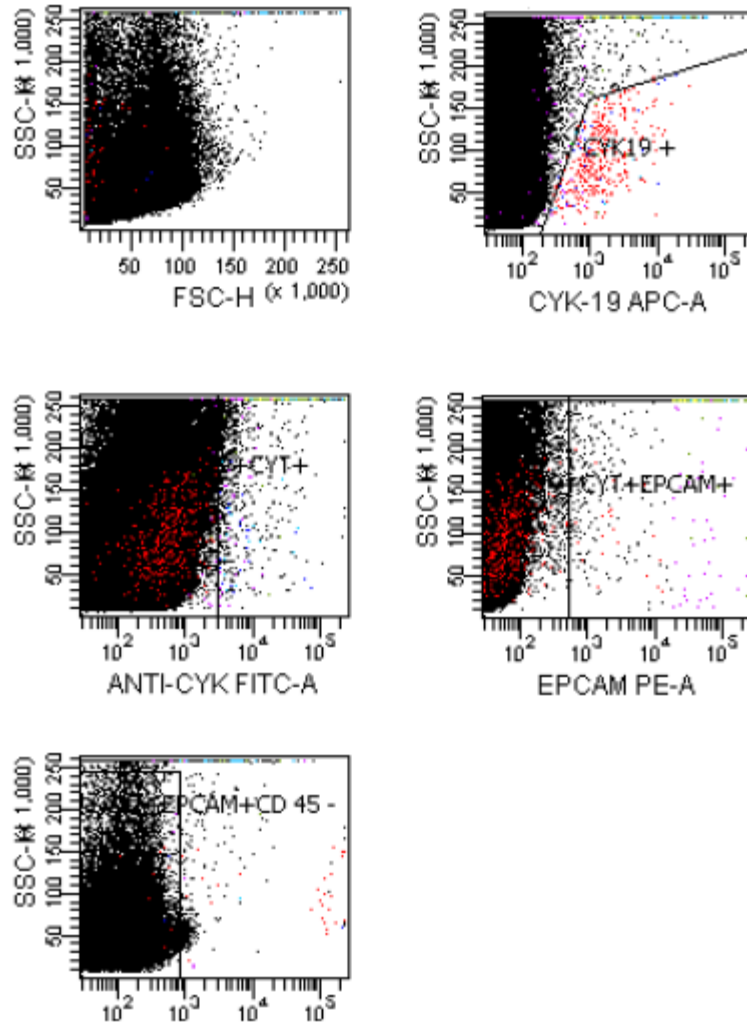




Şekil 4.1. H1'e ait ilk kür öncesi kontrol tüpünün FC analizinin kapılama grafiği.

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	41,113	###	100.0
■ CYK19 +	2	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	0	###	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	###	0.0

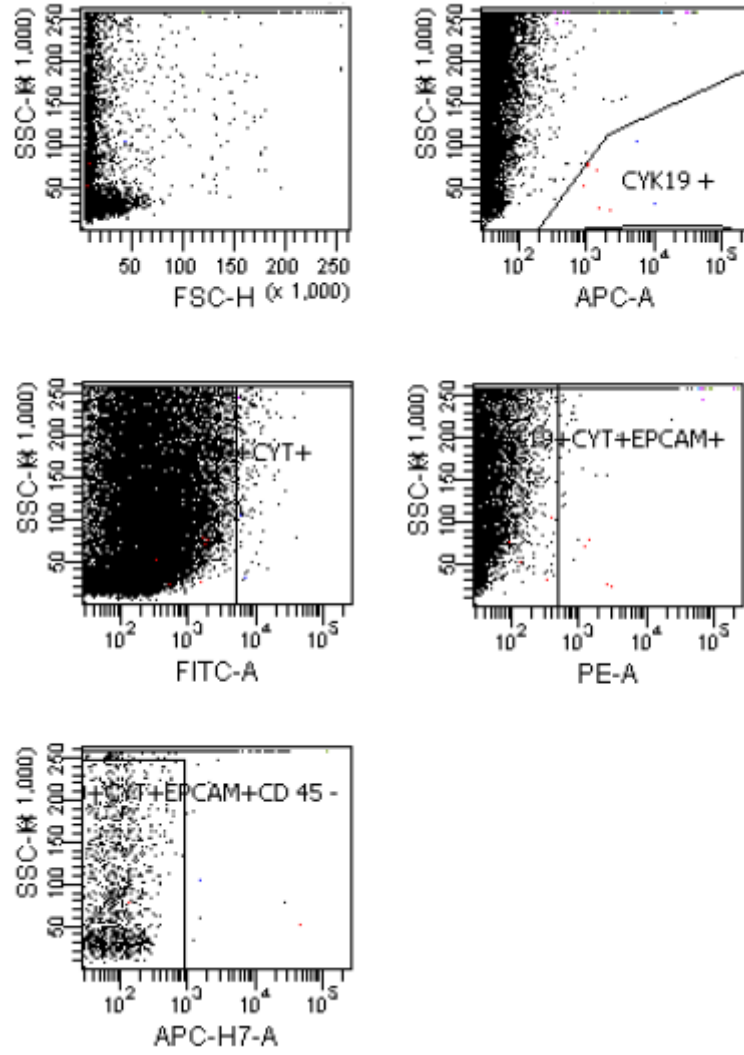
Şekil 4.2. H1'e ait ilk kür öncesi FC analizinin sonucu.



Şekil 4.3. H1'e ait ilk kür öncesi deney tüpünün FC analizinin kapılama grafiği.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,254,307	###	100.0
■ CYK19 +	387	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+	56	14.5	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	29	51.8	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	7	24.1	0.0

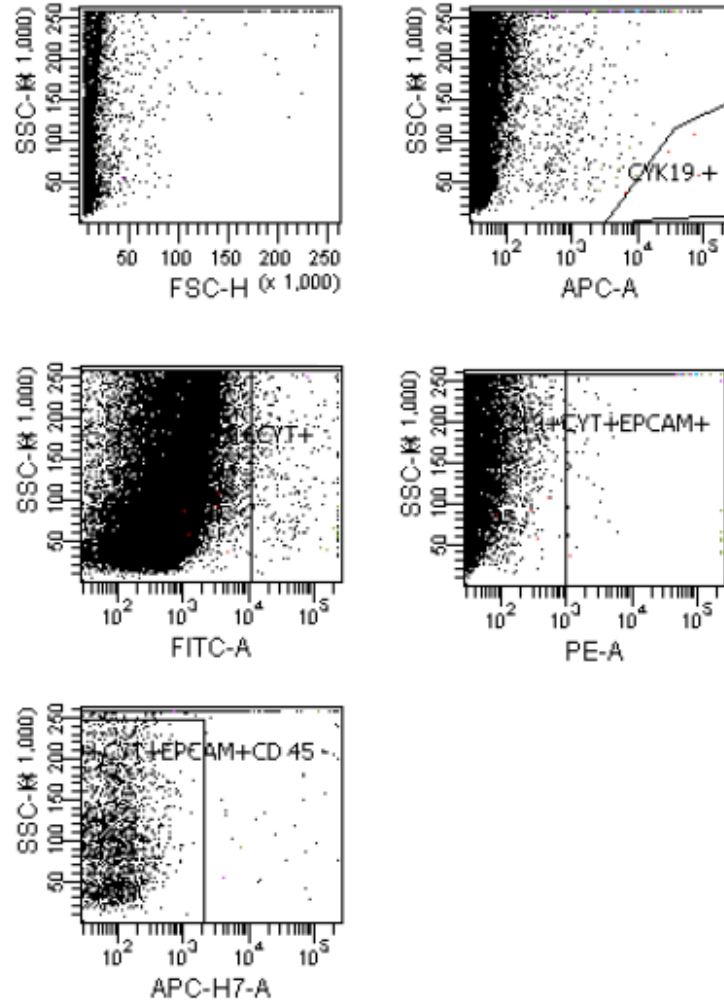
Şekil 4.4. H1'e ait ilk kür öncesi deney tüpünün FC analizinin sonucu.



Şekil 4.5. H1'e ait ikinci kür öncesi kontrol tüpünün FC analizinin kapılama grafiği.

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	55,260	####	100.0
CYK19 +	8	0.0	0.0
CYT19+CYT+	2	25.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

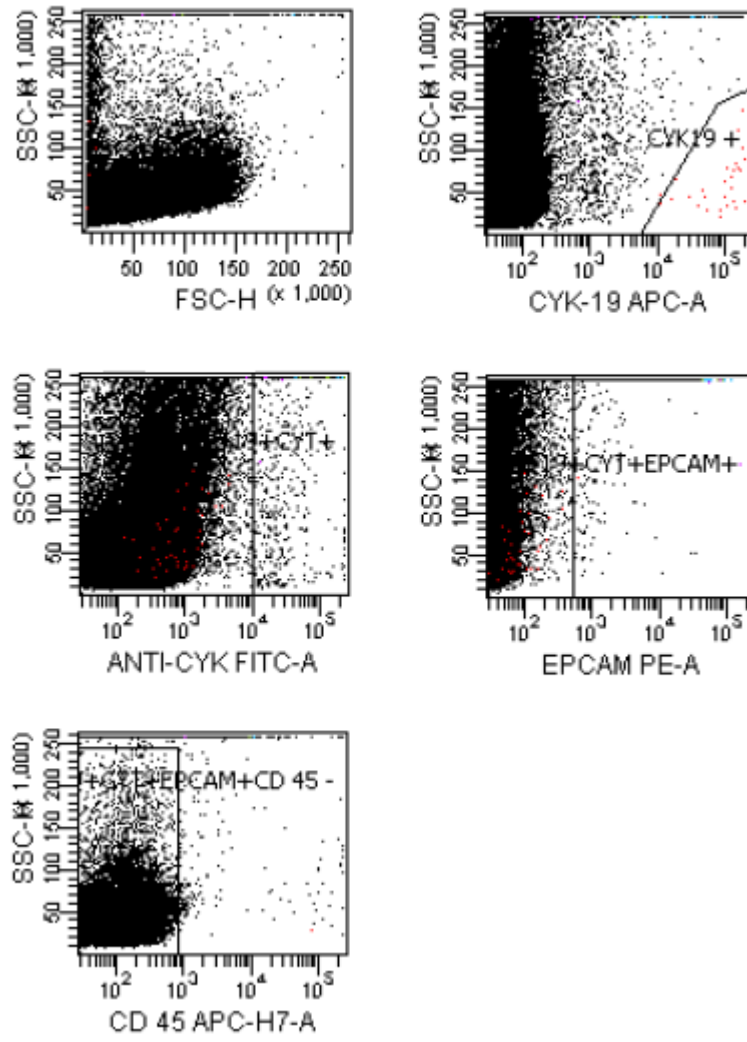
Şekil 4.6. H1'e ait ikinci kür öncesi kontrol tüpünün FC analizinin sonucu..



Şekil 4.7. H1'e ait ikinci kür öncesi izotip tüpünün FC analizinin kapılama grafiği.

Tube: IZOTIP			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	78,671	###	100.0
CYK19 +	6	0.0	0.0
CYT19+CYT+	1	16.7	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	1	100.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45-	0	0.0	0.0

Şekil 4.8. H1'e ait ikinci kür öncesi izotip tüpünün FC analizinin sonucu..



Şekil 4.9. H1'e ait ikinci kür öncesi deney tüpünün FC analizinin kapılama grafiği.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	507,784	###	100.0
CYK19 +	43	0.0	0.0
CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	###	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	###	0.0

Şekil 4.10. H1'e ait ikinci kür öncesi deney tüpünün FC analizinin sonucu..

H2 yeni teşhis konulmuş, hiç tedavi almamış, T4N0M0, evresi II olan yani erken evre kolon kanseri bir hastaya aittir. H2 daha öncesinde ameliyat olmuştur ve erken tanı konulan bir hastadır. Bu hastada da CTC sayısı 0 olana kadar kür öncesi takibi yapılmıştır. Analiz verilerinde değerlendirmesi cut-off değerlerine göre alınmış ve cut-off  $\geq 3$  CTC pozitif değerlendirilmiştir. İlk kür öncesinde alınan kandan yapılan analizde 6 CTC saptanmıştır. Hasta bir ay arayla tam kür almaktadır ve ikinci kür öncesi alınan kandan yapılan analizde CTC sayısı 0'a düşmüştür (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14).

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	100,000	####	100.0
■ CYK19 +	0	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+	0	####	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.11. H2'ye ait ilk kür öncesi kontrol tüpünün FC analizinin sonucu..

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	5,450,000	####	100.0
■ CYK19 +	31,501	0.6	0.6
■ CYT19+CYT+	21,213	67.3	0.4
■ CYT19+CYT+EPCAM+	3,286	15.5	0.1
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	6	0.2	0.0

Şekil 4.12. H2'ye ait ilk kür öncesi deney tüpünün FC analizinin sonucu..

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	86,448	####	100.0
■ CYK19 +	2	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.13. H2'ye ait ikinci kür öncesi kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	4,785,259	####	100.0
CYK19 +	1,996	0.0	0.0
CYT19+CYT+	25	1.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	16	64.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

**Şekil 4.14.** H2'ye ait ikinci kür öncesi deney tüpünün FC analizinin sonucu.

H3 yeni teşhis konulmuş, hiçbir tedavi almamış, T3N0M0, evresi II olan yani erken evre kolon kanseri bir hastaya aittir. H3 daha öncesinde ameliyat olmuştur ve erken tanı konulan bir hastadır. Bu hastada takip analizi yapılmamıştır. Analiz verilerinde değerlendirmesi cut-off değerlerine göre alınmış ve cut-off  $\geq 3$  CTC pozitif değerlendirilmiştir. İlk kür öncesinde alınan kandan yapılan analizde 10 CTC saptanmıştır (Şekil 4.15, Şekil 4.16).

