



T.C

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLON KANSERİ HASTALARINDA SURVİVİN GEN
POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

NESİBE YAMAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. KÜRŞAT OĞUZ YAYKAŞLI

DÜZCE 2012



T.C

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLON KANSERİ HASTALARINDA SURVİVİN GEN
POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

NESİBE YAMAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. KÜRŞAT OĞUZ YAYKAŞLI

DÜZCE 2012

KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
"Kolon Kanseri Hastalarında SURVIVIN Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi"
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 15/05/2012

TEZ SINAV JÜRİSİ



Yrd. Doç. Dr. Kürşat Oğuz YAYKAŞLI
Düzce Üniversitesi
Başkan



Yrd. Doç. Dr. Recep EROZ
Düzce Üniversitesi
Üye



Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KAYA
Düzce Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 24 / 05 / 2012 tarih ve 26 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Yrd. Doç. Dr. Talat BAHÇEBAŞI
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

BEYAN

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

15.05.2012

NESİBE YAMAK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, çalışmalarım için gerekli olanakların sağlanmasındaki katkılarından dolayı değerli hocam tez danışmanım Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Kürşat Oğuz YAYKAŞLI'ya,

Bilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Recep ERÖZ'e,

Tezim için gerekli hastaların seçiminde ve klinik değerlendirmelerindeki desteklerinden dolayı değerli hocam Prof. Dr. Ali Kemal UZUNLAR, Arş. Gör. Cem ŞAHİNER'e, ve Düzce Üniversitesi Patoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Tezimin istatistiksel değerlendirmelerini yapan Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı sevgili hocam Prof. Dr. Handan ANKARALI'ya,

Ayrıca bu araştırmanın iyi bir şekilde yapılabilmesi için Düzce Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi Komisyon Başkanlığınca BAP-2011.04.HD-20 nolu proje olarak desteklenmiştir. BAP ile ilgili konularda gösterdikleri ilgi ve hassasiyetlerinden dolayı Mehmet Aygan, Zekiye Özdaş ve Beytullah Çıtır'a,

Tez çalışmam süresince benden maddi manevi desteğini esirgemeyen sevgili anne ve babama teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
BEYAN.....	İ
TEŞEKKÜR.....	İİ
İÇİNDEKİLER	İİİ
SİMGE VE KISALTMALAR	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VII
ŞEKİLLER VE RESİMLER LİSTESİ.....	IX
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. HÜCRE SIKLUSU.....	5
2.1.1. Hücre siklusunun evreleri.....	5
2.2. APOPTOZİS.....	6
2.2.1. Apoptozisin mitokondriyal (intrinsek) yolağı	7
2.2.2. Apoptozisin ölüm reseptörü (ekstresek) yolağı.....	8
2.3. APOPTOZİS İNHİBİTÖR PROTEİNLER AİLESİ (IAP).....	8
2.3.1. Survivin yapısı.....	9
2.3.2. Survivin fonksiyonu.....	10
2.4. KOLONUN KANSERİ.....	12
2.4.1. Kolonun anatomisi.....	12
2.4.2. Kolon kanserinin moleküler mekanizması.....	13
2.4.3. Epidemiyoloji.....	15
2.4.4. Etiyoloji.....	16
2.4.5. Kolon kanserinin sınıflandırılması.....	17
2.4.5.1. Kalıtsal sendromlar.....	17
2.4.5.2. Sporadik sendromlar.....	17
2.4.6. Kolorektal kanserde histopatoloji.....	18

2.4.6.1. Adenomlar (Neoplazik polipler).....	18
2.4.6.2. Displazi.....	19
2.4.6.3. Kanser.....	19
2.4.7. Kolorektal kanserde evreleme.....	20
2.4.8. Kolon kanserinde diferansiyasyon derecesi.....	20
2.4.9. Kolon kanseri risk faktörleri.....	21
2.4.9.1. Yaş.....	21
2.4.9.2. İdiyopatik inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile ilişkisi.....	21
2.4.9.3. Ailede kolon kanseri öyküsü.....	21
2.4.9.4. Obezite.....	21
2.4.9.5. Diyet.....	21
2.4.9.6. Sigara.....	22
2.4.9.7. Irk ve Etnik köken.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	2
3.1.ÇALIŞMA GRUBUNUN TANIMLANMASI.....	23
3.2. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	23
3.3.KULLANILAN GEREÇLER.....	23
3.4. AGARUZ JEL ELEKTROFORAZİNDE KULLANILAN GEREÇLER..	24
3.4.1. Etidyum bromür (10 mg/ml).....	24
3.4.2. 1X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE).....	24
3.4.3. Yükleme tamponu (Loading dye).....	24
3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	24
3.5.1. Parafine gömülü kolon kanser dokusundan DNA izolasyonu.....	24
3.5.2. Periferik kandan DNA izolasyonu.....	25
3.5.3. Elde edilen DNA'nın konsantrasyon ve kalitesinin tayini.....	25
3.5.4. Survivin gen polimorfizmlerinin tespit edilmesi.....	25
3.5.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'da Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PZR'ın Hazırlanışı.....	26

3.5.6. PZR koşulları.....	27
3.5.7. %2'lik agaroz jel hazırlanması.....	29
3.5.8. PZR ürünlerinin %2'lik jele yüklenmesi.....	29
3.5.8.1. PZR ürünlerinin kontrolü.....	29
3.5.9. Survivin gen polimorfizmlerinde enzim kesimi.....	30
3.5.9.1. Survivin -31 G/C gen polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler.....	30
3.5.9.2. Survivin -241 C/T gen polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler.....	30
3.5.9.3. Survivin -625 C/G polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler.....	31
3.5.9.4. Survivin -1547A/G polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler	31
3.5.10. Survivin gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesi ve kontrolü.....	32
3.5.10.1. Survivin -31 G/C gen polimorfizminin değerlendirilmesi.....	32
3.5.10.2. Survivin -241 C/T gen polimorfizminin değerlendirilmesi.....	33
3.5.10.3. Survivin -625 C/G polimorfizminin değerlendirilmesi.....	34
3.5.10.4. Survivin -1547 A/G polimorfizminin değerlendirilmesi.....	34
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1.ÇALIŞMA ve KONTROL GRUBU BİREYLERİNİN GENEL BİLGİLERİ.....	35
4.2. SURVİVİN GEN POLİMORFİZMLERİNİN PZR ve ENZİM KESİMİ SONUÇLARI.....	39
5. TARTIŞMA.....	47
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGE ve KISALTMALAR

PZR: Polimeraz Zincir reaksiyonu

PCR-RFLP: Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi

IAP: Apoptozis inhibitörleri ailesi (İnhibitör of apoptozis)

CDK: Siklin bağımlı kinaz

Bcl-2: B hücreli lösemi/lenfoma

TNF: Tümör nekroz faktörü

BIR: Baculoviral IAP tekrarları

CARD: IAP kaspaz takviye domaini

UBA: Ubikuitin ilişkili domain

TRAIL: TNF-ilişkili apoptozis-indükleyici ligand

CPC: Kromozomal yolcu kompleks

APC/ β - katenin yolu: Adenom-karsinom süreci

APC: Adenomatöz polipozis koli

FAP: Ailesel adenomatöz polip

HNPCC: Herediter nonpolipozis kolon karsinomu

MSI: Mikrosatelit instabilitesi

COX-2: Siklooksijenaz 2

Bç: Baz çifti

OR: Risk katsayısı

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1. Survivin gen polimorfizmlerinin tespiti için kullanılan primerler.....	26
Tablo 3.2. Survivin -31 G/C polimorfizmi için PZR koşulları.....	27
Tablo 3.3. Survivin -241 C/T ve -625 C/G polimorfizmleri için PZR koşulları.....	28
Tablo 3.4. Survivin -31 G/C polimorfizmi için PZR koşulları.....	28
Tablo 3.5. Survivin -31 G/C polimorfizminde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler.....	30
Tablo 3.6. Survivin -241 C/T gen polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler.....	31
Tablo 3.7. Survivin -625 C/G gen polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler.....	31
Tablo 3.8. Survivin -1547 A/G gen polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler.....	32
Tablo 4.1. Survivin -31 G/C polimorfizmi açısından değerlendirilen bireylerin yaş özellikleri.....	36
Tablo 4.2. Survivin -31 G/C polimorfizmi açısından değerlendirilen bireylerin histopatolojik ve demografik özellikleri.....	36
Tablo 4.3. Survivin -241 C/T polimorfizmi açısından değerlendirilen bireylerin yaş özellikleri.....	37
Tablo 4.4. Survivin -241 C/T polimorfizmi açısından değerlendirilen bireylerin histopatolojik ve demografik özellikleri.....	37
Tablo 4.5. Survivin -625 C/G polimorfizmi açısından değerlendirilen bireylerin yaş özellikleri.....	38
Tablo 4.6. Survivin -625 C/G polimorfizmi açısından değerlendirilen bireylerin histopatolojik ve demografik özellikleri.....	38
Tablo 4.7. Survivin -1547 A/G polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin yaş özellikleri.....	39

Tablo 4.8. Survivin -1547 A/G polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin histopatolojik ve demografik özellikleri.....	39
Tablo 4.7. Survivin -31 G/C polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin genotip dağılımları.....	40
Tablo 4.8. Survivin -241 C/T polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin genotip dağılımları.....	43
Tablo 4.9. Survivin -625 C/G polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin genotip dağılımları.....	44
Tablo 4.10. Yeni oluşturulan modelin doğruluk derecesini gösteren tablo.....	46
Tablo 4.11. Survivin -1547 A/G polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin genotip dağılımları.....	46

ŞEKİLLER ve RESİMLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Hücre Döngüsünün Evreleri.....	6
Şekil 2.2. İnsanlarda tanımlanan IAP proteinleri.....	9
Şekil 2.3. Bilinen 5 survivin gen splice varyantlarının yapısını gösteren temsili diyagram.....	10
Şekil 2.4. Apoptozis inhibitörü olarak Survivin'in rolü.....	11
Şekil 2.5. Mitozda Survivin'in rolü.....	12
Şekil 2.6. Kalın bağırsağın kısımları.....	13
Şekil 2.7. Kolon kanserinin moleküler mekanizması.....	15
Şekil 3.1. Survivin -31 G/C gen polimorfizminin şematik jel görüntüsü.....	33
Şekil 3.2. Survivin -241 C/T gen polimorfizminin şematik jel görüntüsü.....	33
Şekil 3.3. Survivin -625 C/G gen polimorfizminin şematik jel görüntüsü.....	34
Şekil 3.4. Survivin -1547 A/G gen polimorfizminin şematik jel görüntüsü.....	35
Resim 4.1. Survivin -31 G/C polimorfizminin PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	40
Resim 4.2. Survivin -31 G/C polimorfizminin kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	40
Resim 4.3. Survivin -241 C/T polimorfizminin PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	42
Resim 4.4. Survivin -241 C/T polimorfizminin kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	42
Resim 4.5. Survivin -625 C/G polimorfizminin PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	43
Resim 4.6. Survivin -625 C/G polimorfizminin kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	44

Resim 4.7. Survivin -1547 A/G polimorfizminin PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	45
Resim 4.8. Survivin -1547 A/G polimorfizminin kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	45

ÖZET

KOLON KANSERİ HASTALARINDA SURVİVİN GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ

Nesibe YAMAK

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Genetik Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Kürşat Oğuz YAYKAŞLI

Haziran 2012, 57 sayfa

Kolon kanseri dünya çapında görülen en yaygın kanserlerden biridir. Kanserlerin patogenezi hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve sağ kalımı gibi genel gereksinimlerin düzenlenmesinde anahtar görev üstlenen genlerin mutasyonlarından etkilenmekte ve hastalık bir seri somatik mutasyonun birbirini izlemesiyle gelişmektedir. Apoptozis ise, hem hücresel homeostazisin devamlılığı hem de hücre çoğalması ve farklılaşmasında çok önemli olan hücre eliminasyonu için gerekli fizyolojik bir işlemdir. Apoptozis, genetik işlgelerle düzenlenmekte ve malign hücrelerde bu işlgelerin denetimi bozulabilmektedir. Bu da kontrolsüz hücre büyümesine ve tümör gelişimine neden olmaktadır. Bu çalışmada apoptozisle ilişkili olan Survivin geninin promotör bölgesindeki -31 G/C, -241 C/T, -625 C/G ve -1547 A/G polimorfizmlerin kolon kanseri ile ilişkisi PCR-RFLP yöntemi kullanılarak incelendi. Yapılan çalışma sonucunda survivin -31C alleli ve CC genotipine sahip bireylerin kolon kanserine yakalanma riskinin yüksek olduğu bulundu. -241 CT genotipinin kolon kanseri riskini önemli derecede arttırdığı bulundu (OR=12.0, p=0.0001). -625 C/G polimorfizmi ile kolon kanseri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Survivin -1547AG genotipi AA' ya göre 3.383 kat daha fazla hastalık riski taşıdığı bulundu (p=0.026). Ayrıca GG genotipine sahip olanlarda da hastalık riski anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p<0.05).

Anahtar sözcükler: Kanser, Kolon, Polimorfizm, RFLP, Survivin

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SURVIVIN GENE POLYMORPHISMS IN COLON CANCER PATIENTS

Nesibe YAMAK

Master Thesis, Department of Medical Biology Genetic

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Kürşat Oğuz YAYKAŞLI

June 2012, 57 pages

Colon cancer is one of the most common cancer worldwide. Pathogenesis of cancer is affected by mutations of genes which is undertaking the key task such as proliferation of cells, differentiation and survival and disease is developing by tracking a series of mutations in each other. Apoptosis, is a necessary physiological process for cell elimination which is very important both cellular homeostasis and cell proliferation and differentiation. Apoptosis is regulated by genetic mechanisms and control of this mechanisms can be disrupted in malign cells. This also leads to uncontrolled cell growth and tumor development. The relation between colon cancer and -31 G/C, -241 C/T, -625 C/G ve -1547 A/G polymorphism in promotor site of survivin gene associated with apoptosis was investigated by using PCR-RFLP method in this study. As a result of the study, individuals with -31C allele and CC genotype had a higher risk of developing colon cancer. -241 CT genotype was found to increase considerably in the risk of colon cancer (OR=12.0, p=0.0001). There was no statistically significant difference between -625 C/G polymorphism and colon cancer. It was found that Survivin -1547 AG genotype had 3.383 fold higher risk according to AA genotype (p=0.026). In addition, even in those with GG genotype were significantly higher risk of disease (p<0.005).

Keywords: Cancer, Colon, Polymorphism, RFLP, Survivin

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, somatik hücrelerde birden fazla mutasyonun birikmesiyle meydana gelmektedir. Bu nedenle insanlarda tümör oluşumu aşamalı ve zamana dayalı bir süreçtir.

Gelişmiş ülkelerde en sık rastlanan kanserlerden biri görülme sıklığı her geçen gün artan kolon kanseridir ¹. Kolorektal kanser vakalarının sadece küçük bir kısmı (% 5-10) ailesel olmakla birlikte çoğunun sporadik olarak oluştuğu görülmektedir ². Kolon kanserlerinde klinik bulgular; tümörün lokalizasyonu, makroskopik yapısı ve oluşturduğu komplikasyonlara göre farklılıklar göstermektedir. Yaklaşık olarak %50'si rektosigmoid bölgede, %30'u sağ kolonda, %20'si ise kolonun diğer kısımlarında gelişir ^{3,4}.

Kolon kanserlerinin sebebi ve oluşum mekanizması çevresel ve genetik faktörlerle ilişkilidir. Özellikle diyetle bağlıdır. Kolon kanseri ile et tüketimi ve hayvansal yağ alımı arasında yakın ilişki vardır.

Programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptozis, son derece organize bir hücre ölümü sürecidir. Evrimsel olarak korunmuş bir süreçtir ve organ gelişimi, doku şekillenmesi, immün yanıt ve tümör baskılanması için gereklidir. Böylece apoptozis homeostazi için gerekli önemli bir süreçtir ⁵. Normal olmayan apoptozisin kanser başlamasına, gelişmesine ve tedavide başarısızlığa katkı sağladığına inanılmaktadır.

Apoptozis iki geniş yoldan oluşmaktadır: intrinsek yolak (mitokondriyal yol olarak da bilinir) ve ekstrinsek yolak (ölüm reseptörü yolu olarak da bilinir) ⁶. İntrensek yolak üzerinden apoptozis, oksidatif stres, mitokondriyal bozukluklar ve DNA hasarına neden olan herhangi bir uyarandan tetiklenebilir. Apoptozisin ekstrinsek yolağı ise ölüm reseptörlerinin liganda bağlanmasıyla indüklenir ⁷.

Survivin, apoptozis inhibitör ailesinin (IAP) en küçük üyesidir. Bu protein iki temel hücresel süreci düzenler, yani apoptozisi engeller ve hücre çoğalmasını teşvik eder. Fetal gelişim sırasında yüksek düzeyde ifade edilmesine rağmen, survivin normalde sağlıklı yetişkin dokularında nadiren ifade edilmektedir. Ancak kanserlerin çoğunluğunda upregüle olmaktadır ^{8,9}.

Bu çalışmada, apoptozisle ilişkisi olan survivin geninin promotör bölgesindeki dört ayrı polimorfizm incelenecektir. Kolon kanseri hastalarına ait risk durumları survivin genotiplerinin klinik diğer parametrelerle ilişkileri değerlendirilmeye çalışılacaktır. Çalışmamızın kolon kanseri etyopatogenezinde survivinin önemini araştırarak çalışmalara ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

2.GENEL BİLGİLER

Ülkemizde Devlet İstatistik Enstitüsü'nün verilerine göre, kanser tüm ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Gastrointestinal kanserler, dünyada akciğer ve meme kanseri ile birlikte en sık görülen malign tümörlerdir. Kanserden kaynaklanan ölümlerin yaklaşık %25'i gastrointestinal malignitelerden olmaktadır [10](#).

2.1. Hücre Siklusu

Kök hücreden tam diferansiye hücreye gelişimi esnasında hücreler, bölünme (mitoz) ve dinlenme (interfaz) dönemleri halinde görünürler. Hücrelerin sırasıyla gösterdiği bu aktivitelere hücre siklusu denir [11](#). Hücre siklusu çeşitli düzenleyici proteinler tarafından yönlendirilir. Bu proteinlerin başında siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin proteinleri yer almaktadırlar ve döngünün G₁, S, G₂, M evrelerine geçişini düzenlemektedirler [12](#).

2.1.1.Hücre siklusunun evreleri

İnterfaz evresi mitozun gerçekleşmesi için gereklidir. Bu evrede, RNA sentezi, protein üretimi ve hacimsel büyüme meydana gelir. Bu evre dört basamakta gerçekleşir;

G0: Bu dönemde hücre bölünmesi olmaz. Sinir hücreleri gibi bölünmeyen hücreler bu evrede kalırlar.

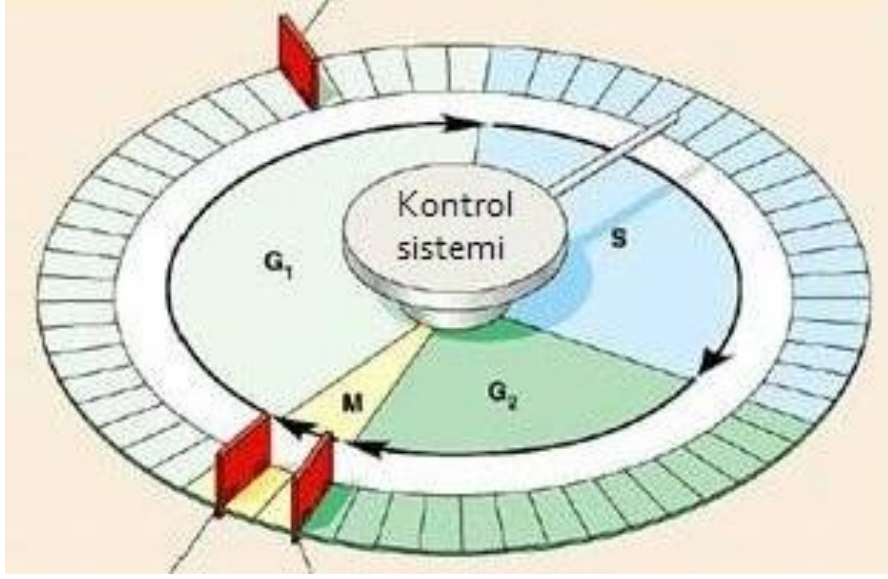
G1: G1 evresi DNA replikasyonu için gerekli tüm hazırlıkların yapıldığı evredir. Bu evrede hücre boyutu artar, RNA üretimi ve protein sentezi meydana gelir.

S: Bu evre sentez evresidir. DNA replikasyonu meydana gelir ve DNA miktarı iki katına çıkar.

G2: Bu evrede DNA sentezi durur, hücre büyümeye devam eder ve yeni proteinler sentezlenir.

M: Mitoz evrsinde ise hücre kendine tamamen benzeyen iki yavru hücreye ayrılır. Mitoz, interfazdan çok kısa olup 1-2 saat içerisinde tamamlanır.

Hücre döngüsü boyunca G1, G2 ve mitotik fazda kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu kontrol noktalarında hücrenin döngüye devam edip etmeyeceğine karar verilir [11](#).



Şekil 2.1. Hücre Döngüsünün Evreleri⁶⁶

2.2. Apoptozis

Apoptozis, nükleoproteinlerin yıkıma uğratıldığı ve ardından hücrenin parçalara ayrıldığı aktif bir enzimatik süreçtir ¹³. Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptozis evrimsel olarak korunmuş, organ gelişimi, doku şekillenmesi, immün yanıt ve tümör baskılanması için gerekli bir süreçtir. Yapılan çalışmalarda özelleşmiş mikromekanizmaların, sinyal yollarının, gen aileleri kaskadlarının içerildiği genetik bir program olduğu anlaşılmıştır. Embriyonik ve fetal büyüme sırasında gereksiz ve kullanımı olmayan bölümlerin ortadan kaldırılması ve özelleşmiş doku bölümlerinin plastisitesinin sağlanmasında rolü vardır. Erişkin organizmada hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki dengeyi regüle ederek farklılaşmış dokulardaki homeostazı sağlar ⁷.

Apoptozisdeki asıl olay, kaspaz adı verilen enzimlerin aktifleşmesidir. Bunlar, proteinleri aspartik artıkların ardından kesen sistein proteazlardır. Aktif kaspazlar çok sayıda hedefi parçalar; bunu izleyerek, DNA'yı parçalayan nükleazlar ve muhtemelen nükleoproteinler ile hücre iskeletini parçalayan enzimler aktive olurlar. Kaspazların aktifleşmesi, pro- ve anti-apoptotik moleküler yollar arasındaki çok duyarlı bir dengeye bağlıdır.

Apoptozis iki geniş yoldan oluşmaktadır: intrinsek yolak (mitokondriyal yol olarak da bilinir) ve ekstrinsek yolak (ölüm reseptörü yolu olarak da bilinir) ¹³.

2.2.1. Apoptozisin mitokondriyal (intrensek) yolağı:

Mitokondrilerde apoptozisi başlatabilen birkaç protein bulunur. Bunlar arasında sitokrom c ve endojen sitozolik apoptozis inhibitörlerinin antagonistleri bulunur. Hücrenin yaşamını sürdürmesi ile ölmesi arasındaki seçim; prototipi Bcl-2 olan ve 20'den çok protein içeren bir protein ailesi tarafından kontrol edilen mitokondrilerin geçirgenlik derecesi tarafından belirlenir. Hücreler büyüme faktörlerinden, trofik hormonlardan yoksun kaldıklarında; DNA'yı zedeleyen ajanlarla karşılaştıklarında veya kabul edilemez düzeyde hatalı katlanmış protein içerdiklerinde, bir grup sensör aktifleşir. Sensörlerin Bcl-2 ailesinden olan bazıları, ailenin pro-apoptotik üyesi olan Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Bunlar; dimerize olur, mitokondriyal membranın yaprakları arasına girer ve sitokrom c ile diğer mitokondriyal proteinlerin sitozole geçebileceği kanallar meydana getirirler. İlişkili başka sensörler, anti-apoptotik moleküller olan Bcl-2 ve Bcl-x_L 'i inhibe ederek aynı sonuca, mitokondrilerden sitozole protein geçişine katkıda bulunurlar. Sitokrom c başka kofaktörlerle birlikte kaspaz 9'u aktifleştirirken, başka proteinler de apoptozis inhibitörü olarak görev kaspaz antagonistlerinin etkinliğini engellerler. Net sonuç, kaspazların zincirleme aktifleşmesiyle çekirdeğin parçalanmasıdır. Hücreler büyüme faktörleri veya diğer yaşam uyarıları karşılaşırlarsa, Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerini aktifleştirirler; bunların başlıca ikisi Bcl-2'nin kendisi ve Bcl-x_L 'dir. Bu proteinler, Bax ve Bak'ı antagonize ederek mitokondriyal pro-apoptotik proteinlerin sitozole geçişini sınırlarlar. Büyüme faktörlerinden yoksun kalan hücreler yalnızca pro-apoptotik proteinleri aktifleştirmekle kalmayıp aynı zamanda Bcl-2 ve Bcl-x_L düzeyini de düşürür ve dengeyi hücre ölümüne doğru kaydırırlar. Mitokondriyal yolak, apoptozis durumlarının çoğundan sorumlu gibi görülmektedir ¹³.

Apoptozisin mitokondriyal yolağında anahtar rol oynayan bir grup proapoptotik proteinlerin ve antiproapoptotik proteinlerin 20'den fazlasını içeren Bcl-2 (b-hücreli lösemi/lenfoma) ailesidir. Bcl-2 ailesinin Bax, Bak, Bim ve Bid gibi proapoptotik üyeleri mitokondriden sitokrom c salınımını indüklerken Bcl-XL gibi anti proapoptotik üyeleri bağlanıp Apaf-1'i inaktive edebilir. Buna ek olarak, Bax ve Bak mitokondriden Smac/DIABLO proteini salınımını stimüle ederek apoptozisi teşvik edebilir, böylece apoptozis proteinlerinin inhibitörlerini (XIAP, cIAP2 ve cIAP1 ve survivin gibi IAP'leri inaktive eder ⁷.