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,045	####	100.0
CYK19 +	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+	0	####	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

**Şekil 4.15.** H3'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	152,262	####	100.0
CYK19 +	1,805	1.2	1.2
CYT19+CYT+	937	51.9	0.6
CYT19+CYT+EPCAM+	482	51.4	0.3
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	10	2.1	0.0

**Şekil 4.16.** H3'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

H4 yeni teşhis konulmuş, hiçbir tedavi almamış, T3N0M0, evresi II olan yani erken evre kolon kanseri bir hastaya aittir. H4 daha öncesinde ameliyat olmamıştır ve erken tanı konulan bir hastadır. Bu hastaya takip analizi yapılmamıştır. Analiz



verilerinde değerlendirmesi cut-off değerlerine göre alınmış ve cut-off  $\geq 3$  CTC pozitif değerlendirilmiştir. İlk kür öncesinde alınan kandan yapılan analizde 4 CTC saptanmıştır (Şekil 4.17, Şekil 4.18).

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	43,911	####	100.0
CYK19 +	2	0.0	0.0
CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.17. H4'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,782,063	####	100.0
CYK19 +	1,490	0.1	0.1
CYT19+CYT+	61	4.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	38	62.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	4	10.5	0.0

Şekil 4.18. H4'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

H5 yeni teşhis konulmuş, hiçbir tedavi almamış, T3NxM1, evresi IV olan yani ileri evre kolon kanseri bir hastaya aittir. H5'i daha öncesinde ameliyat olmamıştır. Bu hastada takip analizi uygulanmamıştır. Analiz verilerinde değerlendirmesi cut-off değerlerine göre alınmış ve cut-off  $\geq 3$  CTC pozitif değerlendirilmiştir. İlk kür öncesinde alınan kandan yapılan analizde 13 CTC saptanmıştır (Şekil 4.19, Şekil 4.20).

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	27,140	####	100.0
CYK19 +	3	0.0	0.0
CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.19. H5'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,588,677	####	100.0
CYK19 +	12,446	0.8	0.8
CYT19+CYT+	657	5.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	237	36.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	13	5.5	0.0

Şekil 4.20. H5'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

H6 yeni teşhis konulmuş, hiçbir tedavi almamış, T4N1M1, evresi III olan yani ileri evre kolon kanseri bir hastaya aittir. H6 daha öncesinde ameliyat olmuştur. Bu hastada takip analizi yapılmamıştır. Analiz verilerinde değerlendirmesi cut-off değerlerine göre alınmış ve cut-off  $\geq 3$  CTC pozitif değerlendirilmiştir. İlk kür öncesinde alınan kandan yapılan analizde 3 CTC saptanmıştır (Şekil 4.21, Şekil 4.22).

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,504	####	100.0
CYK19 +	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+	0	####	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.21. H6'ya ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	869,643	####	100.0
CYK19 +	28,763	3.3	3.3
CYT19+CYT+	952	3.3	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+	269	28.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	3	1.1	0.0

Şekil 4.22. H6'ya ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

H7 yeni teşhis konulmuş, hiçbir tedavi almamış, T3N2M0, evresi III olan yani ileri evre kolon kanseri bir hastaya aittir. H7 daha öncesinde ameliyat olmuştur. Bu hastada takip analizi yapılmamıştır. Analiz verilerinde değerlendirmesi cut-off

değerlerine göre alınmış ve cut-off  $\geq 3$  CTC pozitif değerlendirilmiştir. İlk kür öncesinde alınan kandan yapılan analizde 4 CTC saptanmıştır (Şekil 4.23, Şekil 4.24).

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	100,000	####	100.0
CYK19 +	2	0.0	0.0
CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.23. H7'ye ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,204,598	####	100.0
CYK19 +	1,827	0.2	0.2
CYT19+CYT+	97	5.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	84	86.6	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	4	4.8	0.0

Şekil 4.24. H7'ye ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

H8 yeni teşhis konulmuş, hiçbir tedavi almamış, T4N0M0 evresi II olan yani erken evre rektum kanseri bir hastaya aittir. H8' daha öncesinde ameliyat olmuştur. Bu hastada takip analizi yapılmamıştır. Analiz verilerinde değerlendirmesi cut-off değerlerine göre alınmış ve cut-off  $\geq 3$  CTC pozitif değerlendirilmiştir. İlk kür öncesinde alınan kandan yapılan analizde 4 CTC saptanmıştır (Şekil 4.25, Şekil 4.26).

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,077	###	100.0
CYK19 +	1	0.0	0.0
CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	###	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	###	0.0

Şekil 4.25. H8'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	172,465	###	100.0
CYK19 +	345	0.2	0.2
CYT19+CYT+	81	23.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	11	13.6	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	4	36.4	0.0

Şekil 4.26. H8'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

H9 yeni teşhis konulmuş, hiçbir tedavi almamış, T4N2M1, evresi IV olan yani ileri evre rektum kanseri bir hastaya aittir. H9 daha öncesinde ameliyat olmuştur. Bu hastada takip analizi yapılmamıştır. Analiz verilerinde değerlendirmesi cut-off değerlerine göre alınmış ve cut-off  $\geq 3$  CTC pozitif değerlendirilmiştir. İlk kür öncesinde alınan kandan yapılan analizde 3 CTC saptanmıştır (Şekil 4.27, Şekil 4.28).

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	21,732	###	100.0
CYK19 +	4	0.0	0.0
CYT19+CYT+	2	50.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	2	100.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.27. H9'a ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	666,730	####	100.0
CYK19 +	626	0.1	0.1
CYT19+CYT+	17	2.7	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	13	76.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	3	23.1	0.0

Şekil 4.28. H9'a ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

H10 yeni teşhis konulmuş, hiçbir tedavi almamış, T4N2M0 evresi III olan yani ileri evre rektum kanseri bir hastaya aittir. H10 daha öncesinde ameliyat olmuştur. Bu hastada takip analizi yapılmamıştır. Analiz verilerinde değerlendirmesi cut-off değerlerine göre alınmış ve cut-off  $\geq 3$  CTC pozitif değerlendirilmiştir. İlk kür öncesinde alınan kandan yapılan analizde 2 CTC saptanmıştır (Şekil 4.29, Şekil 4.30).

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	11,421	####	100.0
CYK19 +	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+	0	####	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.29. H10'a ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	182,328	####	100.0
CYK19 +	307	0.2	0.2
CYT19+CYT+	13	4.2	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	8	61.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	2	25.0	0.0

Şekil 4.30. H10'a ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

Kontrol grubu hiçbir kanser teşhisi almamış sağlıklı bireylerden oluşmaktadır. Analiz verilerinin değerlendirilmesi cut-off değerlerine göre alınmış ve cut-off  $\geq 3$  CTC pozitif değerlendirilmiştir. Kontrol grubu analizlerinden hepsinde 0 CTC saptanmıştır.

K1'e izotip analizi yapılmıştır. K1'in FC analiz verileri Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36 'de gösterilmiştir.

K2'nin FC analiz verileri Şekil 4.37 ve Şekil 4.38'de gösterilmiştir.

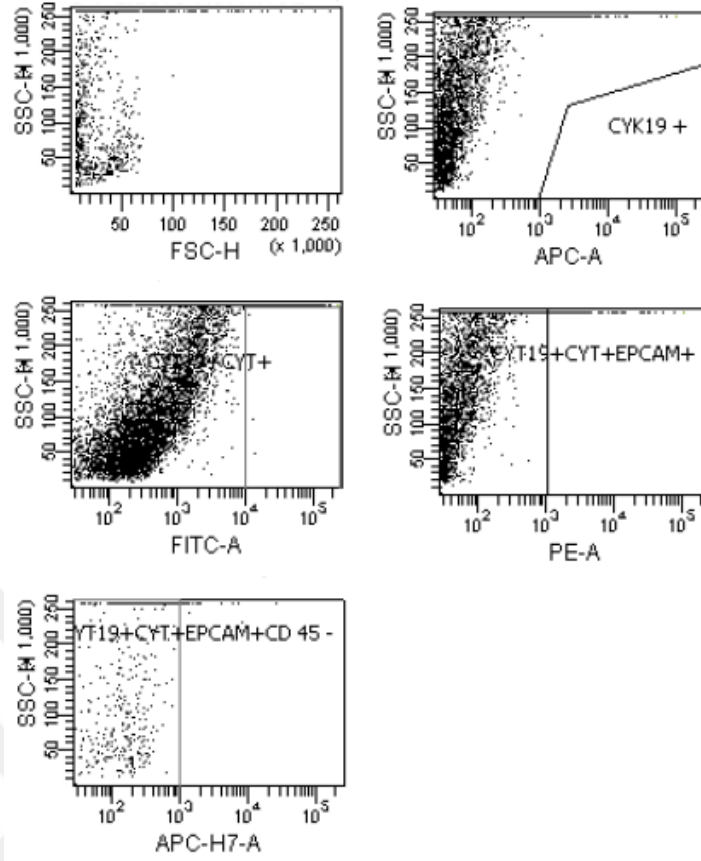
K3 'nin FC analiz verileri Şekil 4.39 ve Şekil 4.40'de gösterilmiştir.

K4'nin FC analiz verileri Şekil 4.41 ve Şekil 4.42'de gösterilmiştir.

K5'nin FC analiz verileri Şekil 4.43 ve Şekil 4.44'de gösterilmiştir.

K6'nin FC analiz verileri Şekil 4.45 ve Şekil 4.46'de gösterilmiştir.

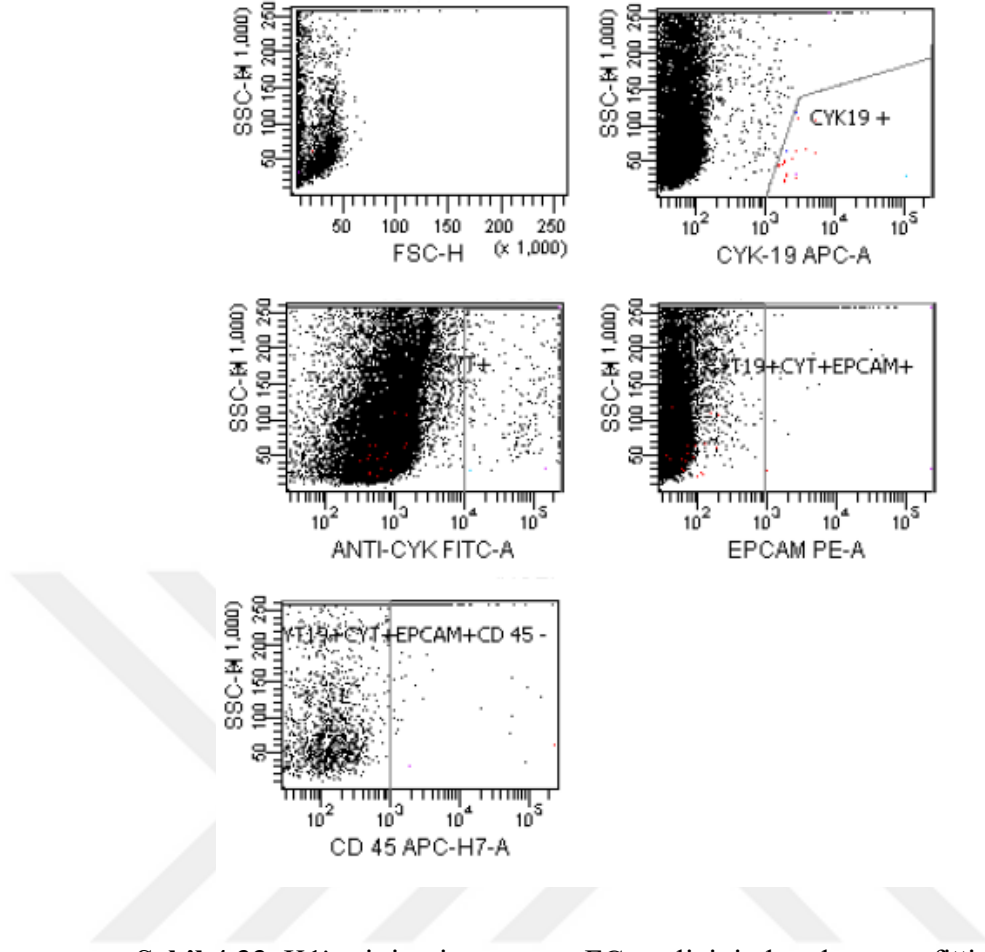
K7'nin FC analiz verileri Şekil 4.47 ve Şekil 4.48'de gösterilmiştir.



Şekil 4.31. K1'e ait kontrol tüpünün FC analizinin kapılama grafiği.