2.2.2. Apoptozisin ölüm reseptörü (ekstresek) yolağı:

Çoğu hücrede ölüm reseptörü olarak adlandırılan ve apoptozisi tetikleyen yüzey molekülleri bulunur. Bunların çoğu tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör ailesinin üyesidir ve sitoplazmik bölümlerinde başka proteinlerle etkileşmeyi sağlayan ‘ölüm bölgesi’ bulunur. Ölüm reseptörlerinin prototipleri tip 1 TNF reseptörü ve Fas’dır (CD95). Fas ligandı (FasL), başlıca aktif T lenfositlerde görülen bir membran proteinidir. Bu T lenfositler, Fas dışı vurumu gösteren hedeflerle karşılaştıklarında; Fas molekülleri FasL ile çapraz bağlanır ve birlikte, en son kaspaz 8’i de bağlayacak olan adaptör proteinleri bağlarlar. Çok sayıda kaspaz molekülünün yan yana gelmesi bunların aktifleşmelerine ve zincirleme kaspaz reaksiyonuna yol açar. Pek çok hücre tipinde kaspaz 8, Bcl-2 ailesinin Bid adlı pro-apoptotik bir üyesini aktifleştirerek mitokondriyal yolağı da besleyebilir. İki yolağın birlikte aktifleşmesi hücre için ölümcüldür. Ölüm reseptörü yolağı, kendi dokularına tepki veren lenfositlerin ortadan kaldırılmasında ve bazı sitotoksik T lenfositlerin hedef hücreleri ortadan kaldırmasında rol oynar ¹³.

2.3. Apoptozis İnhibitör Proteinler Ailesi (IAP)

IAP’ler, değişken sayıda Baculoviral IAP tekrar motiflerinin (BIR), histidin ve sistein rezidüleri ile bir çinko iyonu koordine eden 70 amino asitlik bir dizinin varlığı ile karakterizedir. BIR domainlerinin sayısı 1-3 arasında değişkenlik göstermektedir ¹⁴. Bir çok memeli IAP’leri örneğin c-IAP1, c-IAP2, ve XIAP; E3 ubiquitin ligaz gibi işlev gören C-terminal RING içeren ek yapısal domainler içerir ¹⁵. IAP proteini tarafından apoptozisin hangi mekanizmayla inhibe edildiğini anlayabilmek için dikkat ilk olarak BIR domainlerinde odaklanmıştır. Yapılan çalışmalar sonunda BIR domaininin birçok proteini bağlayabilen çok yönlü protein-protein etkileşim domaini olduğunu ve kaspazları doğrudan inhibe edebildiğini göstermiştir. Tüm IAP proteinleri en az bir tane BIR domainin içermektedir. BIR domaini yaklaşık 80 amino asit uzunluğundadır ve korunmuş histidin sistein rezidüleri ile koordine bir çinko iyon ile tanımlanır. BIR domaini üç kısa β -zincirinden ve dört α -heliksinden, koordineli bir çinko iyonu içeren içe doğru kıvrılan kompakt bir yapıdan oluşur.

Apoptotik yolakları modüle eden tüm IAP’ler C-terminallerinde bir RING domainine sahiptir. Bu dimerizasyon ve ubiquitin E3 ligaz aktivitesi için gereklidir. RING domaini

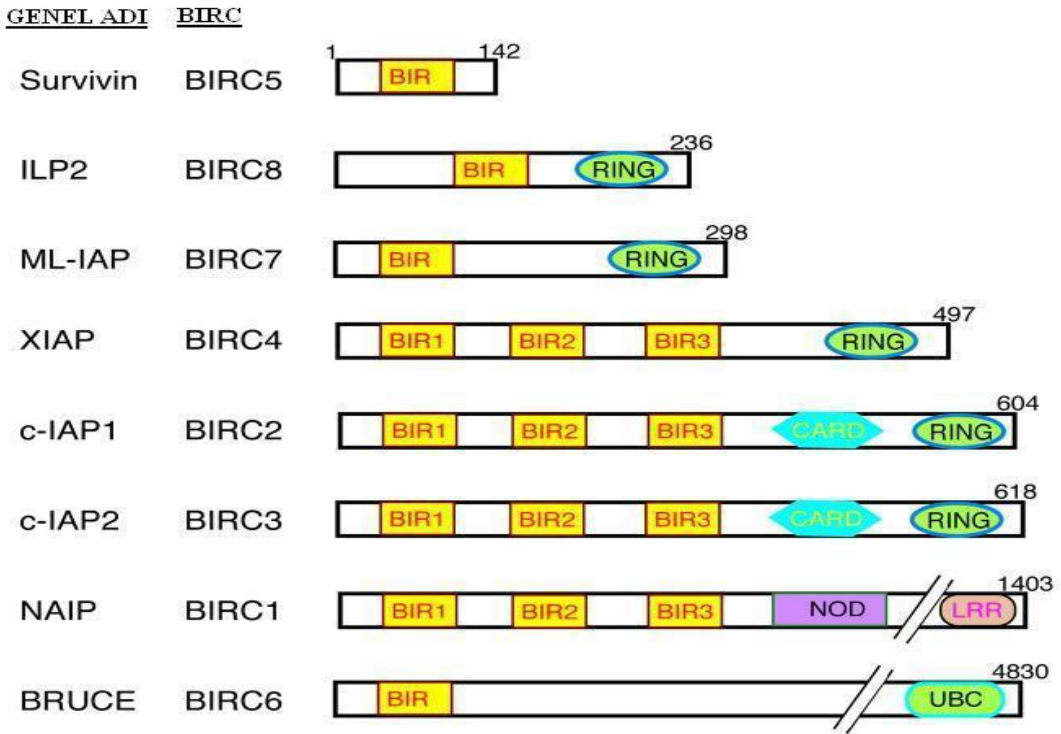
küçük bir domaindir (40 amino asit), iki çinko iyonu ile koordineli sekiz sistein ve histidin ile tanınır. Tüm RING domainlerinin çekirdek yapısı oldukça korunmuştur.

Bazı IAP'lerde son BIR domainini takiben ubikuitin bağlayan ubikuitin ilişkili domain (UBA) olarak tanımlanan kısa bir bölge bulunur. Birkaç IAP kaspaz takviye domaini (CARD) gibi ek domainlere sahiptir (cIAP1 ve cIAP2). CARD'ın bu IAP'lerdeki yapısı ve fonksiyonu tespit edilmemiştir ¹⁶.

İnsanlarda 8 tane IAP tanımlanmıştır ve survivin de bunlardan bir tanesidir ¹⁵.

İNSAN

NOMENKLATÜR

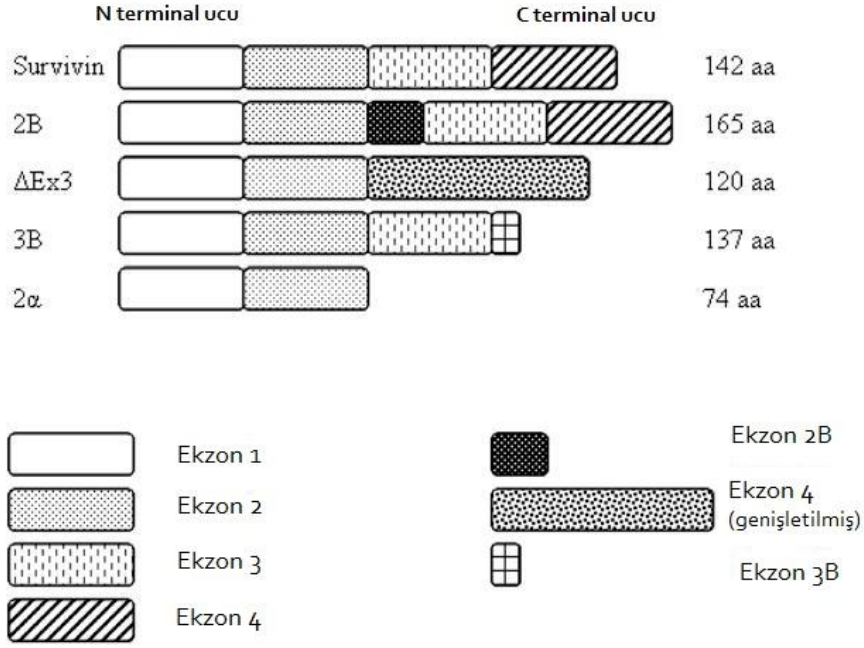


Şekil 2.2. İnsanlarda tanımlanan IAP proteinleri ¹⁴

2.3.1. Survivin yapısı

Survivin, IAP ailesinin en küçük üyesidir. 16.5 kDa'luk bir proteindir. 142 amino asit rezidüsü içerir. Diğer bazı IAP'lerin aksine, survivin 15. amino asit rezidüsünden 87'ye kadar uzanan tek bir N-terminal BIR ucu ve uzun bir c-terminal alfa heliks burgusu olan dimerik yapıya sahiptir ¹⁷. BIR domaini dimer oluşumu ve efektör kaspazlar gibi diğer protein-protein etkileşimi için önemlidir ¹⁸.

Survivin kodlayan gen 17q25 de lokalizedir. Survivin pre-mRNA'sının alternatif splicingi ile 5 farklı proteini kodlayan 5 farklı mRNA üretilir. Bunlar; survivin, survivin 2B, survivin DEx3, survivin 3B13 ve survivin 2 α 'dır. Tam boy survivin 1-4 ekzondan üretilir. Survivin 2B de 1-4 ekzondan üretilir fakat şifreli ekzon olarak intron 2 den ek olarak 69 bp korunmaktadır. Survivin DEx3 ekzon 1,2 ve 4'ten türetilmiştir. Survivin 3B ekzon 1,2,3 ve 4'ten türetilmiştir ve intron 3'ten 165 bp yeni dizi içerir. Survivin 2 α , intron 2'nin 3' 197 bp bölgesinin yanı sıra survivin geninin ekzon 1 ve 2'sini içerir ¹⁸.



Şekil 2.3. Bilinen 5 survivin gen splice varyantlarının yapısını gösteren temsili diyagram ¹⁸

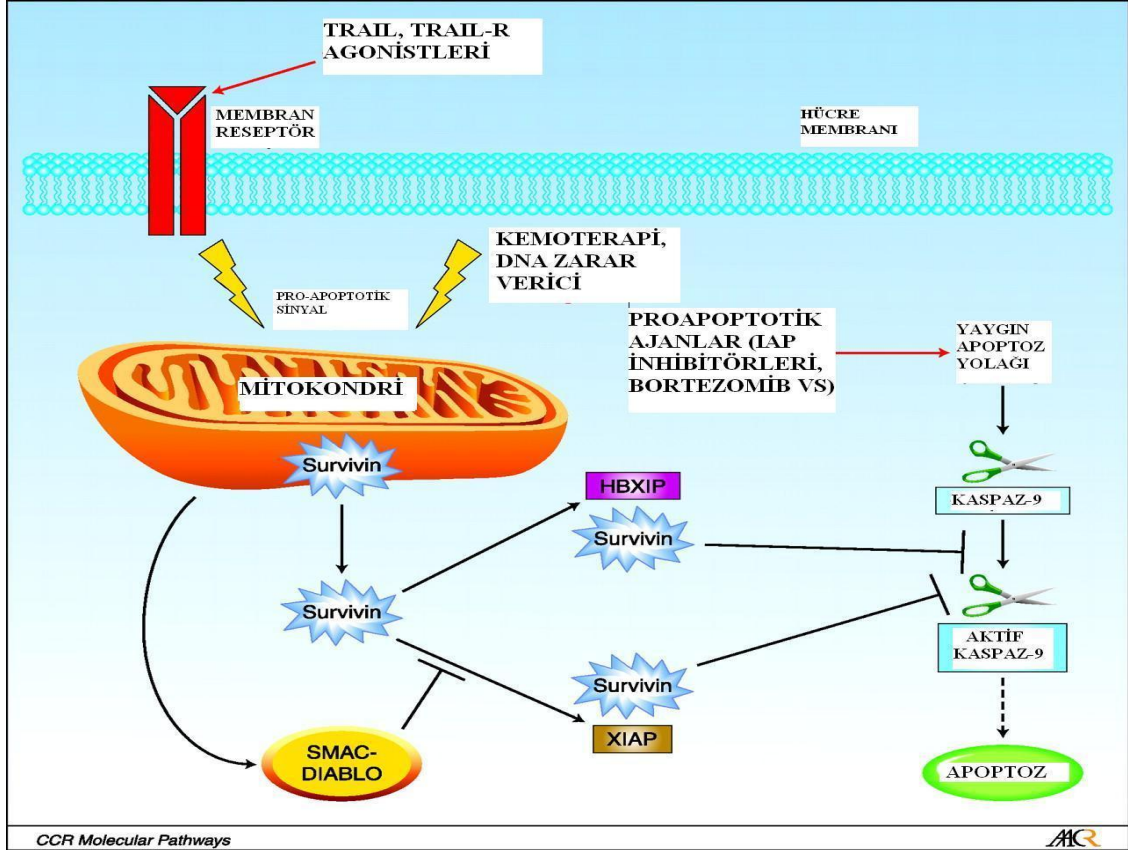
2.3.2. Survivin fonksiyonu

İn vivo ve in vitro çalışmalar, survivinin hücre ölümünü özellikle apoptozisi inhibe ettiğini göstermiştir. İn vitro, survivinin IL-3 çekilmesi, FAS stimülasyonu, TRAIL, BAX, p53, kaspaz-3,-7 ve -8 in over ekspresyonunu içeren apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik arabulucularının etkisini yok ettiği bulunmuştur.

Apoptotik uyarılara karşı survivin yeteneği mutant hücrelerin yayılması da dahil olmak üzere hücre çoğalmasını kolaylaştıran sağ kalım geliştirir. Bu çoğalma sonuçta maligniteye yol açabilir.

İnsanlarda birçok IAP'lerin kaspazları BIR uçları ile doğrudan inhibe ettikleri gösterilmiştir. Survivin apoptozisi hangi mekanizma ile inhibe ettiği henüz tam olarak bilinmemektedir.

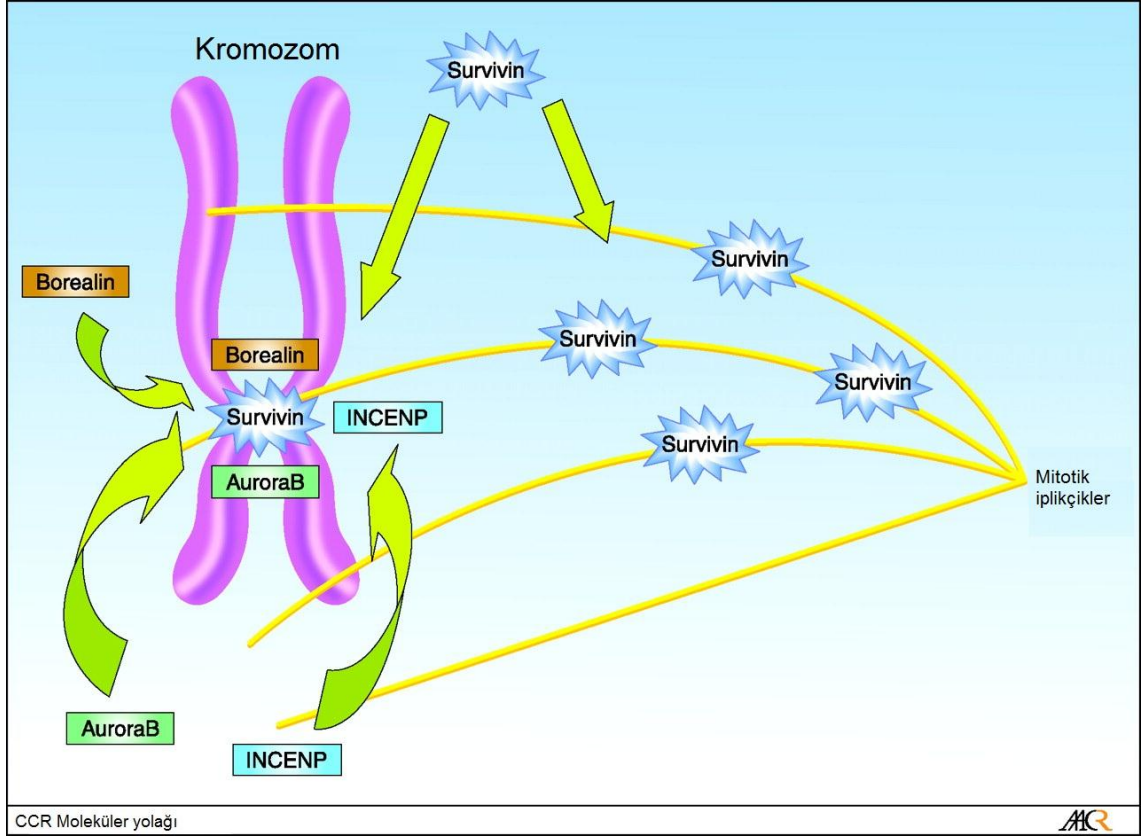
Bazı araştırmacılar tarafından survivinin kaspaz3'ü doğrudan baskıladığı söylenmektedir; ancak survivin diğer IAP'lerdeki kaspaz-3'e doğrudan bağlanmayı sağlayan yapısal bileşenleri yoktur ¹⁹. Survivin kaspazları muhtemelen intermediyer proteinler aracılığı ile dolaylı olarak inhibe etmektedir ²⁰. Survivin IAP'lere bağlanan proapoptotik bir protein olan Smac/DIABLO'ya bağlanır ve bu şekilde bunların kaspazları inhibe etmesini önler ²¹⁻²².



Şekil 2.4. Apoptozis inhibitörü olarak Survivin'in rolü ⁶⁷

IAP ailesi üyesi olarak sınıflandırılmış olsa da önemli kanıt hücre çoğalmasında survivinin önemli bir rolü olduğunu destekler. Gerçekten de, bazı araştırmacılar apoptozis inhibisyonundan daha ziyade hücre bölünmesinin kontrolünde survivinin primer fonksiyonu olduğunu destekler. Mitoz sırasında, survivin kromozomal yolcu kompleks (CPC) olarak bilinin bir multi-protein kompleks olarak bulunur. Bu kompleksin katılımı ile, survivin geç mitozda kardeş kromatit segregasyonunun kolaylaştırılması ve mikrotübüllerin stabilizasyonu ile çoğalmayı teşvik edebilir. Alternatif bir olasılık, survivinin sentromer/merkez mili ve CPC arasında bir interfaz olarak rol oynamasıyla mitozu teşvik etmesidir. Hücre çoğalmasındaki rolü ile çakışan, survivin ifadesi bağımlı hücre döngüsü ve promotördeki hücre dönüşünün G2/M fazı

boyunca maksimum ifadesine yol açan hücre döngüsü homoloji bölgesi ile ağırlıklı olarak düzenlenir ¹⁸.

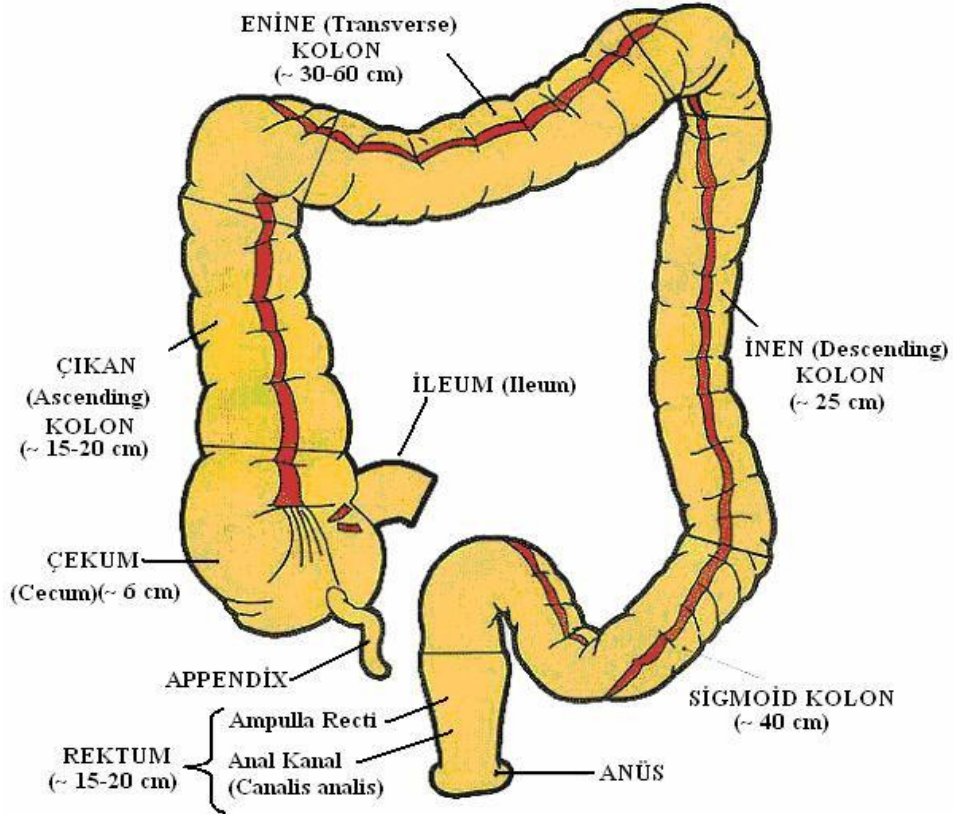


Şekil 2.5. Mitozda Survivin'in rolü ⁶⁷

2.4. Kolon Kanseri

2.4.1. Kolonun anatomisi

Kalın bağırsak, ileumun bitiminden anüse kadar uzanır ve ortalama 150 cm uzunluğundadır. Sindirim kanalının 1/5'ini oluşturur ²³. Sırasıyla, çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon sigmoid kolon ve rektum kısımlarından oluşur. Kolonun ilk parçası olan çekum, boyu ve genişliği 6-8 cm olan keseleşmiş bir organdır. Çıkan kolon yaklaşık olarak 15 cm uzunluğundadır. Transvers kolon kalın bağırsağın en uzun parçası olup yaklaşık 45 cm uzunluğundadır. İnen kolon ise yaklaşık 25 cm uzunluğundadır. Sigmoid kolonun uzunluğu değişken olmakla birlikte (15-50 cm) şekli de farklılık gösterir. Sindirim sisteminin son parçası olan rektum 12-15 cm genişliğine sahip olup anüsle son bulur ²⁴.



Şekil2.6. Kalın bağırsağın kısımları⁶⁶

2.4.2. Kolon kanserinin moleküler mekanizması

Kolon kanserinin onkogenler ve tümör supressör genler ya da DNA mismatch tamir gen değişimlerinde mutasyonlar sonucu olarak meydana geldiği düşünülmektedir²⁵. Kolon kanserinde birden fazla mutasyonun aşamalı olarak birikiminin görüldüğü 2 farklı yol vardır. Bunlardan birincisi adenom-karsinom süreci olarak bilinen APC/ β -katenin yoludur. Bu mekanizma sporadik kanserlerin yaklaşık %80'inde görülmektedir. İkincisi ise DNA tamir genlerinin inaktivasyonu ile ilişkilidir. Sporadik kanserlerin %10-15'inde gözlenmiştir²⁶.

Adenom-karsinom süreci, kolon kanseri oluşumu için temel mekanizma olarak düşünülmektedir. Nokta mutasyonları, kromozomal translokasyonlar ve gen amplifikasyonları ile aktive olan protoonkogenler hücre büyümesinde artışa neden olmaktadır. Kolorektal kanserle ilişkili olan protoonkogenler K-ras, c-myc ve c-src'dir.

Tümör baskılayıcı genler (örn: APC, p53) hücre büyümesini sınırlarlar. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonu kaybolduğunda ise hücre büyümesi artış gösterir²⁷.

APC/ β -katenin yolu, bir seri onkogene ve tümör baskılayıcı gende mutasyonların aşamalı olarak gerçekleşmesine ve birikmesine neden olan kromozomal dengesizlik ile

karakterizedir. Bu yolla meydana gelen kolon kanserinin moleküler gelişimi morfolojik olarak da tanımlanabilen aşamalar ile gerçekleşir. Önce kolonda lokalize epitel proliferasyonu meydana gelir. Bu aşamadan sonra, küçük adenomlar oluşur ve bunlar progresif olarak genişlerler. Bir yandan da daha displastik hale gelerek sonunda invaziv kansere dönüşürler.

APC gen kaybının adenom/karsinom sürecinde en erken olay olduğu düşünülmektedir. Adenomların meydana gelebilmesi için APC geninin her iki kopyasında da kaybedilmelidir. Daha sonra K-RAS geninde mutasyon olur. K-RAS mutasyonu, 1 cm'den küçük adenomların ve karsinomların %50'sinde mevcuttur. 18q21 delesyonu kolon kanseri gelişiminde sonraki aşamadır ve kolon kanserlerinin %60-70'inde saptanmıştır. Son olarak da p53 tümör baskılayıcı geninin kaybı meydana gelir ¹³.

Kolorektal karsinomların %60-80'inde APC (Adenomatous polyposis Coli) gen kaybı vardır. APC, Wnt sinyal yolu, intrasellüler hücre adezyonu, iskelet stabilizasyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptoziste önemli rol oynar. Ailesel adenomatöz poliplerde (FAP) APC'de germline bir mutasyon söz konusudur. APC döngüsü mutasyonlarının, c-myc ve siklin D1 gibi onkogenlerin düzensiz transkripsiyonun izin verdiği düşünülmektedir ²⁸.

Genetik lezyonların varlığı ile karakterize ikinci yol DNA mismatch tamir genleri ile ilişkilidir. Sporadik vakaların %10-15'inde saptanmıştır. APC/ β -katenin yolunda olduğu gibi bu yolda da mutasyonların birikimi söz konusudur. Fakat mutasyonların gerçekleştiği genler farklıdır. Bu yolla gelişen kolorektal kanserlerde en olası ve önemli başlangıç noktası, DNA mismatch tamir genlerinin inaktivasyonu sonucu DNA tamirinde meydana gelen aksaklıklardır. Beş DNA tamir geninde (MSH2, MSH6, MLH1, PMS1 ve PMS2) birindeki kalıtsal mutasyonlar herediter nonpolipozis kolon karsinomu (HNPCC) ile sonuçlanır. DNA mismatch tamir genlerinin kaybı sonucu, mikrosatellit adı verilen tekrarlayan kısa DNA dizileri DNA replikasyonu sırasında dengesiz hale gelirler ve bu durum tekrarlayan dizilerde yaygın alterasyonlar ile sonuçlanır. Sonuçta ortaya çıkan mikrosatellit dengesizliği (MSI) hatalı DNA mismatch tamirinin moleküler işaretidir ¹³.



Şekil 2.7. Kolon kanserinin moleküler mekanizması

2.4.3. Epidemiyoloji

Kolon kanseri, insanlarda sindirim sisteminde en yaygın görülen kanserlerden biridir. Hastalığın Avrupa ve Amerika’da yaygın olarak görülmesine karşın Asya ve Afrika’da daha düşük olarak ortaya çıktığı görülmüştür. Daha çok ileri yaş grubunu etkileyen bu hastalık 50 yaşından sonra artmakta ve 60-70 yaşlarında en yüksek düzeye ulaşmaktadır ²⁹. Birleşik Devletler’de tahmini olarak her yıl 134.000 yeni tanısı konan ve yaklaşık 55.000 ölüme sebep olan bu hastalık kanser ile ilişkili ölümlerin yaklaşık %15’inden sorumludur. Erkeklerde kadınlara oranla %20 daha sık görülmektedir.