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	8,329	####	100.0
■ CYK19 +	0	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+	0	####	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.32. K1'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

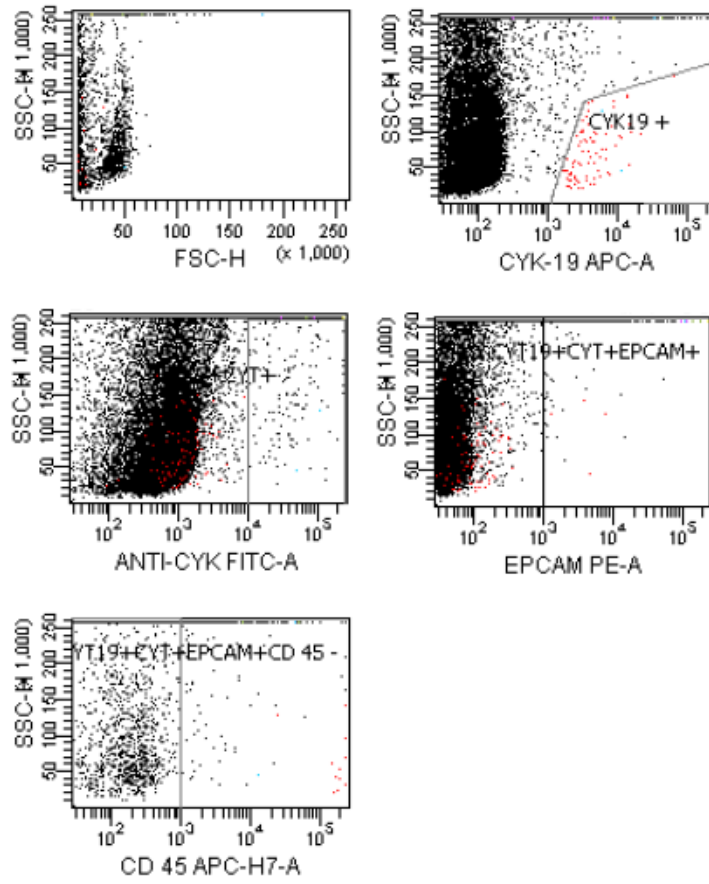


Şekil 4.33. K1'e ait izotip tüpünün FC analizinin kapılma grafiği.

Tube: IZOTIP			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,836	###	100.0
CYK19 +	21	0.1	0.1
CYT19+CYT+	4	19.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	2	50.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.34. K1'e ait izotip tüpünün FC analizinin sonucu.





Şekil 4.35. K1'e ait deney tüpünün FC analizinin kapılama grafiği.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	24,574	####	100.0
■ CYK19 +	86	0.3	0.3
■ CYT19+CYT+	2	2.3	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	2	100.0	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.36. K1'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	11,541	####	100.0
CYK19 +	1	0.0	0.0
CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.37. K2'ye ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	272,200	####	100.0
CYK19 +	858	0.3	0.3
CYT19+CYT+	13	1.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	3	23.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.38. K2'e ait deney tüpünün analizinin sonucu.

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	14,229	####	100.0
CYK19 +	2	0.0	0.0
CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.39. K3'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	226,125	####	100.0
CYK19 +	1,389	0.6	0.6
CYT19+CYT+	17	1.2	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	2	11.8	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.40. K3'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	12,950	####	100.0
■ CYK19 +	0	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+	0	####	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.41. K4'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	344,446	####	100.0
■ CYK19 +	443	0.1	0.1
■ CYT19+CYT+	14	3.2	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	13	92.9	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.42. K4'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	35,163	####	100.0
■ CYK19 +	1	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.43. K5'e ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	800,805	####	100.0
■ CYK19 +	425	0.1	0.1
■ CYT19+CYT+	6	1.4	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	2	33.3	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.44. K5'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	22,680	####	100.0
■ CYK19 +	1	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.45. K6'ya ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	386,525	####	100.0
■ CYK19 +	664	0.2	0.2
■ CYT19+CYT+	2	0.3	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	2	100.0	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.46. K6'ya ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	14,959	####	100.0
■ CYK19 +	0	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+	0	####	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	0	####	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.47. K7'ye ait kontrol tüpünün FC analizinin sonucu.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	312,373	####	100.0
■ CYK19 +	95,558	30.6	30.6
■ CYT19+CYT+	24	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	24	100.0	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.48. K7'e ait deney tüpünün FC analizinin sonucu.

## 5. TARTIŞMA

Kanser, gelişimi uzun süren bir hastalıktır. Erken evrelerde teşhis edilmesi tedavisinde kolaylık sağlar. Kanser teşhisinde kullanılan klasik yöntemlerde, X-Ray ve/veya bilgisayar tomografisi (BT) taramalar ile organlardaki büyümelere ve değişimlere dayanarak tespit edilmektedir (174). Şüpheli durumlarda katı biyopsi yapılarak kanser teşhisi netleştirilir. Fakat bu yöntemlerle erken teşhis pek mümkün olmamaktadır. Kanser vakalarının büyük bir kısmı ileri evrelerde teşhis edilmektedir (174). Klasik teşhis yöntemlerinde karşılaşılan çeşitli problemler, bu yöntemlerin verimliliğini azaltmaktadır. En önemli problemler, spektrum aralığının sınırlı oluşu, penetrasyon derinliğinin yeterli olmayışı, hedef hücrelerin tam olarak odaklanamaması ve sinyal oranının düşük olmasıdır (175).

CRC, akciğer ve meme kanserlerinden sonra dünyada üçüncü sırada görülmektedir (3). CRC'nin ortaya çıkışı, çevresel ve/veya endojen karsinojenlerin kanser gelişimini teşvik etmesiyle başlar (176). CRC gelişiminde, benign adenomlar aracılığıyla normal epitel hücrelerin malign karsinoma dönüşmesi ve metastazla sonuçlanması çok basamaklı bir süreçtir (177,178). CRC tanısında kullanılan yaygın yöntemler; kolonoskopi, BT, manyetik rezonans görüntüleme (MR), pozitron emisyon tomografisi (PET)dir (179).

Klinik uygulamalarda, tümör belirteçleri tümör dokusunda eksprese edilir ve kanser taramalarında potansiyel olarak yararlanılmaktadır. İleri evre kanserde yüksek seviyelerde eksprese edilen belirteçler ile kanserin ilerlemesi izlenebilir ve tedavi sonrası nüks tespit edilebilir (180). CRC için karsinoembriyonik antijen (CEA) ve karbohidrat antijen (CA)19-9 prognozun belirlenmesinde, tedaviye cevabın takibinde ve hatta hastanın yaşam süresine etkisi açısından değerlendirilmektedir (181). Fakat bu tümör belirteçleri tütün kullanımı, benign tümör oluşumu, çeşitli bağırsak rahatsızlıkları gibi durumlarda da artış göstermektedir (182). Bundan dolayı literatürde bulunan birçok çalışmada bu belirteçlerin düşük veya yüksek değerleri farklılık göstermiştir (183,184). CTC'ler, primer tümör dokusunda bulunan moleküler özelliklere sahiptir (111,112). Bu nedenle, CTC'ler sıvı biyopsiyle kolaylıkla elde edilebilir ve prognostik belirteç olarak kullanılabilir (12). CTC'leri

kullanarak ilaç hassasiyetini ve direncini değerlendirmek ve tedaviyi takiben hastanın prognozunu tahmin etmek mümkün olabilir (97,106).

Son yıllarda, CTC'lerin saptanması için çeşitli teknolojiler ortaya çıkmıştır. Bu teknolojilerin çoğu, CTC'leri daha etkin bir tespit ve yakalama yöntemi oluşturmak için immünolojik ya da fiziksel özelliklerine dayanmaktadır (111).

Günümüze kadar kanda nadir bulunması nedeniyle CTC üzerine araştırmalar sınırlıdır ve avantajları nedeniyle en sık kullanılan yöntem CellSearch cihazı ile olmuştur. Başlangıçta 2004'te meme kanseri, daha sonra 2007'de CRC ve 2008'de prostat kanseri için FDA onayı almıştır. Bugüne kadar CRC'de CTC analizi içeren çalışmaların çoğunda bu teknoloji kullanmıştır. Yalnız immünomanyetik olarak EpCAM tabanlı CTC'yi ayıran sistemlerde, epitelyal olmayan hücrelerin kaçıışı olmaktadır ve bu sistemde yarı-otomatik kapalı bir sistem olduğundan tek bir hücrenin doğrulanmasına izin vermemektedir (185). Fenotipik ve morfolojik kriterleri kullanarak CellSearch sistemiyle yakalanan floresans görüntülerin retrospesifik analizi, CTC'ler için farklı derecede tanım ve frekans aralığı getirerek klinik önemini ortaya koymuştur. Bu gözlemler, karsinomalı hastalarda EpCAM /CK+/CD45- belirteçleri ile CTC tespit edilememesi durumu, primer tümörlerin ekspresyon eksikliği veya epitelyal-mezenkimal dönüşüm esnasında antijenlerin kaybedilmesi ile açıklanabilir (111).

CTC popülasyonları; epitelyal tümör hücreleri, mezenkimal tümör hücreleri, epitelyal mezenkimal hibrid tümör hücreleri, tümör kök hücreleri ve dolaşımdaki tümör mikroembolisi olarak adlandırılan tümör hücresi kümeleri de dahil olmak üzere çok farklı fenotipleri olan kanser hücrelerinden oluşur (98,145,186-189). Bilinen bu CTC popülasyonları arasında kanser kök hücresi kümelerinin yüksek invazivlikte metastaza asıl sebep olan popülasyon olduğu gösterilmiştir (121,190). Klinik olarak, kanser kök hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavilere karşı dirençli oldukları kanıtlanmıştır ve bu da onları tedavi sonrası ortaya çıkan tümör nükslerinin ana sebebi olduğunu düşündürmektedir (191).

EMT sırasında tümör hücreleri bir epitelden mezenkimal fenotipe geçerek, farklılaşır, motilite artar ve hücre adhezyonunu kaybeder (112). Bunun metastatik

potansiyeli, hücre sağkalımı ve ilaç direncini artırdığı düşünülmektedir (112,192). Dönüşüme uğramış hücreler azalmış EpCAM ve CK ekspresyonu ile karakterizedir. Bir çok CTC tespit yöntemi ve immüno manyetik CTC sayımının temelini bu belirteçler oluşturduğu için tespit problemleri bu faktörlere dayanır (193).

CTC tespiti, tekrarlayan veya metastatik hastalığa yakalanma riskinden dolayı özellikle erken evre hastalıklarda önemlidir (12). 2008 yılında da Cohen ve ark. metastatik CRC hastalarında tedavi sırasında ve sonrasında periferik kanda CTC sayısı ile progresyonsuz sağkalım ve genel sağ kalım oranları arasındaki ilişkinin prognostik bilgi sağlayacağı sonucuna varmışlardır(194).

Sastre ve ark. 2008 yılında CRC hastalarının periferik kanında CTC'lerin klinik ve patolojik korelasyonunu değerlendirmişlerdir. 2008 yılına kadar erken evre CRC hastalarına dair CellSearch sistemi ile ilgili bir rapor olmadığından yola çıkarak evre II ve evre III CRC hastalarında CTC değerlerinin klinik değerlerle uyumlu olmasa bile evrelendirme açısından uyumlu olduğunu gözlemlemişlerdir (195). Maesrto ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı bir çalışmada ise, CellSearch kullanılarak TNM evrelendirmesi ile CRC hastalarında CTC arasındaki korelasyonun anlamlı olduğunu bulmuşlardır (196).

Sastre ve ark. (195) ve Maesrto ve ark. (196) ulaşılmış oldukları sonuçlar, birbirleriyle uyumlu olmasına rağmen araştırma sonuçlarımızı desteklememektedir. Ancak, söz konusu çalışmamız da hasta evrelemesinde TNM evrelendirilmesi kullanılmıştır. Tüm hastaların kanlarında CTC tespiti yapılmıştır fakat kendi içerisinde evrelendirme ile bir korelasyon kurulamamıştır. İstatiksel açıdan yeterli sayıda hasta tabanlı çalışmalar planlanmasıyla bahsi geçen araştırmalarla uyumlu sonuçların bulunacağı düşünülmektedir.

2010 yılında CellSearch kullanarak ileri evre CRC hastalarında CTC sayısı ile CT sonuçlarını karşılaştıran Tol ve ark. tedavi öncesi ve tedavi sırasında kaydettikleri sonuçlara göre CTC değerlerinin, kemoterapi ve BT sonuçlarına ek bilgi sağlayacağına, CTC ile BT sonuçlarının birleştirilerek daha doğru sonuçlar çıkaracağı kanısına varmışlardır (197). Çalışmamızda kullandığımız yöntem ile herhangi bir patolojik veya klinik yöntem arasında kıyaslama yapılmamıştır. Ancak

hasta grubunda, tedavi öncesi ve sonrası olarak takip grubu bulunmaktadır. Tedavi öncesi ve sonrası analiz sonuçlarına bakıldığında ise CTC sayısının cut-off değeri üzerinden 0'a inmesi, hem klinik hem patolojik sonuçların değerlendirilmesi açısından CTC'nin tespiti; klinikte yönlendirici biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Matsusaka ve ark. 2011 yılında kemoterapiye yanıt veren CRC hastalarından CTC tespiti araştırması yapmıştır. Çalışmaya metastatik CRC hastaları dahil edilmiş, kemoterapiden önce ve sonra kan örnekleri alınarak immünomanyetik yöntemle CTC sayımı yapılmıştır. Tedaviye kısmi yanıt veren hastalarda CEA değeri yükselirken yanıt veren hastalarda CTC sayısında artış gözlenmemiştir. CTC sayısı tespitinin klinik açıdan tedavinin yönlendirilmesine katkıda bulunduğu düşünülmüştür (198). Söz konusu çalışmanın yönteminin yetersiz olduğu düşünülmekte ise de kemoterapiye yanıt veren hastaların tedavisinin yönlendirilmesi açısından CTC tespiti bizim çalışmamızı da desteklemektedir. Takip hastalarımızda kemoterapi öncesi CTC sayısı cut-off değerinin üstünde gösterirken, kemoterapi sonrası analiz sonuçları 0 CTC göstermiş olması kemoterapiye yanıt veren hastaların saptanması açısından literatürü desteklemekte ve cut-off değerinin önemini belirtmektedir. Aynı zamanda iki aşamalı negatif seçim ile CellSearch benzeri FC'de çoklu belirteç kullanılması sonuçlarımızı daha da güvenilir hale getirmiştir.

Barbazan ve ark.'nın 2012 yılında yaptıkları çalışmada, CTC'lerin varlığının hematojen yayılımın göstergesi ve uzak metastazların oluşumu için önemli prognostik değere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Periferik kanda CTC varlığı meme, prostat, akciğer veya metastatik CRC gibi farklı kanser türlerinde zayıf bir prognoz ile ilişkilendirildiğinden dolayı, periferik kandan örnek alma yoluyla rutin klinik uygulamalarda bir sıvı biyopsi yöntemi olarak hizmet verebileceği ve bir alternatif yöntem olması öngörülmektedir (199). Dolayısıyla günümüzde popülerite kazanan sıvı biyopsi çalışmamızda CTC tespitinin önemini ortaya koymaktadır.

Pilati ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmada, metastatik CRC hastalarda ameliyat sonrası kanser kök hücrelerinin CD133 ekspresyonunu qRT-PCR kullanarak değerlendirmişlerdir. Sonuçlarının prognostik olarak anlamlı olduğu sonucuna varmışlardır (200). Tseng ve ark. 2015 yılında bu çalışmayı destekleyen



benzer bir çalışma yapmışlardır. Fakat sadece kök hücrelerin değerlendirmesi ve qRT-PCR yöntemi ile sonuçların tartışılması çalışmayı zayıf bırakmıştır. EMT nedeniyle birden fazla belirteç ekspresyonu değerlendirmesinin daha sağlıklı olacağı düşünülmektedir (201). Bu nedenle çalışmamızda hem iki farklı negatif seçim hem de çoklu alt popülasyona sahip antikolar kullanılmıştır. FC hem çoklu alt popülasyon analizi yapmak hem de saptama açısından qRT-PCR analizlerine göre daha güvenilirdir.

Ning ve arkadaşları 2015 yılında metastatik CRC hastalarında qRT-PCR kullanarak CK 20 ekspresyonunu değerlendirmişlerdir (202). Gastrointestinal tümörlerde CK 20 spesifik ve hassas bir işaretleyicidir. qRT-PCR yönteminin immünomanyetik tabanlı yöntemlere ve CellSearch yöntemine kıyasla daha üstün hassaslık sergilemiştir. Fakat bu çalışmada yine de yanlış pozitiflikten dolayı tek belirteç kullanılması çalışmayı zayıf kılmıştır. Ancak, EMT durumunda saptama problemlerine elverişli bir yöntem olduğu kabul edilmiştir (202). Çalışmamızda FC ile yüksek hassasiyet ve yanlış pozitifliğe karşı çoklu belirteç ekspresyonu ile veri analizi çalışmamızın güçlü yanlarını ortaya koymaktadır.

Bazı çalışmalarda ise kanserin nüks etmediği hastalara odaklanmanın, metastatik süreci ve kanserin uyku halini anlamada çok önemli olduğu iddia edilmektedir (203). Örneğin, meme kanseri hastalarında, nüksün söz konusu olmadığı ve hastalık belirtisi olmayan kadınlarda, kanser cerrahisinde 7-22 yıl sonra CTC izole edildiği görülmektedir (203,204). Kemik iliğine ya da diğer solid dokulara yerleşen CTC'lerden köken aldığı düşünülen yerleşmiş hücreler metastatik mikroçevre sağlayabilir ve bu nedenle CTC biyolojisi önem kazanmaktadır (192,205). Bu açıdan düşünüldüğünde tanı ve teşhis açısından sıvı biyopsinin de önemi artmıştır. Dolayısıyla sağkalım açısından kanser hastalarının belli aralıklarla yaptırdukları rutin tahlilleri ile birlikte sıvı biyopsi yöntemi tam kandan CTC tespiti olarak eklenmesinin önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Rahbari ve ark. 2010'da yaptığı bir meta-analizde periferik kanda bulunan CTC'ler primer CRC hastalarında kötü prognozun göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Deneve ve ark. CellSearch sistemi ile periferik kanda bulunan CTC'lerin tümör metastazı ve prognozu ile korelasyonu olduğunu göstermiştir (206).

Fakat Hiraiwa ve ark. ile Kuboki ve ark. prognostik etkilerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermişlerdir (207,208). Bu nedenle CellSearch sistemi ile periferik kanda CTC tespitinin prognostik rolü tartışmalıdır. Ancak, CTC tespitinin önemini belirten kapsamlı meta-analizler, CTC bulunan hastaların CTC bulunmayan hastalara göre daha kötü genel sağkalım ve prognosyonsuz sağkalıma sahip olduğunu göstermektedir. Başka bir çalışma da ise, CRC hastalarında CellSearch sistemi ile periferik kanda saptanmasının anlamlı derecede prognoz ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (209). Çalışmamızda, kemoterapi alan hastalarda kemoterapi öncesi saptanan CTC sayılarının ve alt popülasyonlar arası ekspresyonun, kemoterapi sonrası azalmasının prognoz ile ilişkili olduğu sonucu öngörülmektedir.

Gorges ve ark. 2016 yılında metastatik CRC hastalarında EMT gibi negatif etkileri göz önünde bulunduran bir çalışma yapmışlardır (210). Bu çalışmada AdnaTest ve CellSearch yönteminin kombinasyonu kullanılmıştır. Kemoterapi tedavisi almış hastalar için cut-off  $\geq 3$  olarak kabul edilmiştir. CTC'lerin prognosyonsuz sağ kalım ve genel sağkalım arasında anlamlı ilişkileri olduğu bulunmuştur (210). Sonuç olarak CTC üzerine olan bir takım çalışmalar uzun yıllardır CTC ile sağkalım ve metastaz ilişkisini çözebilmek için sürmektedir. Farklı fenotipe sahip olması nedeniyle önce CTC tanımlama ve saptaması için farklı yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır (111). Godger ve ark. yaptığı çalışma bu yöntemlerden biri olarak literatüre de yerini almıştır (210). Söz konusu çalışmamızın da literatüre vereceği katkının değerli olduğunu düşünmekteyiz.

CellSearch'ün CTC belirleme teknolojileri arasında tek FDA onayına sahip yöntem olarak kalmış olması yeni yöntem geliştirmenin önemini gün geçtikçe önemli kılmaktadır. Aynı zamanda CellSearch yönteminin EpCAM tabanlı olması yanı sıra çok pahalı bir cihaz olması negatif bir özelliğidir. Bu cihazla, aynı çalışma prensibine sahip FC eş zamanlı çoklu belirteç kullanarak analiz yapılmasına fırsat vermektedir. Bu özelliğinden dolayı çalışmamızda FC kullanılmıştır. Bu cihazın öncesinde periferik kanda bulunan hücrelerinin ve CTC'nin biyofiziksel özellikleri düşünülerek ficol yoğunluk gradyanti uygulaması, yine biyolojik açıdan düşünülerek MACS immünomanyetik yöntem ile negatif seçilim yapılması CTC tespiti için büyük bir avantaj sağlamaktadır.

İzole edilen CTC'lerin genomiks çalışmaları somatik mutasyon analizleri için hala başlangıç evresindedir (99,211). CRC hastalığının genetik risk faktörlerinin analiz edilebilmesi için FC, CellSearch ile karşılaştırıldığında daha kolay kullanım sağlayacaktır.

Çalışmamızda yeni teşhis konulmuş ve hiçbir tedavi almamış CRC hastalarına ait kan numuneleri kullanılmıştır. CRC hasta kanlarında varlığı öngörülen CTC alt popülasyon miktarlarının, herhangi bir tedaviden dolayı değişebileceği araştırmalarda gösterilmiştir. Bundan dolayı, yeni teşhis konulmuş ve hiçbir tedavi almamış CRC hasta kan numuneleri kullanılmıştır.

Çalışmamızda FC ile CTC'lerin tespiti için belirlenen CTC sayıları cut-off değeri  $\geq 3$  kabul edilmiştir. 10 CRC hastasının hepsinde CTC tespiti yapılırken, %90'ı cut-off değerinin üzerinde, %10'unda ise CTC sayısı 2 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında modifiye edilmiş söz konusu yöntemimizin başarılı olduğu anlaşılmaktadır.

Aynı zamanda CTC'nin tespiti için kullandığımız EpCAM, CD45, CK 7,8 ve CK 14,15,16,19 antikorları çoklu analiz amaçlı olarak sadece çalışmamızda kullanılmıştır. Dolayısıyla çoklu kullanımı ile bu antikorların CTC üzerinde ekprese olması ve alt popülasyon oluşturması hem çalışmaya hem literatüre büyük katkı sağlayacaktır. Bu antikorların ilerleyen çalışmalarımızda CTC belirlenmesinde biyobelirteç rolü üstleneceğini düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- ✓ Toplamda yeni teşhis konulmuş, hiç tedavi almamış, 7'si kolon kanseri, 3'ü rektum kanseri hastanın kan numunesi alınarak CTC analizleri yapılmıştır. Cut-off  $\geq 3$  kabul edilerek değerlendirme yapılmıştır.
- ✓ Kontrol olarak, hastalar ile aynı yaş aralığına sahip, hiçbir kanser teşhisi konulmamış 7 sağlıklı bireyin kan numunesi analiz edilmiştir. Sağlıklı bireylerin hiç birinde CTC saptanmamıştır.
- ✓ Toplamda 9 hastanın analiz verilerine göre saptanan CTC sayısı cut-off değerinin üzerinde, 1 hastanın CTC sayısı ise cut-off değerinin altında saptanmıştır. Fakat literatüre bakıldığı zaman cut-off değerini 2 kabul eden çalışmalarda bulunduğu için CTC sayısı 2 saptanan hastanın verileride gözardı edilmemelidir.
- ✓ Hastaları kendi aralarında erken evre ve ileri evre olarak ayırdığımız zaman 5 birey erken evre, diğer 5 birey ise ileri evre olarak değerlendirilmiştir. Erken evre ve ileri evre CRC hastalarında saptanan CTC sayıları kıyaslandığında erken evre hastaların CTC sayısı ortalama olarak daha yüksek bulunmuştur. İleri evrede CTC'nin farklı fenotipine veya EMT sürecine bağlı olarak CTC sayısı azalmıştır. Bu veriler klinikte kullanılan diğer test sonuçlarıyla kıyaslandığında ve yorumlandığında klinik açıdan faydalı sonuçlar verecektir.
- ✓ 2 hasta birey tedavi sürecinde, CTC sayıları 0 olana kadar takip edilmiştir. Literatür ile karşılaştırıldığında, kemoterapiye yanıt veren hastaların belirlenmesi için benzer çalışmalar yapılmıştır. Çalışmamızda, CTC sayısının kemoterapi sonrası azalması veya 0'a ulaşması hastanın kemoterapiye yanıt verdiğini göstermektedir. Bu sonuç klinik açıdan anlamlılık taşımaktadır. Ancak, tedavi yanıtı hastadan hastaya farklılık gösterdiğinden dolayı ve ayrıca tüm hastaların ilaç direnci kazanabileceği göz önünde bulundurulduğunda uzun süreli hasta takip çalışmaları yapılması planlanmaktadır.

- ✓ Hasta bireylerden 3'ü opere olmamış diğer 7'si opere olmuştur. Opere olmayan hastalardan 2'si ileri evre diğer 1'i erken evredir. Opere olmayan erken evre hastalarda CTC saptanması klinikte erken teşhis açısından yarar sağlayacaktır.
- ✓ Literatürde bulunan bazı çalışmalarda hastalığı nüks etmeyen hastalara odaklanarak 7-22 yıl sonra CTC izole edilmiştir. Buna benzer çalışmalar düşünüldüğünde opere olmuş veya olmamış, kemoterapi alan, tedavi gördükten sonra iyileşen hastalarda CTC saptama ve izolasyonunun klinik açıdan önemini ortaya koymaktadır.
- ✓ CTC'lerin 7.5 ml periferik tam kanda  $10^5$ - $10^8$  hücreye karşılık 1 gibi nadir bir sayıda bulunması ve morfolojik değişkenliklerinden dolayı saptanmasının kısıtlaması sebebiyle modifiye metodumuzda iki aşamalı zenginleştirme kullanılmıştır. Literatürde CTC sayısı için cut-off değerini 2 kabul eden çalışmaları düşündüğümüz zaman saptadığımız CTC verileri zenginleştirmelerimizin başarı oranının yüksek olduğunu göstermektedir.
- ✓ CTC saptama yöntemlerinden tek FDA onaylı yarı otomatik lazer sistemli cihaz CellSearch cihazıdır. Çalışmamızda, FC kullanılarak çoklu işaretleme yapılmıştır. FC cihazlarının saptama dışında CTC ayırma özelliği de vardır ve ilerideki çalışmalarımızda CTC izolasyonu; CTC biyolojisinin araştırılması gibi çalışmaların önünü açacaktır.
- ✓ Çalışmamızda hücre dışına CD45 ve EpCAM işaretlemesi, hücre içine çoklu antikor olan CK 7,8 ve CK 14,15,16,19 antikor işaretlemesi yapılmıştır. CTC saptaması bu şekilde daha kolay, güvenilir ve kapsamlı olmuştur. Yapılacak alt popülasyon çalışmaları ile CTC biyolojisi, morfolojik özellikleri gibi araştırmalara ışık tutacaktır.
- ✓ CellSearch cihazı EpCAM tabanlı olduğu için CTC morfolojisinin değişmesi ve EMTden dolayı kaçışa sebep olabileceği yönünde eleştiriler almıştır. Bu nedenle bizim çalışmamızda FC analizlerinde kapılama işlemi CK19 tabanlı yapılarak daha sağlıklı sonuca ulaştığımızı düşünmekteyiz. Aynı zamanda

çoklu işaretlemenin alt grupları oluşturulmuştur. İlerleyen çalışmalarda alt popülasyonlar izole edilip kendi aralarında ve CTC ile kıyaslanarak literatüre ışık tutabilir.