Kolorektal karsinom gelişiminde hem genetik hem de çevresel faktörlerin rolü vardır. Genç bir bireyde kolorektal kanser görüldüğünde zeminde ülseratif kolit ya da polipozis sendromlarından birinin varlığından şüphelenilmektedir. Buna ek olarak herediter nonpolipozis kolorektal karsinom sendromu (HNPCC) olan kişilerde DNA mismatch tamir genlerinde germ-line mutasyon vardır ve bu kişilerde kolorektal kanser gelişimi riski yüksektir.

Kolorektal karsinomlar, Birleşik Devletler ve Kanada, Avustralya, Yeni Zelanda, Danimarka, İsveç ve diğer gelişmiş ülkelerde en yüksek görülme oranları ile tüm dünyada yaygın olarak rastlanan tümörlerdir. Hindistan, Güney Amerika ve Afrika'da ise 30 kez daha düşük bir insidansa sahiptir. Japonya'da daha önce düşük olan rastlanma oranı, günümüzde İngiltere'deki gibi orta seviyelere yükselmiştir. Bu çarpıcı coğrafi insidans farklarından çevresel faktörler, özellikle de diyet alışkanlıkları sorumlu tutulmaktadır.

Son yıllarda yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda, aspirin ve diğer NSAİDların kolon kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu yönünde sonuçlar alınmıştır. Hemşirelerin Sağlık Çalışması'nda, 10 yıl ya da daha uzun süreyle günde 4-6 adet aspirin tableti alan kadınlarda kolon kanseri insidansının düşük olduğu gösterilmiştir. Bu etkinin siklooksigenaz-2 (COX-2) inhibisyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir ¹³.

2.4.4. Etiyoloji

Kolorektal kanserler çevresel ve genetik sebeplerle meydana gelebilir. Hastalığın kesin sebebi kolonik mukozanın epitel hücrelerinde meydana gelen genetik değişikliklerdir. Kolon kanserlerinin en büyük bölümü adenokarsinomlar tarafından oluşturulur. Adenomlar, displastik kalın bağırsak epiteli ve destekleyici stroma içeren benign tümörlerdir ³.

Yapılan araştırmalara göre kolon kanseri erkeklerde kadınlara oranla daha fazla görülmektedir. Hastalık orta yaşın üzerinde ortaya çıkmakta ve 60-70 yaş grubunda en fazla düzeye ulaşmaktadır ³⁰.

Kolorektal kanserlerin etiyojisinde genetik faktörler, çevresel faktörler ve prekanseröz hastalıklar rol oynamaktadır.

Kolorektal kanserlerin ortaya çıkışında genetik faktörler önemli rol oynarlar. Hastaların büyük çoğunluğunda kolon kanseri bir seri somatik mutasyon sonucu ortaya çıkar. Tümörlerin malign formu zaten var olan benign tümörlerden gelişir.

Kalıtsal olmayan sporadik gelişen kolorektal kanser spontan vakalarda adenomatöz poliplerin ortaya çıkıp tümör dokusunun gelişmesinden, iki vuruş modeli (two-hit hipotezi) söz konusudur. Adenomlarda APC (adenomatöz polipozis koli) geninin her iki kopyasında kayıp olması APC mutasyonu epitelyal hücreleri özellikle hücre siklusunu kontrolden çıkarır. Sporadik tümörlerin ve bu dokuyu çevreleyen normal dokuda bu kaybın izlenmemesi bu görüşü desteklemektedir. Adenomların %80'inde APC gen

mutasyonu tesbit edilmiştir. Bunu takiben ortaya çıkan başka mutasyonlar tümör oluşum aşamalarının gerçekleşmesine yol açarlar ³¹.

Kolon kanserinin meydana gelmesinde beslenme alışkanlıkları da etkili olmaktadır. Karbonhidrat ve yağ bakımından zengin, bitkisel liflerden fakir, vitamin ve minerallerden yoksun, antioksidan içermeyen beslenme alışkanlıkları kolon kanseri riskini artırmaktadır. Sığır eti ve hayvansal yağ tüketimi de kolon kanseri gelişiminde etkili olmaktadır. Buna karşın posalı gıdalarla beslenen kişilerde ise kolon kanseri görülme sıklığı daha düşüktür ³².

2.4.5. Kolon kanserinin sınıflandırılması

2.4.5.1. Kalıtsal sendromlar

- **Ailesel polipozis sendromları (FAP)**

Ailesel polipozis sendromları (FAP), otozomal dominant geçişli ender rastlanan hastalıklardır. Malign transformasyon potansiyeline sahip olmaları nedeniyle büyük önem taşıyan bu poliplerdeki bu tür transformasyonları varlığı, kolorektal kanserlerin moleküler temellerini ortaya koymada anahtar görev görmüştür. FAP’da hastalar tipik olarak, tüm mukoza yüzeyini halı gibi kaplayan 500-2500 adet kolonik adenoma sahiptirler. Bu tanının konması için en az 100 adet polip gereklidir.

FAP’ın temelinde yatan genetik problem, kromozom 5q21’de bulunan APC geninde lokalizedir. APC geninin germline mutasyonu sonucu meydana gelmektedir ¹³.

- **Kalıtsal polipsiz kolorektal kanser (HNPCC)**

Kalıtsal polipsiz kolorektal kanser Lynch sendromu olarak da isimlendirilmektedir. Lynch sendromu otozomal dominant olarak kalıtılır ve çoğunlukla proksimal kolonda gelişir ³³.

DNA mismatch tamir genlerinde meydana gelen mutasyonlar HNPCC’ye sebep olmaktadır. MSH2, MLH1 ve MSH6 genlerinde meydana gelen mutasyonlar HNPCC’ye neden olur ³⁴.

2.4.5.2. Sporadik sendromlar

Kolon kanserlerinin %70’den fazlası adenoma poliplerden gelişmektedir ³³. Adenomatöz poliplerin %80’i APC gen mutasyonu içermektedir. APC, sitoplazmadaki β - katenini transfosforile eder. APC geninde meydana gelen mutasyon β -kateninin çekirdek içine transloke olması neden olur. Böylece c-myc ve siklinD1 genleri aktive olur ³⁴.

2.4.6. Kolorektal kanserde histopatoloji

2.4.6.1. Adenomlar (Neoplazik polipler)

Adenomlar, genelde saplı küçük tümörlerden, çoğunlukla sesil büyük lezyonlara kadar değişen çeşitli yapı ve büyüklüklerde neoplastik poliplerdir. Adenomlar, kolorektal mukozanın benign tümörleridir. Kolondaki adenomların yaygınlığı 40 yaştan önce %30-40 iken 60 yaştan sonra %40-50'ye yükselmektedir. Sporadik adenomların ailesel olma eğilimi iyi tanımlanmıştır. Birinci derece akrabalarda adenom oluşma riski normalin 4 katıdır. Adenomlu bir hastada, kolorektal karsinom gelişme riski ise normalden 4 kat artmıştır¹³.

Adenomlar bir veya birden fazla görülebilirler. Adenomlar erkeklerde kadınlardan daha sık görülürler. Sol kolon adenomları genç hastalarda sık görülürken, sağ kolonda lokalize olanlar 65 yaş üstünde daha sık görülürler³⁵.

Adenomatöz polipler epitelyal karakterleri temel alınarak dört subtipte ayrılmıştır. Bunlar; tubuler adenomlar, villöz adenomlar, tubulovillöz adenomlar ve sesil serrated adenomlardır. Tubuler adenomlar, bunlar arasında en sık görülenidir. Adenomların %5-10'u tubuvillöz ve sadece %1'i villöz yapıdadır. Çoğu tubuler adenomlar küçük ve saplıdır, villöz adenomlar ise daha büyük ve sesil yapıda olmaya meyillidirler¹³.

Adenomatöz bir polipteki malignite riski üç bağımsız özellik ile bağlantılıdır: polipin boyutu, histolojik yapısı ve içerdiği epitel displazisinin derecesi:

- Çapı 1 cm'den daha küçük olan tubuler adenomlardan kanser gelişmesi oldukça enderdir.
- Çapı 4 cm'den büyük sesil adenomlarda karsinom gelişimi olasılığı yüksektir (yaklaşık %40).
- Ağır displazi mevcut olduğunda genellikle villöz bölgelerde yerleşim gösterir.
- Bu değişken faktörler arasında, maksimum çap, bir adenomun karsinom içerme riskini belirleyen ana faktördür. Yapısal özellikler tek başına birer belirleyici değildir¹³.

2.4.6.2.Displazi

Prekanseröz bir lezyondur. Mukozada anormal hücresel ve yapısal değişikliklere neden olan inaktif ve noninvaziv tümörel transformasyondur. Kolorektal mukozada, displazik adenomlarda, adenomatöz hiperplazi ve iltihabi barsak hastalığında görülebilir. Tüm adenomlarda en az hafif derecede displazik değişim bulunur.

2.4.6.3.Kanser

Kolorektal kanserlerin %90'dan fazlasını adenokarsinomlar meydana getirir. Kolorektal kanserler Dünya Sağlık Örgütü'ne göre altı grupta sınıflandırılır.

- **Adenokarsinom**

Kolorektal adenokarsinomlar, gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada yaygın olarak görülen tümörlerdir. Kanser ile ilişkili ölümlerin yaklaşık %10'undan sorumludurlar ³⁶. Ülkemizde de kolon adenokarsinomu akciğer, meme ve mideden sora en sık görülen tümörlerdir ³. Kalın bağırsak tümörlerinin yaklaşık %95'ini adenokarsinomlar oluşturur.

- **Müsinöz adenokarsinom**

Bu tümörlerde müsinöz alanlar tümörün yaklaşık %50'sini oluşturur. Müsinöz tümörler kolon knaserlerinin %15'ini, rektal kanserlerin ise %33'ünü meydana getirir. Bu tümörler hücre içi ve hücre dışı müsin karışık halde bulunur.

Klasik adenokarsinomlar gibi adenomlardan kaynaklanırlar. Çoğunlukla genç ve HNPCC hastaları etkilerler. Klasik adenokarsinomlardan daha kötü prognoza sahiptirler ^{3,35}.

- **Taşlı yüzük hücreli karsinom**

Genellikle genç hastalarda görülürler. Bu tip tümörlerin hücreleri, %50'den fazlasında intrastoplazmik müsin varlığı ile karakterizedir. Müsinöz tümörlerden farklı olarak müsinin büyük bir kısmı ya da tamamı hücre içindedir. Bu hücre içi birikimde çekirdeği kenara iterek taşlı yüzük görünümüne neden olur. Lenf nodlarına, peritoneal alanlara ve overe metastaz yaparlar ³⁷.

- **Skvamöz/ adenoskuamöz karsinom**

Saf skuamöz hücreli karsinom kolonda oldukça az bulunur. Klasik bulgular adenokarsinomlarla benzerlik gösterir. Fakat bazen tümör paratiroid hormon benzeri bir madde üretebilir ve hiperkalsemi bulguları gösterebilir. Bu tümörün tanısı için hastada başka bir noktada skuamöz hücreli karsinom olmamalıdır [38](#).

- **Undiferansiye karsinom**

Kolorektal tümörlerin % 1'ini oluşturur. Tümör hücreleri genellikle iyi sınırlı, tek düze ve küçük / orta büyüklükte nükleosludur.

2.4.7. Kolorektal kanserde evreleme

Kolorektal kanserlerde ilk kez patolojik evrelendirmeyi Cuthbert E. Dukes 1932 yılında yapmıştır. Sınıflandırma kanserin direkt yayılımı ve lenfatik tutulum üzerine dayanır. 1954 yılında Aster-Coller tarafından tümör derinliğinin önemine dayanarak Dukes klasifikasyonu modifiye edilmiştir. 1967 Yılında Turnbull, Dukes sistemine uzak metastazla ilgili olan stage D yi eklemiştir. Günümüzde American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) tarafından yapılan TNM evrelemesi kullanılmaktadır. Buna göre;

Evre 0	Tis No Mo ---- ----
Evre I	T1 No Mo T2 No Mo A B1 % 85-95
Evre II	T3 No Mo T4 No Mo B B2 % 60-80
Evre III	Tx N1 Mo Tx N2-3 Mo C C1 - C2 % 30-50
Evre IV	Tx Nx M1 D % 5-10 yaşam şansı bulunmaktadır 31 .

2.4.8. Kolon kanserinde diferansiasyon derecesi

Adenokarsinomlar iyi, orta ve az diferansiye olmak üzere üç grupta sınıflandırılır.

1. İyi diferansiye (Grade 1): tümörün %95'inde glandüler yapılanma gözlenmektedir.
2. Orta derece diferansiye(Grade 2): tümörün %50-95'inde glandüler yapılanma gözlenmektedir.

3. Kötü derece diferansiye (Grade 3): Tümörün %5-502sinde glandüler yapılanma gözlenmektedir.
4. İndiferansiye (Grade 4): Tümörün %5'inden azında glandüler yapılanma gözlenmektedir [39](#).

2.4.9. Kolon kanseri risk faktörleri

2.4.9.1.Yaş

Yaşın ilerlemesiyle kolon kanseri gelişimi de artış göstermektedir. Kolorektal kanserlerin büyük bir bölümü 50 yaşından sonra meydana gelir. En fazla görüldüğü yaşlar ise 60-65'tir [40,41](#).

Tümör çok genç ve yaşlılarda görüldüğünde prognoz kötüdür [31](#).

2.4.9.2. İdiyopatik inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile ilişkisi

Ülseratif kolon ve Crohn hastalığı bulunan hastalarda kolorektal kanser görülme sıklığı yüksektir Bu grupta ortalama %3-8 olan kanserleşme oranı, hastalığın başlamasından 10 yıl sonra % 10'a, 25 yıl sonra ise %30'lara kadar çıkmaktadır [42,43](#).

2.4.9.3.Ailede kolon kanseri öyküsü

Ailede kolon kanseri olan birey varsa bu hastalığa yakalanma riski artmaktadır. Özellikle bireyde hastalık erken yaşlarda ortaya çıkmışsa hastalığın ailesel kökenli olduğu düşünülür [44](#).

2.4.9.4.Obezite

Aşırı kilolu kişilerin kolon kanserine yakalanma riskinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda aşırı kilo kanserden ölümleri de artırmaktadır. Fiziksel olarak inaktif bireylerde de kolon kanseri gelişimi yüksektir [35,45](#).

2.4.9.5.Diyet

Kolorektal kanser oranlarının yüksek olduğu batı toplumlarında toplam kalorinin %40-45'ini doymuş ve doymamış yağ oluştururken, düşük riske sahip toplumlarda yağ oranı toplam kalorinin %10-15'ini meydana getirir [46](#). Kırmızı et ve işlenmiş etlerin çok fazla tüketilmesi kolon kanseri riskini arttırmaktadır. Lifli, yeşil yapraklı sebzeler ve meyveler antioksidan vitamin içerdiğinden kanser oluşumunu engellemektedir. Sarımsak detoksifiye enzim içermesi nedeniyle tümör çoğalmasını engellemektedir.

Alkol tüketimi anormal DNA metilasyonundan dolayı kolon kanseri ve adenom oluşma riskini arttırmaktadır [35](#).

2.4.9.6.Sigara

Uzun süre sigara içenlerin sigara içmeyenlere göre kolon kanserine yakalanma ve ölme riskini arttırmaktadır [35](#).

2.4.9.7.Irk ve etnik köken

Afrika ve Amerikalıların kolon kanserine yakalanma riskinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bunun yanısıra Polonya ve Almanya yahudileri arasında kolon kanseri riskinin artmasına neden olan bir çok gen mutasyonu saptanmıştır [44](#).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunun Tanımlanması

Bu çalışma kapsamında kolon kanseri tanısı konulan yaklaşık 67 bireyden oluşan hasta grubu ve herhangi bir kanser tanısı konulmamış 45 bireyden oluşan kontrol grubu olmak üzere iki grup oluşturulmuştur.

2007-2011 yılları arasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından kolon kanseri tanısı konulan bireylere ait parafine gömülü doku örnekleri hasta grubunu oluşturmaktadır. Bireylere ait yaş, cinsiyet, tümör derecesi, tümör tipi, sigara, alkol kullanımı ve aile hikâyesinde kanser olup olmadığı bilgileri patoloji raporları ve hasta dosyalarından elde edilmiştir.

Kontrol grubuna oluşturan bireylere ait kan örnekleri ise 2011 yılında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden temin edilmiştir. Bu bireylere ait yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımı bilgileri de hasta dosyalarından elde edilmiştir.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Parafine gömülü dokudan DNA izolasyon kiti (analytikjena blackPREP FFPE, Germany), Periferik kandan DNA izolasyon kiti (İnvitrogen PureLink Genomik DNA Mini Kit, USA), Agaroz (Sigma), DNA marker (Sigma), Etidyum Bromid (Sigma), Primerler (İnvitrogen), Taq polimeraz (Fermentas), Etanol (J.T Baker), dNTP set (Fermentas), Restriksiyon enzimleri (10U/µl Fermentas), Yükleme boyası 6X (Fermentas), 10X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE) (SantaCruz).

3.3. Kullanılan Gereçler

Elektroforez (Cleaver Mini Yatay MOD.-MSMIDID40), Elektroforez için güç kaynağı (Cleaver-MP-250N) Jel görüntüleme sistemi (L-PIX Locus Biotecnologia), Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge-5415 R), Termo blok (Eppendorf- TermoStat Plus (1.5 ml)), Vorteks (IKA- MS 1), Hassas terazi (BOECO- BEB 43), Saf su cihazı (TKA- Pacific), Etüv (Heraeus), Buzdolabı (Vestel-Beko), PZR cihazı (BIO-RAD), Pipet takımı (Eppendorf), Mikrodalga fırın

(Vestel), UV (Syngene, UK), Rotary mikrotom (LEICA RM2145), Otoklav (TOMY SX-500E), Pipet ucu, Ependorf tüp, PZR tüpü .

3.4. Agaroz Jel Elektroforezinde kullanılan Çözeltiler

3.4.1. Etidyum Bromür (10 mg/ml)

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

3.4.2. 1X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE)

100 ml TBE tamponunun (10X) üzerine 900 ml steril distile su ilave edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

3.4.3. Yükleme Tamponu (Loading Dye)

10 mM Tris-HCl (pH 7.6), %0.03 bromofenol mavisi, %0.03 ksilen siyanol FF, %60 gliserol 60 mM EDTA içermektedir.

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Parafine gömülü kolon kanser dokusundan DNA izolasyonu

DNA izolasyonu analytikjena blackPREP FFPE DNA Kit kullanılarak yapıldı. DNA izolasyonu 6 basamakta gerçekleşti;

- 1- Parafine gömülü dokulardan mikrotom ile yaklaşık olarak 2x5 µm boyutlarında kesit alınarak ependorf tüpüne konuldu.
- 2- Alınan kesitler üzerine 400 µl QPT ve 25µl proteinaz K eklenerek 5 saniye vortekslendi. 50 °C'de 1 saat ve 90 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 3- Santrifüj sonrası süpernatant kısmı 1,5 ml'lik tüpe alınarak üzerine 200 µl SBS eklendi ve vorteks/pipetaj yapıldı. Farklı bir receiver tüpe spin filter takıldı ve karışım bu tüpe alındı. Daha sonra yaklaşık 12.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi.
- 4- Karışımın üzerine 700 µl MS solüsyonu eklenerek yaklaşık 12.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Aynı işlem iki kez tekrarlandı.
- 5- Tüpten filtre çıkarılarak yeni bir receiver tüpe alındı. Maksimum hızda 2 dk. santrifüj edildi.

- 6- Daha sonra filtre çıkarılarak elution tüpüne alındı ve 100 µl elution buffer eklendi. 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Ardından filtre çıkarılarak atıldı, elde edilen DNA çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı.

3.5.2. Periferik kandan DNA izolasyonu

Periferik kandan DNA izolasyonu İnvitrogen PureLink Genomik DNA Mini Kit (USA) kullanılarak yapıldı. DNA izolasyonu 18 basamakta gerçekleşti;

1. 200 µl kan örneği ependorf tüpe alındı.
2. 20 µl proteinaz K eklendi.
3. 20 µl RNase A eklendi. Vorteks yapıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
4. 200 µl genomik lizis/binding buffer eklendi ve vorteks yapıldı.
5. 55 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. 200 µl 96-100'lük etanol eklendi ve 5 saniye vorteks yapıldı.
7. Karışım filtrelili tüpe alındı.
8. 12000 rpm'de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.
9. Filtrelili kısım başka bir tüpe alındı.
10. 500 µl yıkama tamponu 1(Wash buffer 1) eklendi.
11. 12000 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi.
12. Filtrelili kısım başka bir tüpe alındı.
13. 500 µl yıkama tamponu 2 (Wash buffer 2) eklendi.
14. Oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi.
15. Filtrelili kısım 1.5 ml'lik ependorf tüpe alındı.
16. 100 µl genomik elution buffer eklendi.
17. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı.
18. Maksimum hızda oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Filtre çıkarılarak atıldı ve elde edilen DNA çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı.

3.5.3. Elde edilen DNA'nın konsantrasyon ve kalitesinin tayini

Parafine gömülü dokulardan elde edilen DNA'ların konsantrasyonu ve kalitesinin tayini spektrofotometre ile ölçüldü. İlk olarak spektrofotometre küvetine 100 µl saf su koyuldu ve cihazda okutuldu. Daha sonra yeni bir küvete 2µl DNA örneği üzerine de 98 µl saf su koyuldu ve cihazda okutuldu. DNA'nın 260 ve 280 nm dalga boyundaki değerleri, saflık derecesi (A260/A280) ve konsantrasyonu cihazdan okundu.

DNA'nın yeterince saf kabul edildiği A260/A280 değeri yaklaşık 1.8'dir. Eğer ortamda protein ve fenol varsa bu oran daha da düşecektir. A260/A280 oranı 2'den büyük ise ortamda RNA varlığından söz edilir.

3.5.4. Survivin gen polimorfizmlerinin tespit edilmesi

Survivin ile ilgili gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. Bu primerler uluslar arası yayınlarda doğrulanmış primer dizileridir ⁴⁷.

Tablo 3.1. Survivin gen polimorfizmlerinin tespiti için kullanılan primerler

Genler	Pozisyon ve baz değişimi	Primerler
SURVIVIN	-1547A/G (rs3764383)	İleri primer: 5'-GCCCCGATGCATTTAAATAAAGA-3' Geri primer: 5'-GCAGAGAGTGAATGTTAAAGTTAA-3'
	-625C/G (rs8073069)	İleri primer: 5'-TGTTCAATTTGTCCTTCATGCGC-3' Geri primer: 5'-CCAGCCTAGGCAACAAGAGCAA-3'
	-241C/T (rs17878467)	İleri primer: 5'-GATTACAGGCGTGAGCCACT-3' Geri primer: 5'-GTGTGCCGGGAGTTGTAGTC-3'
	-31G/C (rs9904341)	İleri primer: 5'-CGTTCCTTGAAGCAGTCGAG-3' Geri primer: 5'-TGTAGAGATGCGGTGGTCCT-3'

3.5.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'da Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PZR'in Hazırlanışı

- DNA Taq polimeraz enzimi (5U/μl) (Fermentas EP0402)

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

- dNTP'ler (4x25 μmol) (Fermentas R0181)

100 mM'lık dNTP'lerden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 10'ar μl alınıp (toplam 40 μl) 500 μl'lik tüpe kondu. Üzerine 460 μl distile su eklenerek 500 μl 2 mM'lık dNTP karışımı hazırlandı ve -20 °C'de saklandı. PZR reaksiyonunda bu stoktan alınan dNTP karışımı kullanıldı.

Toplam reaksiyon hacmi 25 μl olacak şekilde aşağıdaki bileşenler sırası ile steril ependorfa konuldu.

- 3 µl 10X PZR tamponu
- 1,2 µl MgCl₂ (25 mM)
- 3 µl dNTP, (2 mM)
- 1 µl 10 pmol ileri primer
- 1 µl 10 pmol geri primer
- 12,8 µl dH₂O
- 0,5 µl DNA Taq Polimeraz enzimi (5 U/ µl)
- 2 µl genomik DNA (150-200 ng)

Taq polimeraz eklendikten sonra vakit kaybetmeden tüp içine konan bileşenlerin iyice karışması için pipetleme işlemi yapıldı. Daha sonra örnek sayısı kadar 0.2 ml'lik tüplere PZR karışımından 23 µl dağıtıldı. Her tüpe 2 µl DNA eklenerek pipetleme işlemi yeniden yapıldı. PZR cihazına örnekler yerleştirildi ve PZR işlemi başlatıldı.

3.5.6. PZR koşulları

Survivin -31 G/C gen polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 66 °C sıcaklık kullanıldı ⁴⁷ (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Survivin -31 G/C polimorfizmi için PZR koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	35
Bağlanma (Annealing)	66	45 saniye	
Uzama (Extension)	72	1 dakika	
Son Uzama	72	10 dakika	1
Soğutma	4	-	-

Survivin -241 C/T ve -625 C/G gen polimorfizmlerini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 61 °C sıcaklık kullanıldı ⁴⁷ (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Survivin -241 C/T ve -625 C/G polimorfizmleri için PZR koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	35
Bağlanma (Annealing)	61	45 saniye	
Uzama (Extension)	72	1 dakika	
Son Uzama	72	10 dakika	1
Soğutma	4	-	-

Survivin -1547 A/Ggen polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 52 °C sıcaklık kullanıldı ⁴⁷ (Tablo 3.5).

Tablo 3.4. Survivin -1547 A/G polimorfizmi için PZR koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	35
Bağlanma (Annealing)	52	45 saniye	
Uzama (Extension)	72	1 dakika	
Son Uzama	72	10 dakika	1
Soğutma	4	-	-

3.5.7. %2'lik agaroz jel hazırlanması

- 2 gr. agaroz (Sigma) tartılarak erlen içine konuldu. Üzerine son hacim 100 ml. olacak şekilde 1X TBE tamponu eklendi ve mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözüldürüldü.
- Erlenin sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde çözülmüş agaroz jel içine 2,5 µl etidyum bromür (10mg/ml) eklendi.
- Yükleme kuyucuklarının oluşması için jel yatağına tarak yerleştirildi ve hazırlanan jel yavaşça hava kabarcığı oluşmayacak şekilde jel yatağına döküldü. Jel donmaya bırakıldı.
- Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır duruma geldi.

3.5.8. PZR ürünlerinin %2'lik jele yüklenmesi

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

Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı (Cleaver-MP-250N) 100 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi 30 dakika sürdü.