- ✓ Yönteme ve veri analizlerine bakıldığında yöntemin ülke literatüründe ilk çalışmalar arasında yer aldığı görülmektedir. Kullanılan belirteçler ile pek çok kanser hastalarında CTC tespitinin yapılması hem belirteçlere bir nevi biyobelirteç görevi verirken diğer yandan klinik açıdan faydalı olacaktır.
- ✓ Tüm hastalarda CTC saptanması, CTC'nin CRC'li hastalarda tanı ve teşhise katkı sağlayabileceği sonucunu göstermiştir. Kontrol bireylerinde 0 CTC verilerine ulaşılması CTC'nin prognoz ile dolayısıyla sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermektedir.
- ✓ Literatürde CTC'nin metastaz ile ilişkisi olduğunu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar düşünüldüğünde CTC'nin tespiti biyomedikal anlamda önem arz etmektedir.
- ✓ CRC teşhisi konulmuş hastalarda CTC'nin tespiti tedavinin yönlendirilmesi, kullanılan tedaviye alınan cevabı, prognoz ve sağ kalım üzerine bilgi vererek kliniğe katkı sağlayacaktır.
- ✓ Çalışmamızda kullanılan antikorlar, epitelyal kökenli ve mezenkimal kökenli CTC alt popülasyonlarının tespitinde kullanılmıştır. İleride yapılacak olan çalışmalarda, kanser kök hücrelerine (CD44 vb. gibi), mezenkimal kökenli hücrelere (vimentin vb. gibi) ve diğer alt popülasyonlara yönelik farklı antikorlar kullanılarak CTC alt popülasyonlarının belirlenmesi düşünülmektedir.
- ✓ Sonuç olarak, CRC veya diğer kanser türleri için erken teşhis de CTC'nin tespiti gelişmelerin önünü açmıştır.

- ✓ Ülkede literatürde CTC tespitinde FC ile yapılan ilk çalışma olup, söz konusu yöntem ile CRC'li hastalarda CTC saptama oranının yüksek olması FC'nin güvenilirliğini, modifiye edilen tüm yöntemin geçerliliğini ortaya koymuştur. Ülkede literatürde çalışmaların önünü açacağı düşünülmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton M. Cancer and genomics, *Nature*, 2001, 6822:850-2.
2. Williams GM. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment, *Toxicology*, 2001, 14:166 (1- 2):3-10.
3. Globacon, [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Son erişim tarihi: 20 Aralık 2016.
4. Erturk T, Kaygusuz A, Dagtekin T, Diñçel U, Kınacı E, Çalıskan YK. Bir Olgu Nedeniyle Kolonda Senkron Tümör Tanısında Güçlükler, *İstanbul Tıp Dergisi*, 2004, 4:45-48.
5. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer, *Ann. Intern. Med.* 2002, 603–612.
6. Macartney-Coxson DP, Hood KA, Shi HJ, Ward T, Wiles A, O'cocnnor R, Hall DA, Lea RA, Royds JA, Stubbs RS, Rooker S. Metastatic susceptibility locus, an 8p hot-spot for tumour progression disrupted in colorectal liver metastases candidate genes examined at the DNA, mRNA and protein level, *BMC Cancer*, 2008, 8:187.
7. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells, *Nature*, 2016, 529:298–306.
8. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells versus imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12:6403–6409.
9. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard JW, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer, *N. Engl. J. Med.*, 2004, 351:781–791.



10. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV, Terstappen LW. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival, *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12:4218–4224.
11. Plaks V, Koopman CD, Werb Z. Circulating Tumor Cells, *Science*, 2013, 13:341(6151).
12. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cells metastasis, *Science*, 2011, 331:1559.
13. Lowes LE, Allan AL. Recent advances in the molecular characterization of circulating tumor cells, *Cancers(Basel)*, 2014, 13(6):595-624.
14. Mittag A, Tarnok A. Recent advances in cytometry applications: Preclinical, clinical, and cell biology, *Methods Cell Biol.*, 2011, 103:1–20.
15. Jaye DL, Bray RA, Gebel HM, Harris WAC, Waller EK. Translational applications of flow cytometry in clinical practice, *J. Immunol.*, 2012, 188: 4715-19.
16. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Carlo C. Maley Cancer as an evolutionary and ecological process, *Nat Rev Cancer*, 2006, 6:924-35.
17. Davis EM, Heath RJ. Nanotechnology and Cancer, *The Annual Review of Medicine*, 2008, 59: 251–265.
18. Yokuş B, Çakır DÜ. Kanser biyokimyası, *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2012, 1: 7-18.
19. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene, *Nat Rev Cancer*, 2008, 8:671–82.
20. Herceg Z, Hainaut P. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis., *Molecular Oncology*, 2007, 1:26-41.
21. Hesketh Robin. *Introduction to cancer biology*. UK, Cambridge University Press, 2013: 102-149.

22. Marino-Enriquez A, Fletcher CDM. Shouldn't we care about the biology of benign tumours?, *Nat Rev Cancer*, 2014, 14:11:701-702.
23. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms, *Cell*, 2011, 14;147(2): 275–292.
24. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. Çeviri: Çevikbaş U. Robbins Temel Patoloji, 9. baskı. Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri Tic. Ltd. Şti., 2013: 593-600.
25. Elenbaas L, Spirio F, Koerner MD, Fleming DB, Zimonjic JL, Donaher NC, Popescu WC. Human breast cancer cells generated by onkogenic transformation of primary mammary epithelial cells, *Genes Dev.*, 2001, 15: 50–65.
26. Pallis AG, Karamouzis MV. DNA repair pathways and their implication in cancer treatment, *Cancer and Metastasis Reviews*, 2010, 29:677–84.
27. Engelsen IB, Stefansson IM, Beroukhim R, Sellers WR, Meyerson M, Akslen LA, Salseven HB. HER-2/neu expression is associated with high tumor cell proliferation and aggressive phenotype in a population based patient series of endometrial carcinomas, *Int. J. Oncol.*, 2008, 32 (2): 307-316.
28. Argyle DJ, Khanna C. Tumor biology and metastasis, *Small Clinical Veterinary Oncology*, fifth ed. Saunders Elsevier, St Louis, MO, USA(2013): 30-50.
29. Corn PG., El-Deiry WS. Derangement of growth and differentiation control in onkogenesis, *Bioessays*, 2002, 1:83-90.
30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 2011, 4;144(5):646-74.
31. Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell cycle regulation, *Nat. Rev. Genet.*, 2008, 9: 115-128.
32. Goliath CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review, *Int. J. Clin. Prac.*, 2004, 58(12):1134–1141.

33. Kong N, Fotouhi N, Wovkulich PM, Roberts J. Cell cycle inhibitors for the treatment of cancer, *Drugs of the Future*, 2003, 28(9):881–896.
34. Ianari A, Natale T, Calo E, Ferretti E, Alesse E, Screpanti I, Haigis K, Gulino A, Lees JA. Proapoptotic function of the retinoblastoma tumour suppressor protein, *Cancer Cell*, 2009, 15:184–94.
35. Herold S, Herkert B, Eilers M. Facilitating replication under stress: an oncogenic function of MYC?, *Nat. Rev. Cancer*, 2009, 9:441–444.
36. Rothenberg ME, Clarke MF, Diehn M. The Myc connection: ES cells and cancer, *Cell*, 2010, 143:184–186.
37. Geçkil. Bilim Web. <https://bilimweb.wordpress.com/2017/03/10/haftanin-posteri-hucre-dongusu-ve-kanser/>. 1 Haziran 2017.
38. Foster I. Cancer: A cell cycle defect, *Radiography*, 2008, 14: 144-149.
39. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Petre A, Mounawar M, Plymoth A, de Fromental CC, Hainaut P. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective, *Cancer Gene Ther.*, 2009, 16:1:1-12.
40. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2:647-656.
41. Lazebnik Y. What are the hallmarks of cancer?. *Nat. Rev. Cancer*, 2010, 10:232–235.
42. Heldin CH, Landstrom M, Moustakas A. Mechanism of TGF- $\beta$  signalling to growth arrest, apoptosis, and epithelial–mesenchymal transition, *Current Opinion in Cell Biology*, 2009, 21:166–76.
43. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm, *Nat. Rev. Cancer*, 2009, 9:153–66.
44. Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer’s addiction to blocks in apoptosis, *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 121-132.

45. Wyllie AH. 'Where, O death, is thy sting?' A brief review of apoptosis biology, *Molecular Neurobiology*, 2010, 42: 4–9.
46. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer, *Carcinogenesis*, 2010, 31:9–18.
47. Shay JW, Wright WE. Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, 5: 577-584.
48. Arora R, Schmitt D, Karanam B, Tan M, Yates C, Dean-Colomb W. Inhibition of the Warburg effect with a natural compound reveals a novel measurement for determining the metastatic potential of breast cancers. *Oncotarget*, 2015, 6:2:662-678.
49. Zhao T, Ren H, Jia L, Chen J, Xin W, Yan F, Li J, Wang X, Gao S, Qian D, Huang C, Hap J. Inhibition of HIF-1alpha by PX-478 enhances the anti-tumor effect of gemcitabine by inducing immunogenic cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Oncotarget*, 2014, 10:6:4:2250-2262.
50. Zhang XD, Qin ZH, Wang J. The role of p53 in cell metabolism, *Acta. Pharmacol Sin.*, 2010, 31(9):1208-1212.
51. Airley RE, Mobasher A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics, *Chemotherapy*, 2007,53(4):233-256.
52. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism, *Nat. Rev. Cancer*, 2011, 11:85–95.
53. Mızrak D, Akbulut H. Kanser hastası ve açlık, *Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi*, 2015, 30:3.
54. Gruning NM, Ralser M. Cancer: sacrifice for survival, *Nature*, 2011, 480: 190–191.
55. Kerbel RS. Tumour angiogenesis, *New England Journal of Medicine*, 2008, 358:2039–2049.

56. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8:464-478.
57. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis, *Nature*, 2011, 473:298–307.
58. Zhang T, Niu X, Liao L, Cho EA, Yang H. The contributions of hif-target genes to tumor growth in RCC, *PLoS One*, 2013, 8(11): e80544.
59. Kim LC, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2009, 6(10): 587-595.
60. Oklu R, Hesketh R, Walker TG, Wicky S. Angiogenesis and current antiangiogenic strategies for the treatment of cancer, *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 2010, 21:1791–805.
61. Svokos KA, Salhia B, Toms SA. Molecular biology of brain metastasis, *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, 15(6):9519-9530.
62. Schilling D, Todenhöfer T, Hennenlotter J, Schwentner C, Fehm T, Stenzl A. Isolated, disseminated and circulating tumour cells in prostate cancer, *Nature Reviews Urology*, 2012, 9(8), 448-463.
63. Junttila MR, Evan GI. P53-A jack of all trades but master of none, *Nat. Rev. Cancer*, 2009, 9: 821–829.
64. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth, *Nat. Med.*, 2001, 7:1194–1201.
65. Lambert AW, Diwakar RP, Robert AW. Emerging biological principles of metastasis, *Cell*, 2017, 168:4: 670-691.
66. Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase activity of

breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis, *Stem Cells*, 2011, 29:32–45.

67. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye Kanser İstatistikleri. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html>. 19 Haziran 2016.
68. Papamichael D, Audisio RA., Management of colorectal cancers in older people. UK, Springer, 2013: 29-81.
69. Pedro LP, Efrain BC, Isabel A, Antonio M, Saul RR, Marcos GB. Prognostic significance of circumferential margin involvement in rectal adenocarcinoma treated with preoperative chemoradiotherapy and low anterior resection, *Journal of Surgical Oncology*, 2005, 90: 20-25.
70. Boyle P, Leon ME. Epidemiology of colorectal cancer, *Br Med Bull.*, 2002, 64 (1): 1-25.
71. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors, *Clin. Colon. Rectal. Surg.*, 2009, 22(4): 191–197.
72. Bong YS, Assefnia S, Tuohy T, Neklason DW, Burt RW, Ahn J, Bueno De Mesquita PJ, Byers SW. A role for the vitamin D pathway in non-intestinal lesions in genetic and carcinogen models of colorectal cancer and in familial adenomatous polyposi,. *Oncotarget.*,2016, 6;7(49):80508-80520.
73. Buğra D. Kolon, Rektum, Anal Bölge Anatomisi, Türkiye Klinikleri Journal of Surgery, 2004, 9(1):1-9.
74. Premkumar K. Anatomy and physiology. Çeviri: Özdiñler AR. Anatomi ve Fizyoloji, 3. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitapevi, 2015: 478-479.
75. Gordon PH, Nivatvongs S. Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum, and Anus, 3rd ed. New York, Informa Healthcare, 2007: 1-7.
76. Ross MH, Pawlina W. Histology: A Text And Atlas. Çeviri: Baykal B. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas, 6. Baskı. Akara, Palme Yayıncılık, 2014: 601604.

77. <https://sekedarperawat.blogspot.com.tr/2017/01/lp-ileus-obstruksi-obstruksi-usus.html>. Son erişim tarihi: 1 Haziran 2017.
78. Calva D, Howe JR. Hamartomatous polyposis syndromes, *Surg. Clin. North. Am.*, 2008, 88:779–817.
79. Engin O. Colon polyps and the prevention of colorectal cancer. New York, Springer International Publishing, 2015.
80. Quirke P, Risio M, Lambert R, Von Karsa L, Vieth M. International Agency for Research on Cancer. Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis. *Virchows Arch* , 2011, 458:1–19.
81. Moisio AL, Järvinen H, Peltomäki P. Genetic and clinical characterisation of familial adenomatous polyposis: a population based study, *Gut*, 2002, 50(6):845–850.
82. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing, *Gastroenterology*, 2001, 121(1):198–213.
83. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer, *Gastroenterology*, 2010, 138:2073-2087.
84. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer, *Gastroenterology*, 2010, 138: 2059-2072.
85. Saif MW, Chu E. Biology of colorectal cancer, *Cancer J.*, 2010, 16:196-201.
86. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer, *N. Engl. J Med.*, 2009, 361:2449-2460.
87. Young AM, Hobbs R, Kerr DJ, eds. ABC of colorectal cancer. Vol. 187. John Wiley & Sons, 2011.
88. Compton CC. Surgical pathology of colorectal cancer, Totowa, NJ: Humana Press, 2002:247.
89. American Joint Committee on Cancer. Colon and rectum. Philadelphia: Lippincott–Raven, 2002:113.