3.5.8.1. PZR ürünlerinin kontrolü

Survivin ilgili gen bölgelerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla PZR tüplerinden alınan 5 µl örnek 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yukarıda anlatılan elektroforez sisteminde yürütüldü. Yükleme işlemi sonrasında jel UV ışık altında PZR ürünleri incelendi.

3.5.9. Survivin gen polimorfizmlerinde enzim kesimi

3.5.9.1. Survivin -31 G/C gen polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler

Amplifiye olan PZR ürünleri Eco0109I (Fermentas FastDigest FD0264) enzimi ile 37 °C’de 15 dakika kesilmiştir. Kesim işleminde bir örnek için 5 µl PZR amplifikasyon ürünü, 8,5 µl distile su, 1 µl 10X FastDigest green buffer ve 0.5 µl enzim kullanılmıştır.

Tablo 3.5. Survivin -31 G/C polimorfizminde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler

Malzemeler	Eklene hacim	Enzim tanıma bölgesi
PZR ürünü	5 µl	
Distile su	8,5µl	
10X FastDigest green buffer	1µl	5'...R G^G N C C Y...3' 3'...Y C C N G^G R...5'
Eco0109I enzimi	0,5 µl	
Toplam	15 µl	

3.5.9.2. Survivin -241 C/T gen polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler

Amplifiye olan PZR ürünleri HaeII (Fermentas FastDigest FD2184) enzimi ile 37 °C’de 5 dakika kesilmiştir. Kesim işleminde bir örnek için 5 µl PZR amplifikasyon ürünü, 8,5 µl distile su, 1 µl 10X FastDigest green buffer ve 0.5 µl enzim kullanılmıştır.

Tablo 3.6. Survivin -241 C/T gen polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler

Malzemeler	Eklenen hacim	Enzim tanıma bölgesi
PZR ürünü	5 µl	
Distile su	8,5µl	
10X FastDigest green buffer	1µl	5'...R G C G C^Y...3' 3'...Y^C G C G R...5'
HaeII enzimi	0,5 µl	
Toplam	15 µl	

3.5.9.3. Survivin -625 C/G polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler

Amplifiye olan PZR ürünleri BstUI (Fermentas FastDigestFD0924) enzimi ile 37 °C’de 5 dakika kesilmiştir. Kesim işleminde bir örnek için 5 µl PZR amplifikasyon ürünü, 8,5 µl distile su, 1 µl 10X FastDigest green buffer ve 0.5 µl enzim kullanılmıştır.

Tablo 3.7. Survivin -625 C/G gen polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler

Malzemeler	Eklenen hacim	Enzim tanıma bölgesi
PZR ürünü	5 µl	
Distile su	8,5µl	
10X FastDigest green buffer	1µl	5'...CG^CG...3' 3'...GC^GC...5'
BstUI enzimi	0,5 µl	
Toplam	15 µl	

3.5.9.4. Survivin -1547A/G polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler

Amplifiye olan PZR ürünleri HincII (Fermentas FastDigestFD0494) enzimi ile 37 °C’de 5 dakika kesilmiştir. Kesim işleminde bir örnek için 5 µl PZR amplifikasyon ürünü, 8,5 µl distile su, 1 µl 10X FastDigest green buffer ve 0.5 µl enzim kullanılmıştır.

Tablo 3.8. Survivin -1547 A/G gen polimorfizminin tespitinde kullanılan enzim ve kimyasal maddeler

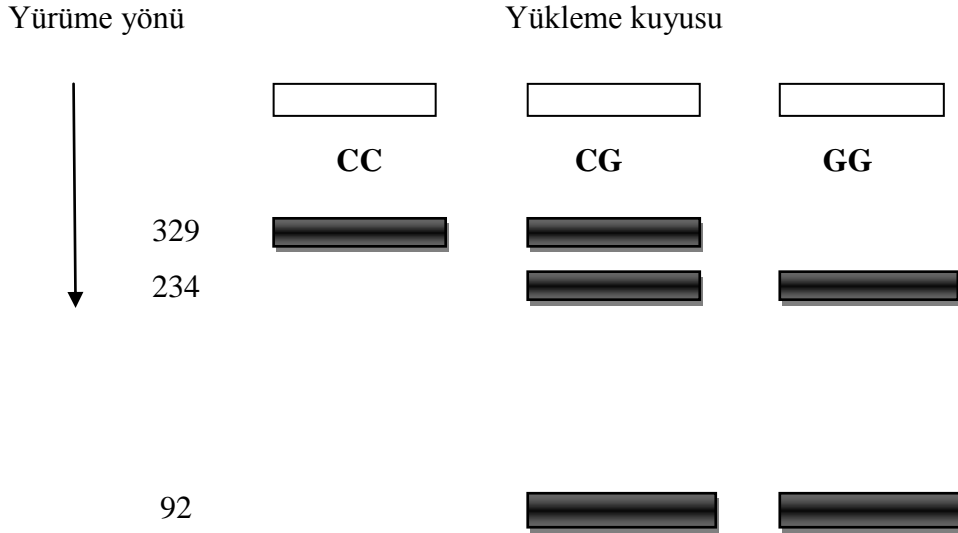
Malzemeler	Eklenen hacim	Enzim tanıma bölgesi
PZR ürünü	5 µl	
Distile su	8,5µl	
10X FastDigest green buffer	1µl	5'...G T Y^R A C...3' 3'...C A R^Y T G...5'
HincII enzimi	0,5 µl	
Toplam	15 µl	

3.5.10. Survivin gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesi ve kontrolü

- %2lik agaroz jel hazırlandı.
- İlgili kesim enzimleri ile kesilen PZR ürünlerinden 5 µl alınarak %2'lik agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı.
- Kesim ürünleri (Sigma 50 bp marker) DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü.
- Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık altında incelendi.

3.5.10.1. Survivin -31 G/C gen polimorfizminin değerlendirilmesi

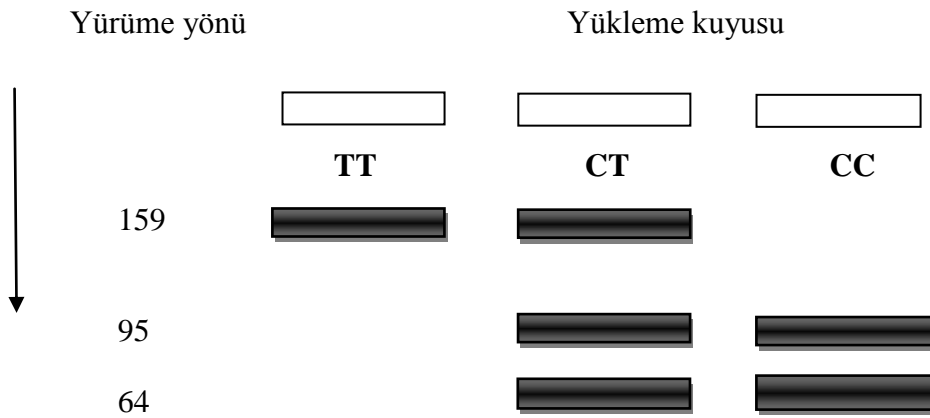
Uygun koşullar altında Eco0109I enzim ile kesilen PZR ürünlerinden C alleleline sahip örnekler 329 bç büyüklüğünde tek bant verirken, homozigot G alleleline sahip PZR ürünleri, enzim kesimi sonrası 234 bç ve 92 bç olmak üzere iki bant vermektedir. Heterozigot yani CG genotipine sahip mutasyonlu PZR ürünleri ise 329, 234 ve 92 bç olmak üzere her üç bandı da içermektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Survivin -31 G/C gen polimorfizminin şematik jel görüntüsü

3.5.10.2. Survivin -241 C/T gen polimorfizminin değerlendirilmesi

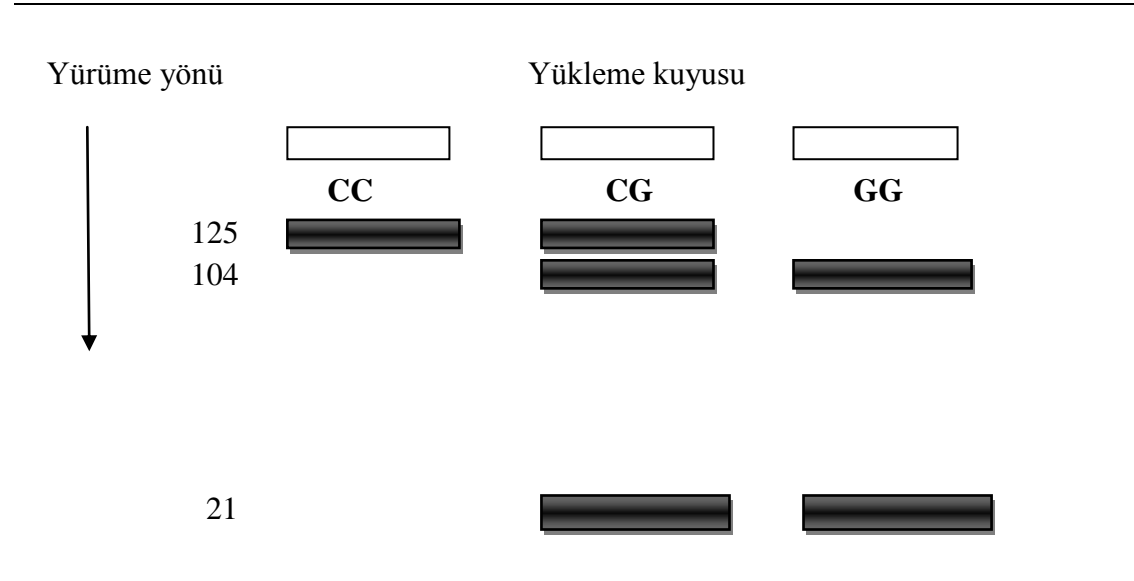
Uygun koşullar altında HaeII enzim ile kesilen PZR ürünlerinden T allele sahip örnekler 159 bç büyüklüğünde tek bant verirken, homozigot C allele sahip PZR ürünleri, enzim kesimi sonrası 95 bç ve 64 bç olmak üzere iki bant vermektedir. Heterozigot yani CT genotipine sahip mutasyonlu PZR ürünleri ise 159, 95 ve 64 bç olmak üzere her üç bandı da içermektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Survivin -241 C/T gen polimorfizminin şematik jel görüntüsü

3.5.10.3. Survivin -625 C/G polimorfizminin değerlendirilmesi

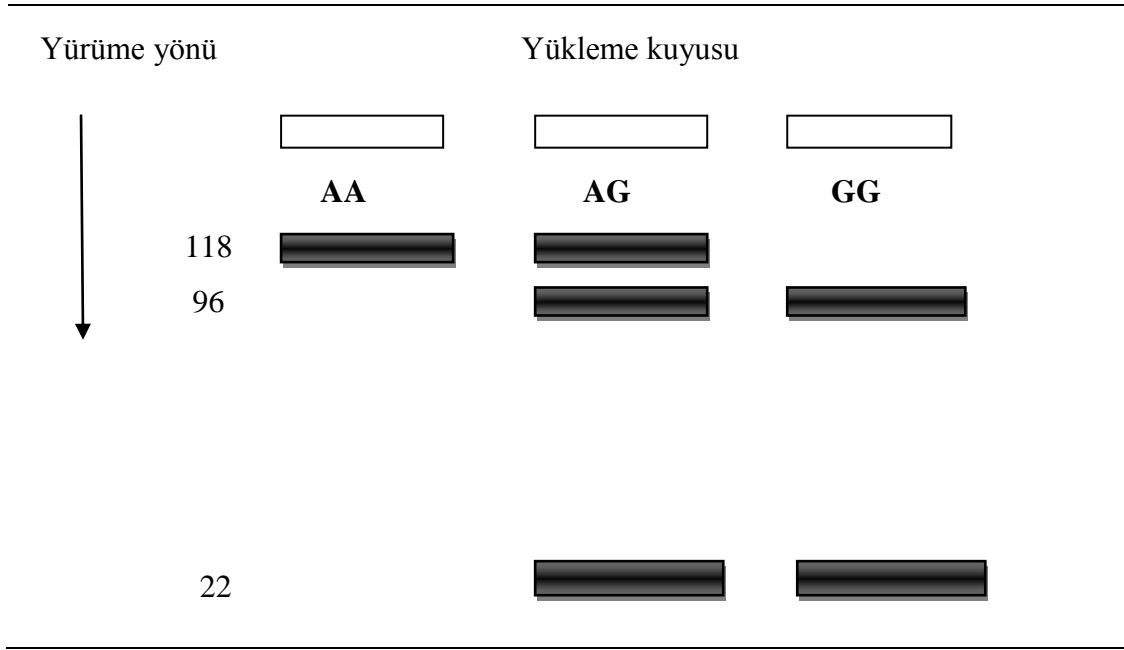
Uygun koşullar altında BstUI enzimi ile kesilen PZR ürünlerinden C alleleline sahip örnekler 125 bç büyüklüğünde tek bant verirken, homozigot G alleleline sahip PZR ürünleri, enzim kesimi sonrası 104 bç ve 21 bç olmak üzere iki bant vermektedir. Heterozigot yani CG genotipine sahip mutasyonlu PZR ürünleri ise 125, 104 ve 21 bç olmak üzere her üç bandı da içermektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Survivin -625 C/G gen polimorfizminin şematik jel görüntüsü

3.5.10.4. Survivin -1547 A/G polimorfizminin değerlendirilmesi

Uygun koşullar altında HincII enzim ile kesilen PZR ürünlerinden A alleleline sahip örnekler 118 bç büyüklüğünde tek bant verirken, homozigot G alleleline sahip PZR ürünleri, enzim kesimi sonrası 96 bç ve 22 bç olmak üzere iki bant vermektedir. Heterozigot yani AG genotipine sahip mutasyonlu PZR ürünleri ise 118, 96 ve 22 bç olmak üzere her üç bandı da içermektedir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Survivin -1547 A/G gen polimorfizminin şematik jel görüntüsü

3.6. İstatistiksel Analizler

Çalışma ve kontrol grubu arasında sayısal değişkenlerin (yaş) ortalamalarının karşılaştırılmasında Student's t-testi, kategorik değişkenlerin (cinsiyet, alkol ve sigara kullanımı gibi) frekansları yönünden farklılıkların karşılaştırılmasında Ki-Kare (χ^2) testi kullanıldı. Çalışma ve kontrol grubu arasında Survivin -31 G/C, -241 C/T, -625 C/G ve -1547 A/G mutasyonlarının frekansları yönünden farklılıklar Ki-kare testi ile kontrol edildi. Tüm değişkenlerin birlikte ilişkisi Lojistik regresyon analizi ile kontrol edildi. P değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. Bütün istatistiksel yöntemler, "SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, SPSS for Windows, Version 15,0 Chicago, IC, USA)" istatistiksel paket programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma ve Kontrol Grubu Bireylerinin Genel Bilgileri

Bu çalışmada her bir polimorfizm için çalışma grubundaki birey ve birey sayısı değişkenlik göstermektedir. Kontrol grubunda ise herhangi bir kanser tanısı olmayan 45 sağlıklı birey dâhil edildi.