90. Dobrucali. Kalın bağırsak kanserleri, <http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/2017>. 1 Temmuz 2017.
91. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer, *Clin. Chem.*, 2013, 59(1):110-8.
92. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death, *Aust. Med. J.*, 1869, 14:146–149.
93. Sellwood RA, Kuper SWA, Burn JI, Wallace EN. Circulating Cancer Cells, *Br. Med. J.*, 1964, 27;1(5399):1683–1686.
94. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy, *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10:8152–62.
95. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, Klein C, Saini M, Bäuerle T, Wallwiener M, Holland-Letz T, Höfner T, Sprick M, Scharpf M, Marmé F, Sinn HP, Pantel K, Weichert W, Trumpp A. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay, *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31(6):539-544.
96. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massagué J. Tumor self-seeding by circulating cancer cells, *Cell*, 2009, 139:1315–1326.
97. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells, *Nat. Rev. Cancer*, 2008, 8:329–340.
98. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions, *Cancer Letters*, 2007, 253:180–204.
99. Heitzer E, Auer M, Ulz P, Geigl JB, Speicher MR. Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies, *Genome Med.*, 2013, 5:73.



100. Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, Savage H, Pandita A, Yeh RF, Pirzkall A, Fine BM, Amler LC, Chen DS, Lackner MR. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells, *PLoS One*, 2010, 8;5(9):e12517.
101. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, Inserra E, Diederichs S, Iafrate AJ, Bell DW, Digumarthy S, Muzikansky A, Irimia D, Settleman J, Tompkins RG, Lynch TJ, Toner M, Haber DA. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells, *N. Engl. J. Med.*, 2008, 24;359(4):366-77.
102. Hou HW, Warkiani ME, Khoo BL, Li ZR, Soo RA, Tan DSW, Lim WT, Han J, Bhagat AA, Lim CT. Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces, *Scenfitic Rep.*, 2013, 3:1259.
103. Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA, *Annu Rev. Med.*, 2012, 63:199-215.
104. Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: Detection systems, molecular characterization, and future challenges, *Clin. Chem.*, 2011, 57:1242–55.
105. Lowes LE, Goodale D, Keeney M, Allan AL. Image cytometry analysis of circulating tumor cells, *Methods Cell Biol.*, 2011, 102:261–90.
106. Pantel K, Alix-Panabieres C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives, *Trends Mol. Med.*, 2010, 16:398–406.
107. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies, *Cancer Metastasis Rev.*, 2012, 31:673–87.
108. Joosse S, Pantel K. Biologic Challenges in the detection of circulating tumor cells, *Cancer Res.*, 2013, 73:8–11.
109. Alunni-Fabbroni M, Sandri MT. Circulating tumor cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization, *Methods*, 2010, 50: 289–297.

110. Lowes LE, Hedley BD, Keeney M, Allan AL. User-Defined protein marker assay development for characterization of circulating tumor cells using the CellSearch system, *Cytometry*, 2012, 81A: 983-995.
111. Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research, *Nat. Rev. Cancer*, 2014, 14:623-31.
112. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization, *J. Cell. Biol.*, 2011, 192:373-82.
113. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells, *Cell*, 2008, 133:704-715.
114. Adamczyk LA, Williams H, Frankow A, Ellis HP, Haynes HR, Perks C, Holly JM, Kurian KM. Current understanding of circulating tumor cells-potential value in malignancies of the central nervous system, *Frontiers in neurology*, 2015, 6:174.
115. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, Uhr JW. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, 95:4589-4594.
116. Lara O, Tong X, Zborowski M, Chalmers JJ. Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation, *Exp. Hematol.*, 2004, 32:891-904.
117. Yang L, Lang JC, Balasubramanian P, Jatana KR, Schuller D, Agrawal A, Zborowski M, Chalmers JJ. Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells, *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 102:521-534.
118. Raimondi C, Nicolazzo C, Gradilone A, Giannini G, De Falco E, Chimenti I, Varriale E, Hauch S, Plappert L, Cortesi E, Gazzaniga P. Circulating tumor cells: exploring intratumor heterogeneity of colorectal cancer, *Cancer Biol. Ther.*, 2014, 15:496-503.

119. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS, *Cytometry*, 1990, 11:231–238.
120. Talasz AH, Powell AA, Huber DE, Berbee JG, Roh KH, Yu W, Xiao W, Davis MM, Pease RF, Mindrinos MN, Jeffrey SS, Davis RW. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device, *PNAS*, 2009, 106:3970–3975.
121. Powell AA, Talasz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, Deng G, Telli ML, Advani RH, Carlson RW, Mollick JA, Sheth S, Kurian AW, Ford JM, Stockdale FE, Quake SR, Pease RF, Mindrinos MN, Bhanot G, Dairkee SH, Davis RW, Jeffrey SS. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines, *PLoS One*, 2012, 7:e33788.
122. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology, *Nature*, 2007, 450:1235–1239.
123. Galletti G, Sung MS, Vahdat LT, Shah MA, Santana SM, Altavilla G, Kirby BJ, Giannakakou P. Isolation of breast cancer and gastric cancer circulating tumor cells by use of an anti HER2-based microfluidic device, *Lab. Chip.*, 2014, 14:147–156.
124. Kirby BJ, Jodari M, Loftus MS, Gakhar G, Pratt ED, Chanel-Vos C, Gleghorn JP, Santana SM, Liu H, Smith JP, Navarro VN, Tagawa ST, Bander NH, Nanus DM, Giannakakou P. Functional characterization of circulating tumor cells with a prostate-cancer-specific microfluidic device, *PLoS One*, 2012, 7:e35976.
125. Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, Coutts SM, Zomorodi M, Pham T, Bischoff FZ, Pircher TJ. Detection of Epcam-Negative and Cytokeratin-Negative circulating tumor cells in peripheral blood, *Journal of Oncology*, 2011, 252361.
126. Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, Yu M, Miyamoto DT, Waltman BA, Rothenberg SM, Shah AM, Smas ME, Korir GK, Floyd FP, Gilman AJ, Lord JB, Winokur D, Springer S, Irimia D, Nagrath S, Sequist LV, Lee RJ, Isselbacher KJ,

- Maheswaran S, Haber DA, Toner M. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip, *PNAS*, 201, 107:18392–18397.
127. Sheng W, Ogunwobi OO, Chen T, Zhang J, George TJ, Liu C, Fan ZH. Capture, release and culture of circulating tumor cells from pancreatic cancer patients using an enhanced mixing chip, *Lab. Chip.*, 2014, 14:89–98.
128. Kim TH, Zhang Z, Azizi E, Pham TM, Paoletti C. Sensitive capture of circulating tumour cells by functionalized graphene oxide nanosheets, *Nature Nanotechnology*, 2013, 8:735–741.
129. Autebert J, Coudert B, Champ J, Saias L, Guneri ET, Lebofsky R, Bidard FC, Pierga JY, Farace F, Descroix S, Malaquin L, Viovy JL. High purity microfluidic sorting and analysis of circulating tumor cells: towards routine mutation detection, *Lab. Chip.*, 2015, 15:2090–2101.
130. Saliba AE, Saias L, Psychari E, Minc N, Simon D, Bidard FC, Mathiot C, Pierga JY, Fraissier V, Salamero J, Saada V, Farace F, Vielh P, Malaquin L, Viovy JL. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays, *PNAS*, 2010, 107:14524–14529.
131. Earhart CM, Hughes CE, Gaster RS, Ooi CC, Wilson RJ, Zhou LY, Humke EW, Xu L, Wong DJ, Willingham SB, Schwartz EJ, Weissman IL, Jeffrey SS, Neal JW, Rohatgi R, Wakelee HA, Wang SX. Isolation and mutational analysis of circulating tumor cells from lung cancer patients with magnetic sifters and biochips, *Lab. Chip.*, 2014, 7;14(1):78-88.
132. Winer-Jones JP, Vahidi B, Arquilevich N, Fang C, Ferguson S, Harkins D, Hill C, Klem E, Pagano PC, Peasley C, Romero J, Shartle R, Vasko RC, Strauss WM, Dempsey PW. Circulating tumor cells: clinically relevant molecular access based on a novel CTC flow cell, *PLoS One*, 2014, 9:e86717.
133. Harb W, Fan A, Tran T, Danila DC, Keys D, Schwartz M, Ionescu-Zanetti C. Mutational analysis of circulating tumor cells using a novel microfluidic collection device and qPCR assay. *Translational Oncology*, 2013, 6:528–538.

134. Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, Lim EJ, Pai V, Ozkumur E, Martel JM, Kojic N, Smith K, Chen PI, Yang J, Hwang H, Morgan B, Trautwein J, Barber TA, Stott SL, Maheswaran S, Kapur R, Haber DA, Toner M. Microfluidic, markerfree isolation of circulating tumor cells from blood samples, *Nature Protocols*, 2014, 9:694–710.
135. Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, Emmink BL, Miyamoto DT, Brachtel E, Yu M, Chen PI, Morgan B, Trautwein J, Kimura A, Sengupta S, Stott SL, Karabacak NM, Barber TA, Walsh JR, Smith K, Spuhler PS, Sullivan JP, Lee RJ, Ting DT, Luo X, Shaw AT, Bardia A, Sequist LV, Louis DN, Maheswaran S, Kapur R, Haber DA, Toner M. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and independent sorting of rare circulating tumor cells, *Sci. Transl. Med.*, 2013, 5(179):179ra47.
136. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, Gasiorowski L, Murawa D, Nowaczyk P, Tomasi T, Weber E, Dworacki G, Morgenthaler NG, Jansen H, Propping C, Sterzynska K, Dyszkiewicz W, Zabel M, Kiechle M, Reuning U, Schmitt M, Lücke K. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire, *Int. J. Oncol.*, 2012, 41:1241–1250.
137. Harouaka RA, Nisic M, Zheng SY. Circulating tumor cell enrichment based on physical properties, *J. of Lab. Automation*, 2013, 18:455–468.
138. Cho EH, Wendel M, Luttgen M, Yoshioka C, Marrinucci D, Lazar D, Schram E, Nieva J, Bazhenova L, Morgan A, Ko AH, Korn WM, Kolatkar A, Bethel K, Kuhn P. Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors, *Phys. Biol.*, 2012, 9:016001.
139. Sollier E, Go DE, Che J, Gossett DR, O'Byrne S, Weaver WM, Kummer N, Rettig M, Goldman J, Nickols N, McCloskey S, Kulkarni RP, Di Carlo D. Sizeselective collection of circulating tumor cells using Vortex technology, *Lab. Chip.*, 2014, 14:63–77
140. Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfarth C, Knebel Doeberitz von M. Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.*, 1998, 4:343–348.

141. Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, Thorban S, Nekarda H, Siewert JR. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood, *Cytometry*, 2002, 49:150–158.
142. He W, Kularatne SA, Kalli KR, Prendergast FG, Amato RJ, Klee GG, Hartmann LC, Low PS. Quantitation of circulating tumor cells in blood samples from ovarian and prostate cancer patients using tumor-specific fluorescent ligands, *Int. J. Cancer*, 2008, 123:1968–1973.
143. Campton DE, Ramirez AB, Nordberg JJ, Drovetto N, Clein AC, Varshavskaya P, Friemel BH, Quarre S, Breman A, Dorschner M, Blau S, Blau CA, Sabath DE, Stilwell JL, Kaldjian EP. High-recovery visual identification and single-cell retrieval of circulating tumor cells for genomic analysis using a dual-technology platform integrated with automated immunofluorescence staining, *BMC Cancer*, 2015, 15:360.
144. Seal SH. A sieve for the isolation of cancer cells and other Large cells from the blood, *Cancer*, 1964, 17:637–642.
145. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells, *AJPA*, 2000, 156:57–63.
146. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Jänne PA, Kuang Y, Yanagita M, Wang L, Berkowitz JA, Distel RJ, Cayre YE. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells, 2011, *Anticancer Res.*, 31:427–441.
147. Zhou MD, Hao S, Williams AJ, Harouaka RA, Schrand B, Rawal S, Ao Z, Brenneman R, Gilboa E, Lu B, Wang S, Zhu J, Datar R, Cote R, Tai YC, Zheng SY. Separable bilayer microfiltration device for viable label-free enrichment of circulating tumour cells, *Sci. Rep.*, 2014, 4:7392.

148. Sarioglu AF, Aceto N, Kojic N, Donaldson MC, Zeinali M, Hamza B, Engstrom A, Zhu H, Sundaresan TK, Miyamoto DT, Luo X, Bardia A, Ben SW, Ramaswamy S, Shioda T, Ting DT, Stott SL, Kapur R, Maheswaran S, Haber DA, Toner M. A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters, *Nat. Methods.*, 2015, 12:685-691.
149. Di Carlo D. Inertial microfluidics, *Lab. Chip.*, 2009, 9:3038–3046.
150. Gupta V, Jafferji I, Garza M, Melnikova VO, Hasegawa DK, Pethig R, Davis DW. ApoStream(™), a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood, *Biomicrofluidics*, 2012, 6:24133.
151. Manaresi N, Romani A, Medoro G, Altomare L, Leonardi A, Tartagni M, Guerrieri R. A cmos chip for individual cell manipulation and detection, *IEEE J. Solid-State Circuits*, 2003, 38:2297–2305.
152. Casavant BP, Mosher R, Warrick JW, Maccoux LJ, Berry SMF, Becker JT, Chen V, Lang JM, McNeel DG, Beebe DJ. A negative selection methodology using a microfluidic platform for the isolation and enumeration of circulating tumor cells, *Methods*, 2013, 64:137–143.
153. López-Riquelme N, Minguela A, Villar-Permuy F, Ciprian D, Castillejo A, Álvarez- López MR, Soto JL. Imaging cytometry for counting circulating tumor cells: comparative analysis of the CellSearch vs ImageStream systems, *APMIS*, 2013, 121:1139–1143.
154. Hillig T, Horn P, Nygaard AB, Haugaard AS, Nejlund S, Brandslund I, Sölétormos G. In vitro detection of circulating tumor cells compared by the CytoTrack and CellSearch methods, *Tumour Biol.*, 2015, 36:4597–4601.
155. Galanzha EI, Zharov VP. Circulating tumor cell detection and capture by photoacoustic flow cytometry in vivo and ex vivo, *Cancers(Basel)*, 2013, 5:1691-1738.

156. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid biopsy in cancer patients: advances in capturing viable CTCs for functional studies using the EPISPOT assay, *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 2015, 15(11):1411-7.
157. Friedlander TW, Ngo VT, Dong H, Premasekharan G, Weinberg V, Doty S, Zhao Q, Gilbert EG, Ryan CJ, Chen WT, Paris PL. Detection and characterization of invasive circulating tumor cells derived from men with metastatic castration-resistant prostate cancer, *Int. J. Cancer*, 2014, 134:2284–2293.
158. Lu J, Fan T, Zhao Q, Zeng W, Zaslavsky E, Chen JJ, Frohman MA, Golightly MG, Madajewicz S, Chen WT, Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients, *Int. J. Cancer*, 2010, 126:669–683.
159. Simsek E, Guler OO, Carhan A, Ersan B, Arkan TK, Dilek Y, Ercan E, Oz BE, Terzi E, Calisir E, Tiryaki M, Alparslan FP, Korkmaz MH. The determination of circulating tumor cells in peripheral blood by flow cytometry, *Niche*, 2015, doi:10.5152/niche.2015.246.
160. Gunnar Fröman. Separation method and device (Patent). <https://www.google.com/patents/WO2008143578A1?cl=en>. Son erişim tarihi: 1 Haziran 2017.
161. Lin Z, Chiang NY, Chai N, Seshasayee D, Lee WP, Balazs M, Nakamura G, Swem LR. In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells, *Nature Protocols*, 2014, 9:1563–1577.
162. Meb. Tıbbi laboratuvar. [http://www.megep.meb.gov.tr/mte\\_program\\_modul/moduller\\_pdf/Tam%20Kan%20Say%C4%B1m%C4%B1%20-1.pdf](http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Tam%20Kan%20Say%C4%B1m%C4%B1%20-1.pdf). Son erişim tarihi: 1 Mart 2017.
163. Militenyi. Macs hücre ayırımı. <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation.aspx>. Son erişim tarihi: 1 Nisan 2017.
164. Jahan-Tigh RR, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K. Flow cytometry, *Journal of investigative dermatology*, 2012, 132(10):1-6.



165. Doan H, Chinn GM, Jahan-Tigh RR. Flow cytometry II: mass and imaging cytometry, *Journal of Investigative Dermatology*, 2015, 135(9):1-4.
166. Taneli F. Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı, *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 2007, 5(2): 75-82.
167. Woo J, Baumann A, Arguello V. Recent advancements of flow cytometry: new applications in hematology and oncology, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2014, 14(1):67–81.
168. BD Transduction Laboratories.  
<http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/560274.pdf>. Son erişim tarihi: 1 Nisan 2017.
169. Kirchberger S, Majdic O, Bluml S, Schrauf C, Leitner J, Gerner C, Paster W, Gundacker N, Sibia M, Stöckl J. The cytoplasmic tail of CD45 is released from activated phagocytes and can act as an inhibitory messenger for T cells, *Blood*, 2008, 15;112(4):1240-8.
170. BD Transduction Laboratories.  
<http://www.bdbiosciences.com/eu/applications/research/stem-cell-research/cancer-research/human/pe-mouse-anti-human-epcam-eba-1/p/347198>. Son erişim tarihi: 1 Nisan 2017.
171. Tsubura A, Senzaki H, Sasaki M. Immunohistochemical demonstration of breast-derived and/or carcinoma-associated glycoproteins in normal skin appendages and their tumors, *J Cutan Pathol*, 1992, 19:73-9.
172. BD Transduction Laboratories.  
<https://www.bdbiosciences.com/us/applications/research/intracellular-flow/intracellular-antibodies-and-isotype-controls/anti-human-antibodies/alexa-fluor-647-mouse-anti-human-cytokeratin-14-15-16-and-19-ka4/p/563648>. Son erişim tarihi: 1 Nisan 2017.
173. BD Transduction Laboratories. <http://www.bdbiosciences.com/ds/is/tds/23-1336.pdf>. Son erişim tarihi: 1 Nisan 2017.

174. Wang LV. Ultrasound-Mediated Biophotonic Imaging : A Review of Acousto-Optical Tomography and Photo-Acoustic Tomography , *Disease Markers*, 2003 – 2004, 19: 123-138.
175. Ehdaie B. Application of Nanotechnology in Cancer Research : Review of Progress in the National Cancer Institute's Alliance for Nanotechnology , *International Journal of Biological Sciences* , 2007, 3: 108 – 110.
176. Dey S, Zhang Z, Hablas A, Seifeldein I, Ramadan M, El-Hamzawy H and Soliman A. Geographic patterns of cancer in the population-based registry of Egypt: Possible links to environmental exposures, *Cancer Epidemiol.*, 2011, 35:254–264.
177. Veruttipong D, Soliman A, Gilbert S, Blachley T and Hablas A. Age distribution, polyps, and rectal cancer in the Egyptian population-based cancer registry. *World J Gastroenterol.*, 2012. 18:3997–4003.
178. Mead R, Duku M, Bhandari P and Cree I. Circulating tumor markers can define patients with normal colons, benign polyps and cancers. *Br J Cancer*, 2011, 105:239–245.
179. Arslan NÇ, Sökmen S. Alt Gastrointestinal Sistem Malign Tümörlerinde Manyetik Rezonans Görüntüleme, *Türkiye Klinikleri J Gen Surg-Special Topics*, 2015, 8:2:1-10.
180. Nielsen H, Jakobsen K, Christensen I, Brünner N. Screening for colorectal cancer: Possible improvements by risk assessment evaluation?, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2011, 46: 1283–1294.
181. Quintero E, Hassan C, Senore C, Saito Y. Progress and challenges in colorectal cancer screening, *Gastroenterol Res and Prac.*, 2012, 846985- 8.
182. Glenn B, Herrmann A, Catherine M, Mojica C, Chang C, Maxwell A, Bastani R. Changes in Risk Perceptions in Relation to Self-Reported Colorectal Cancer Screening among First-Degree Relatives of Colorectal Cancer Cases Enrolled in a Randomized Trial, *Health Psychol.*, 2012, 30(4): 481–491.

183. Vukobrat-Bijedic Z, Husic-Selimovic A, Sofic A, Bijedic N, Bjelogrić I, Gogov B, Mehmedovic A. Cancer antigens (CEA and CA 19-9) as markers of advanced stage of colorectal carcinoma, *Medical Archives*, 2013, 67(6):397.
184. Youssef EM, Ewieda GH, Ali HA, Tawfik AM, El WMEDA, Ezzat AA, Tash RME, El-Khouly N. Comparison between CEA, CA 19-9 and CA 72-4 in Patients with Colon Cancer, *International Journal of Tumor Therapy*, 2013, 2(1):26-34.
185. Lim SH, Becker TM, Chua W, Caixeiro NJ, Ng WL, Kienzle N, Tognela A, Lumba S, Rasko JE, de Souza P, Spring KJ. Circulating tumour cells and circulating free nucleic acid as prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer, *Cancer Lett.*, 2014, 28;346(1):24-33.
186. Paterlini-Brechot P. Circulating Tumor Cells: Who is the Killer? *Cancer Microenviron.* 2014;7(3):161–76.
187. Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D, Soria JC, Farace F. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer.*, 2011;105(9):1338–41.
188. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J. Thorac Oncol.*, 2012;7(2):306–15.
189. Hofman V, Ilie M, Long E, Guibert N, Selva E, Washetine K, Mograbi B, Mouroux J, Vénissac N, Reverso-Meinietti J, Milano G, Mazières J, Marquette CH, Paterlini-Bréchet P, Hofman P. Detection of circulating tumor cells from lung cancer patients in the era of targeted therapy: promises, drawbacks and pitfalls. *Curr. Mol. Med.*, 2014;14(4):440–56.
190. Khoja L, Shenjere P, Hodgson C, odgetts J, Clack G, Hughes A, Lorigan P, Dive C. Prevalence and heterogeneity of circulating tumour cells in metastatic cutaneous melanoma. *Melanoma Res.*, 2014;24:40-6.

191. Noman MZ, Messai Y, Carré T, Akalay I, Méron M, Janji B, Hasmin M, Chouaib S. Microenvironmental hypoxia orchestrating the cell stroma cross talk, tumor progression and antitumor response. *Crit. Rev. Immunol.*, 2011;31:357-77.
192. Konstantopoulos K, Thomas SN. Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2009, 11:177–202.
193. Zhe X, Cher ML, Bonfil RD. Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack, *Am. J. Cancer Res.*, 2011, 1 (6):740–751.
194. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.*, 2008, 1;26(19):3213-21.
195. Sastre J, Maestro ML, Puente J, Veganzones S, Alfonso R, Rafael S, García-Saenz JA, Vidaurreta M, Martín M, Arroyo M, Sanz-Casla MT, Díaz-Rubio E. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables, *Ann. Oncol.*, 2008, 19 (5):935–938.
196. Maestro LM, Sastre J, Rafael SB, Veganzones SB, Vidaurreta M, Martín M, Olivier C, DE La Orden VB, Garcia-Saenz JA, Alfonso R, Arroyo M, Diaz-Rubio E. Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages, *Anticancer Res.*, 2009, 29(11):4839–43.
197. Tol J, Koopman M, Miller MC, Tibbe A, Cats A, Creemers GJ, Vos AH, Nagtegaal ID, Terstappen LW, Punt CJ. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents, *Ann. Oncol.*, 2010, 21(5):1006–12.
198. Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, Kuniyoshi R, Takagi K, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer, *Cancer Sci.*, 2011, 102 (6):1188–1192.

199. Barbazan J, Alonso AL, Mauinelo RL, Vieito M, Abalo A, Nocelo AM, Candamio S, Gallardo E, Fernández B, Abdulkader I, Casares M, Gómez TA, López LR, Abal M. Molecular characterization of circulating tumor cells in human metastatic colorectal cancer, *PLoS One*, 2012, 7:40476.
200. Pilati P, Mocellin S, Bertazza L, Galdi F, Briarava M, Mammano E, Tessari E, Zavagno G, Nitti D. Prognostic value of putative circulating cancer stem cells in patients undergoing hepatic resection for colorectal liver metastasis, *Ann. Surg. Oncol.*, 2012, 19 (2):402–408.
201. Tseng JY, Yang CY, Yang SH, Lin JK, Lin CH, Jiang JK. Circulating CD133(+)/ESA(+) cells in colorectal cancer patients, *J. Surg. Res.*, 2015, 199(2):362-70.
202. Ning Y, Hanna DL, Zhang W, Mendez A, Yang D, El-Khoueiry R, Matsusaka S, Sunakawa Y, Stremitzer S, Parekh A, Okazaki S, Berger MD, Barzi A, Lenz HJ. Cytokeratin-20 and survivin-expressing circulating tumor cells predict survival in metastatic colorectal cancer patients by a combined immunomagnetic qRT-PCR approach, *Mol. Cancer Ther.*, 2015, 14(10):2401-8.
203. Uhr JW, Pantel K, Controversies in clinical cancer dormancy, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2011, 108 (30):12396–12400.
204. Bidard FC, Pierga JY, Soria JC, Thiery JP. Translating metastasis-related biomarkers to the clinic—progress and pitfalls, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2013, 10 (3): 169–179.
205. Levesque JP, Winkler IG, Rasko JE. Nichotherapy for stem cells: there goes the neighborhood, *BioEssays*, 2013, 35 (3):183–190.
206. Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, Mollberg N, Motschall E, Jensen K, Diener MK, Büchler MW, Koch M, Weitz J. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer, *Gastroenterology*, 2010, 138(5): 1714–26.
207. Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, Saikawa Y, Suda K, Ando T, Kumagai K, Irino T, Yoshikawa T, Matsuda S, Kitajima M, Kitagawa Y. Clinical significance

of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers, *Ann. Surg. Oncol.*, 2008, 15(11):3092–3100.

208. Kuboki Y, Matsusaka S, Minowa S, Shibata H, Suenaga M, Shinozaki E, Mizunuma N, Ueno M, Yamaguchi T, Hatake K. Circulating tumor cell (CTC) count and epithelial growth factor receptor expression on CTCs as biomarkers for cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer, *Anticancer Res.*, 2013, 33(9):3905–3910.
209. Groot Koerkamp B, Rahbari NN, Buchler MW, Koch M, Weitz J. Circulating tumor cells and prognosis of patients with resectable colorectal liver metastases or widespread metastatic colorectal cancer: a meta-analysis, *Ann. Surg. Oncol.*, 2013, 20:2156e2165.
210. Gorges TM, Stein A, Quidde J, Hauch S, Röck K, Riethdorf S, Joosse SA, Pantel K. Improved detection of circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer by the combination of the CellSearch® system and the AdnaTest, *PLoS One*, 2016, 6;11(5):e0155126.
211. Zong C, Lu S, Chapman AR, Xie XS. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell, *Science*, 2012, 21;338(6114):1622-6.

## EK-1. Etik Kurul Raporu

FORM-1

### YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

#### ETİK KURULU

#### BAŞVURU FORMU

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi öğrenci ve çalışanları tarafından yürütülen ve insan katılımcılardan klinik dışı bilgi toplamayı gerektiren araştırmalar için bu başvuru formunun yanı sıra diğer gerekli belgelerle "Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Etik Kurul"una başvurulur. "Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Etik Kurul"u başvuruyu "Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı Etik Kurul Yönergesi" genel kapsamında değerlendirir.

#### BAŞVURU KAYIT FORMU (Etik Kurul tarafından doldurulacak)

Araştırma kodu (Yıl – Araştırma sıra no)	2014-30
Başvuru formunun Etik Kurula ulaştığı tarih	18.12.2014 -
Etik Kurul Karar toplantı tarihi ve karar no	02.02.2015-10

#### ARAŞTIRMANIN BAŞLIĞI

Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Kolorektal Kanserli (CRC) Hastalarda Akım Sitometrisi İle Tespiti

#### ARAŞTIRMACI/ARAŞTIRMACILAR\*

	Unvan	Adı Soyadı	Görev yeri	Telefon	e-posta
1	Prof. Dr	Mehmet Hakan KORKMAZ	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi	03123241555	mhkorkmaz@hotmail.com
2	Doç. Dr.	Özen ÖZENSOY GÜLER	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	03123241555	oozensoy@hotmail.com

1

## EK-1. Etik Kurul Raporu Devamı

FORM-1

3	Yrd. Doç. Dr.	Ender ŞİMŞEK	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	03123241555	dr.endersimsek@yahoo.com
4	Yrd. Doç. Dr.	Muhammed Bülent AKINCI	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi	03122912525	mbakinci@ybu.edu.tr
5	Yrd. Doç. Dr.	Mehmet Ali Nahit ŞENDUR	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi	03122912525	mansendur@ybu.edu.tr
6	Uzman Dr.	Ferda PINARLI	Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etlik Semt Polikliniği Genetik Tanı Merkezi Laboratuvarı	03125962000	ferdapinarli@yahoo.com
7	Uzman Dr.	Ömer BAYIR	Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği	03125962000	bayiromer@hotmail.com

2



## EK-1. Etik Kurul Raporu Devamı

FORM-1

8	Tezli Yüksek Lisans Öğrencisi	Yeter DİLEK	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	05425591830	ytr_44@hotmail.com
9	Tezli Yüksek Lisans Öğrencisi	Tuğba Kevser ARKAN	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	05356316890	tugbakevser_arkan@hotmail.com
10	Tezli Yüksek Lisans Öğrencisi	Bilgesu ERSAN	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	05557306828	bilgesu_ersan@hotmail.com

### ARAŞTIRMA DÖNEMİ

Başlangıç 01/01/2015 Bitiş 30/06/2015

### ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ

- Öğretim üyesi araştırması  
 Doktora tezi  
 Yüksek lisans tezi  
 Diğer (Belirtiniz)

### ARAŞTIRMA DESTEĞİ

X	Yok		
<input type="checkbox"/>	Var		Belirtiniz
	<input type="checkbox"/>	Üniversite	
	<input type="checkbox"/>	TÜBİTAK	
	<input type="checkbox"/>	DİĞER	
	<input type="checkbox"/>	Uluslararası	

3

## EK-1. Etik Kurul Raporu Devamı

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyelerinden Sayın Ozen OZENSOY GULER'in " Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Kolorektal Kanseri (CRC) Hastalarda Akım Sitometrisi İle Tespiti" adlı araştırması değerlendirilmiştir.

Proje etik açısından uygun bulunmuştur.

Proje etik açısından geliştirilmesi gerekmektedir.

Proje etik açısından uygun bulunmamıştır.

### İmzalar:

Prof. Dr. S. Yavuz SANISOĞLU

Koordinatör

Prof. Dr. Arif ERSOY

Koordinatör Yardımcısı

Prof. Dr. Mehmet BARCA

Üye

Prof. Dr. Mehmet AKKUŞ

Üye

Prof. Dr. M. Fatih UŞAN

Üye

Prof. Dr. Fatih Vehbi ÇELEBİ

Üye

Prof. Dr. Erdal Tanas KARAGÖL

Üye

Prof. Dr. Mustafa Sıtkı BİLGİN

Üye

Prof. Dr. Ahmet KANKAL

Üye

Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Üye

Yard. Doç. Dr. Arif DEMİR

Üye

Gülcan SERTÇELİK

Raportör

## EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

### BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Kolorektal Kanseri (CRC) Hastalarda Akim Sitometrisi İle Tespiti'dir.

Bu araştırmanın amacı, sağlıklı bireylerin ve kolon kanserli hastaların kanlarında dolaşan tümör hücrelerinin olup olmadığını tespit etmektir. Bu çalışmada sizden sadece **1 (bir) kez** bir tüp (7.5 ml) kan alınacaktır. Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 60'dır.

Bu araştırma ile ilgili olarak doktorunuzun önerilerine uymak sizin sorumluluklarınızdır. Bu çalışmada kan alımı sırasında veya kan alındıktan sonra görülebilecek riskler ve rahatsızlıklar söz konusu olabilir. Bunlar, bu bölgede kanın dokulara sızması sonucu şişme (hematom oluşumu) sonrasında ağrı, bazı durumlarda enfeksiyon, uyuşma, seyirme, bulantı, kusma, bayılma gibi durumlardır; ancak bu sonuçlarla çok nadir olarak karşılaşılır. Sizin için beklenen yararlar ise öncelikli olarak kolon kanserinin erken tanısı ve metastaz ile karşılaşabilme durumu hakkında bilgi edinilirdir.

Bu araştırmanın olası yararları, sizden alınan kanlarda dolaşan tümör hücrelerinin varlığı araştırılacak ve kolon kanserli hasta kanlarında bu hücreler sayılacaktır. Dolaşan tümör hücresi tespit edilen hastalarda başka bölgeye sıçrama (metastaz) olup olmayacağı hakkında yorum yapılabilecek olmasıdır. Riskleri ise kolon kanserli hastalarda, bu tümör hücrelerinin tespit edilememesi (yanlış negatif sonuç) ya da sağlıklı bireylerde tümör hücresi tespiti (yanlış pozitif sonuç) olabilir. Ancak bu iki durumda ihtimali çok küçük olabilecek sonuçlardır.

Araştırmaya bağlı bir zarar söz konusu olduğunda, bu durumun tedavisi sorumlu araştırmacı tarafından yapılacak, ortaya çıkan masraflar bireyin kendi sağlık güvencesi olan sosyal güvenlik kurumu tarafından karşılanacaktır. Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 03123241555 no.lu telefondan Doç. Dr. ÖZEN ÖZENSOY GÜLER'e başvurabilirsiniz.

Bu çalışmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır. Ayrıca, bu çalışma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu Araştırma Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmektedir.

Bu çalışmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada çalışmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Araştırmacı bilginiz dâhilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan gerekleri yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız nedeni ile sizi çalışmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

**Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir**, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz (tedavinin gizli olması durumunda, gönüllüye kendine ait tıbbi bilgilere ancak verilerin analizinden sonra ulaşabileceği bildirilmelidir).

## **EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu Devamı**

### **Çalışmaya Katılma Onayı:**

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

### **Gönüllünün,**

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

### **Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin,**

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

### **Açıklamaları yapan araştırmacının,**

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

### **Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,**

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

## EK-3. Tez Çalışmasında Kullanılan Tez Makalesi

0

Niche, 2014; 3: 0-0 · DOI: 10.5152/niche.2015.246

# Determination of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood By Flow Cytometry

Ender Simsek<sup>1</sup>, Ozen Ozensoy Guler<sup>1</sup>, Ahmet Carhan<sup>1</sup>, Bilgesu Ersan<sup>1</sup>, Tugba Kevser Arkan<sup>1</sup>, Yeter Dilek<sup>1</sup>, Elif Ercan<sup>1</sup>, Beyza Ecem Oz<sup>1</sup>, Emine Terzi<sup>1</sup>, Emrullah Calisir<sup>2</sup>, Meral Tiryaki<sup>2</sup>, Ferda Alparslan Pinarli<sup>2</sup>, Mehmet Hakan Korkmaz<sup>3</sup>

Niche

Original Article

Abstract

**Objective:** Circulating tumor cells (CTCs) have been interest of subject in the past few decades in terms of prognosis and response to the therapy in several cancers and have potential as a "liquid biopsy" in the diagnosis and treatment of cancer. The aim of our study was to improve a convenient method for the strategies of CTC enrichment and detection.

**Methods:** In this modified method, 7,5 mL peripheral blood samples were firstly collected and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the fresh blood samples by ficoll gradient separation. Next, the leukocytes in PBMCs were removed by magnetic microbeads conjugated with CD45 for a negative selection. Finally, the retained cells were labeled with anti-epithelial cell adhesion molecule (anti-EpCAM), anti-cytokeratins (anti-CKs) and the leukocyte-specific marker as anti-CD45. All samples were analyzed by a flow cytometry.

**Results:** CTCs were detected in blood samples of cancer patients such as breast cancer, lung cancer, colorectal cancer, bladder cancer, and laryngeal cancer using with our modified convenient method for the strategies of CTC enrichment and detection. For instance, our results showed that CTCs were not detected in the volunteer sample while 9 CTCs were detected with the use of EpCAM-based gating strategy but the number of detected CTCs was 7 when gated on CK 14,15,16,19 in the breast cancer sample.

**Conclusion:** CTCs can be detected with our modified method including highly sensitive assays that provide us monitoring the process of cancer treatment and knowing some important information about cancer prognosis.

**Keywords:** Cancer, circulating tumor cells (CTCs), flow cytometry

**EK-4.** Uluslararası Bilimsel Toplantıda Sunulan ve Bildiri Kitabında Özeti Basılan Poster Bildirisi

**P-05.03.3-010**

**The detection of circulating tumor cells (CTCs) in patients with colorectal cancer by flow cytometry**

Y. Dilek<sup>1</sup>, E. Simsck<sup>1</sup>, A. Carhan<sup>1</sup>, E. Terzi<sup>1</sup>, E. Calisir<sup>2</sup>, M. Tiryaki<sup>2</sup>, F. Pinarli<sup>2</sup>, N. Ozdemir<sup>3,4</sup>, D. Dede<sup>3,5</sup>, B. Yalcin<sup>3,5</sup>, O. O. Guler<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Ankara, Yıldırım Beyazıt University, Turkey, <sup>2</sup>Department of Medical Genetics, Diskapı Yıldırım Beyazıt Training and Research Hospital, Ankara, Turkey, <sup>3</sup>Department of Medical Oncology, Yıldırım Beyazıt University, Faculty of Medicine, Ankara, Turkey, <sup>4</sup>Department of Medical Oncology, Ankara Numune Training and Research Hospital, Ankara, Turkey, <sup>5</sup>Department of Medical Oncology, Ankara Atatürk Training and Research Hospital, Ankara, Turkey

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of mortality worldwide. Metastasis is associated with the presence of circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of cancer patients. CTC cut-off values have been shown to predict for poorer overall survival in metastatic breast ( $\geq 5$ ), prostate ( $\geq 5$ ), and colorectal ( $\geq 3$ ) cancer based on assessment of 7.5 ml of blood. In our study, CTCs were detected in blood samples of colorectal cancer patients, using with our modified convenient method for the strategies of CTC enrichment and detection. 7.5 mL peripheral blood samples were firstly collected and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the fresh blood samples by ficoll gradient separation. Next, the leukocytes in PBMCs were removed by magnetic microbeads conjugated with CD45 for a negative selection. Finally, the retained cells were labeled with anti-epithelial cell adhesion molecule (anti-EpCAM), cytokeratins (CK8, CK19) and the leukocyte-specific marker as anti-CD45. All samples were analyzed by BD FACS Aria III flow cytometry. In total, 10 patients and 7 healthy people were included in this study. The results showed that CTCs were not detected in the blood samples of healthy volunteers, but 3-13 CTCs were detected with CK14, 15, 16, 19-based gating strategy in the blood samples of colorectal cancer patients. It is accepted that the cut off value is 3 CTCs for colorectal cancer and CTC is negative if it is below this value or CTC is considered as a positive, if it is equal to or above this value, which might be an indication for poor prognosis. Thus CTC's detection may serve a representative surrogate tumor biomarker for real-time monitoring of disease status and tailoring personalized therapy.

**Keywords:** Circulating Tumor Cells, Colorectal Cancer, Flow Cytometry.

**EK-5. Özgeçmiş**

<b>KİŞİSEL BİLGİLER</b>	
Adı Soyadı	: Yeter DİLEK
Doğum tarihi	: 01.01.1992
Doğum yeri	: Darende
Medeni hali	: Bekar
Uyruğu	: T.C.
Adres	: T.C. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı /ANKARA
E-mail	: yeterdilek@gmail.com
<b>EĞİTİM</b>	
Lise	: Darende Lisesi
Lisans	: Atatürk Üniversitesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
<b>YABANCI DİL BİLGİSİ</b>	
İngilizce	: 65
<b>ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR</b>	
Türk Biyokimya Derneği Biochemical Society Viral Hepatitle Savaşım Derneği Hepyaşam Derneği	