Hasta bireylere ait yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, alkol kullanımı, aile hikâyesi, tümör derecesi, tümör tipi bilgileri hasta dosyaları ve patoloji raporlarından elde edildi. Kontrol grubundaki bireylerin yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, alkol kullanımı bilgileri ise yine dosyalardan elde edildi.

Survivin -31 G/C polimorfizmini incelemek için kolon kanseri tanısı konulmuş 25-89 yaş aralığında 59 birey çalışma grubuna dâhil edildi. Bireylerin yaş ortalaması $65,94 \pm 13,08$ olarak bulundu. Kontrol grubuna ise 31-82 yaş aralığında 45 birey dahil edildi. Kontrol grubundaki bireylerin yaş ortalamasının $52,54 \pm 11,65$ olarak bulundu (Tablo 4.1). Bireylerin 25 (%42.4)'ünün bayan, 34 (%57.6)'ünün erkek olduğu tespit edildi. Kontrol grubundaki bireylerin ise 25 (%55.6)'ü bayan, 20 (%44.6)'i erkekti. Çalışma grubundaki bireyler sigara kullanımı açısından değerlendirildiğinde 43 (%81.1)'ünün sigara kullanmadığı, 10 (%18.9)'ünün sigara kullandığı tespit edildi. Kontrol grubundaki bireylerin ise 30 (%81.1)'unun sigara kullanmadığı, 7 (%18.9)'ünün ise sigara kullandığı tespit edildi. Çalışma grubundaki bireylerin 47 (%87.7)'ünün alkol kullanmadığı, 6 (%11.3)'ünün alkol kullandığı tespit edilirken kontrol grubundaki bireylerin 36 (%97.3)'ünün alkol kullanmadığı, 1 (%2.7)'inin ise alkol kullandığı tespit edildi (Tablo 4.2).

Histopatolojik özelliklerden tümörün histopatolojik türü açısından değerlendirildiğinde; adenokarsinomlu 49 (%89.1), karsinomlu 3 (%5.5), taşlı yüzük hücreli karsinomlu 1 (%1.8), adenomlu 2 (%3.6) birey olduğu tespit edildi. Tümör derecesi açısından değerlendirildiğinde ise düşük dereceli tümörü olan 3 (%6.3), orta dereceli tümörü olan 31 (%64.6), yüksek dereceli tümörü olan 14 (%29.2) birey olduğu tespit edildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Survivin -31 G/C polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin yaş özellikleri

Özellikler	Kontrol (n=45)		Hasta (n=59)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon	
	Ort±SD	Min-Max	Ort±SD	Min-Max		P	OR
Yaş	52,70±11,80	31-82	65,94±13,08	25-89	0.0001	1.08	0.0001

Tablo 4.2. Survivin -31 G/C polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin histopatolojik ve demografik özellikleri

Özellikler		Kontrol (n=45)		Hasta (n=59)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon	
		Sayı	%	Sayı	%		P	OR
Cinsiyet	K	24	53.3	25	42.4	0.267	0.34	0.111
	E(referans)	21	46.7	34	57.6		1.00	---
Tümör Derecesi	Düşük	--	--	3	6.3		---	---
	Orta	--	--	31	29.2		---	---
	Yüksek	--	--	14	14		---	---
Tümör tipi	Adenokarsinom	--	--	49	89.1		---	---
	Karsinom	--	--	3	5.5		---	---
	Taşlyüzük	--	--	1	1.8		---	---
	Adenom	--	--	2	3.6		---	---
Aile hikayesi	Yok	--	--	41	77.4		---	---
	Var	--	--	12	22.6		---	---
Sigara	Yok (referans)	30	81.1	43	81.1	0.995	1.00	---
	Var	7	18.9	10	18.9		0.42	0.31
Alkol	Yok	36	97.3	47	88.7	0.133	0.74	0.04
	Var(referans)	1	2.7	6	11.3		1.00	---

Survivin -241 C/T için kolon kanseri tanısı konulmuş 25-89 yaş aralığında 68 birey çalışma grubuna dahil edildi. Bireylerin yaş ortalaması 66.07±12.96 olarak tespit edildi. Kontrol grubunu oluşturan bireyler aynıdır (Tablo 4.3). Çalışma grubunu oluşturan bireylerin 27 (%40.3)'sinin bayan, 40 (%59.7)'inin ise erkek olduğu tespit edildi. Çalışma grubunu oluşturan bireyler sigara kullanımı açısından değerlendirildiğinde 47 (%79.7) bireyin sigara kullanmadığı, 12 (%20.3) bireyin ise sigara kullandığı tespit edildi. Çalışma grubundaki bireylerin 53 (%89.8)'ünün alkol kullanmadığı, 6 (%10.2)'sinin ise alkol kullandığı belirlendi.

Histopatolojik özelliklerden tümörün histopatolojik türü açısından değerlendirildiğinde; adenokarsinomlu 55 (%88.7), karsinomlu 3 (%4.8), taşlı yüzük hücreli karsinomlu 2 (%3.2), adenomlu 2 (%3.2) birey olduğu tespit edildi. Tümör derecesi açısından değerlendirildiğinde ise düşük dereceli tümörü olan 3

(%5.9), orta dereceli tümörü olan 35 (%68.6), yüksek dereceli tümörü olan 13 (%25.5) birey olduğu tespit edildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.3. Survivin -241 C/T polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin yaş özellikleri

Özellikler	Kontrol (n=45)		Hasta (n=68)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon	
	Ort±SD	Min-Max	Ort±SD	Min-Max		P	OR
Yaş	52,54±11,65	31-82	66.07±12.96	25-89	0.0001	1.09	0.0001

Tablo 4.4. Survivin -241 C/T polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin histopatolojik ve demografik özellikleri

Özellikler	Kontrol (n=45)		Hasta (n=68)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon		
	Sayı	%	Sayı	%		P	OR	P
Cinsiyet	K	25	55.6	27	40.3	0.112	0.43	0.20
	E(referans)	20	44.4	40	59.7		1.00	---
Tümör Derecesi	Düşük	--	--	3	5.9		---	---
	Orta	--	--	35	68.6		---	---
	Yüksek	--	--	13	25.5		---	---
Tümör tipi	Adenokarsinom	--	--	55	88.7		---	---
	Karsinom	--	--	3	4.8		---	---
	Taşlyüzük	--	--	2	3.2		---	---
	Adenom	--	--	2	3.2		---	---
Aile hikayesi	Yok	--	--	45	76.3		---	---
	Var	--	--	14	23.7		---	---
Sigara	Yok (referans)	30	81.1	47	79.7	0.865	1.00	---
	Var	7	18.9	12	20.3		0.58	0.49
Alkol	Yok	36	97.3	53	89.8	0.171	0.43	0.51
	Var(referans)	1	2.7	6	10.2		1.00	---

Survivin -625 C/G için kolon kanseri tanısı konulmuş 25-89 yaş aralığında 66 birey çalışma grubuna dahil edildi. Bireylerin yaş ortalaması 65,82±12,99 olarak tespit edildi. Kontrol grubunu oluşturan bireyler aynıdır (Tablo 4.5). Çalışma grubunu oluşturan bireylerin 26 (%39.4)'sinin bayan, 40 (%60.6)'ının ise erkek olduğu tespit edildi. Çalışma grubunu oluşturan bireyler sigara kullanımı açısından değerlendirildiğinde 49 (%81.7) bireyin sigara kullanmadığı, 11 (%18.3) bireyin ise sigara kullandığı tespit edildi. Çalışma grubundaki bireylerin 54 (%90)'ünün alkol kullanmadığı, 6 (%10)'sının ise alkol kullandığı belirlendi.

Histopatolojik özelliklerden tümörün histopatolojik türü açısından değerlendirildiğinde; adenokarsinomlu 54 (%88.5), karsinomlu 3 (%4.9), taşlı yüzük hücreli karsinomlu 2 (%3.3), adenomlu 2 (%3.3) birey olduğu tespit edildi.

Tümör derecesi açısından değerlendirildiğinde ise düşük dereceli tümörü olan 2 (%3.9), orta dereceli tümörü olan 35 (%68.6), yüksek dereceli tümörü olan 14 (%27.5) birey olduğu tespit edildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.5. Survivin -625 C/G polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin yaş özellikleri

Özellikler	Kontrol (n=45)		Hasta (n=66)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon	
	Ort±SD	Min-Max	Ort±SD	Min-Max		P	OR
Yaş	52,46±11,62	31-82	65,82±12,99	25-89	0.0001	1.08	0.0001

Tablo 4.6. Survivin -625 C/G polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin histopatolojik ve demografik özellikleri

Özellikler		Kontrol (n=45)		Hasta (n=66)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon	
		Sayı	%	Sayı	%		P	OR
Cinsiyet	K	25	55.6	26	39.4	0.093	0.43	0.22
	E(referans)	20	44.4	40	60.6		1.00	---
Tümör Derecesi	Düşük	--	--	2	3.9		---	---
	Orta	--	--	35	68.6		---	---
	Yüksek	--	--	14	27.5		---	---
Tümör tipi	Adenokarsinom	--	--	54	88.5		---	---
	Karsinom	--	--	3	4.9		---	---
	Taşlyüzük	--	--	2	3.3		---	---
	Adenom	--	--	2	3.3		---	---
Aile hikayesi	Yok	--	--	45	76.3		---	---
	Var	--	--	14	23.7		---	---
Sigara	Yok	30	81.1	49	81.7	0.943	2.84	0.18
	Var(referans)	7	18.9	11	18.3		1.00	---
Alkol	Yok	36	97.3	54	90	0.177	0.31	0.32
	Var(referans)	1	2.7	6	10		1.00	---

Survivin -1547 A/G polimorfizmini incelemek için kolon kanseri tanısı konulmuş 25-89 yaş aralığında 60 birey çalışma grubuna dâhil edildi. Bireylerin yaş ortalaması 65,03±13.15 olarak bulundu. Kontrol grubuna ise 31-82 yaş aralığında 32 birey dahil edildi. Kontrol grubundaki bireylerin yaş ortalamasının 53.34±11.89 olarak bulundu (Tablo 4.7). Bireylerin 23 (%38.3)'ünün bayan, 37 (%61.7)'sinin erkek olduğu tespit edildi. Kontrol grubundaki bireylerin ise 17 (%53.1)'i bayan, 15 (%46.9)'i erkekti. Çalışma grubundaki bireyler sigara kullanımı açısından değerlendirildiğinde 33 (%82.5)'ünün sigara kullanmadığı, 7 (%17.5)'sinin sigara kullandığı tespit edildi. Kontrol grubundaki bireylerin ise 19 (%76)'unun sigara kullanmadığı, 6 (%24)'sının ise sigara kullanmadığı tespit edildi. Çalışma

grubundaki bireylerin 38 (%95)' inin alkol kullanmadığı, 2 (%5)'sinin alkol kullandığı tespit edilirken kontrol grubundaki bireylerin 25 (%96)'inin alkol kullanmadığı, 1 (%4)'inin ise alkol kullandığı tespit edildi (Tablo 4.8).

Histopatolojik özelliklerden tümörün histopatolojik türü açısından değerlendirildiğinde; adenokarsinomlu 47 (%85.5), karsinomlu 4 (%7.3), taşlı yüzük hücreli karsinomlu 2 (%3.6), adenomlu 2 (%3.6) birey olduğu tespit edildi. Tümör derecesi açısından değerlendirildiğinde ise düşük dereceli tümörü olan 6 (%12.5), orta dereceli tümörü olan 31 (%64.6), yüksek dereceli tümörü olan 11 (%22.9) birey olduğu tespit edildi (Tablo 4.8).

Tablo 4.7. Survivin -1547 A/G polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin yaş özellikleri

Özellikler	Kontrol (n=45)		Hasta (n=59)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon	
	Ort±SD	Min-Max	Ort±SD	Min-Max		P	OR
Yaş	53.34±11.89	31-82	65,03±13.15	25-89	0.0001	1.08	0.004

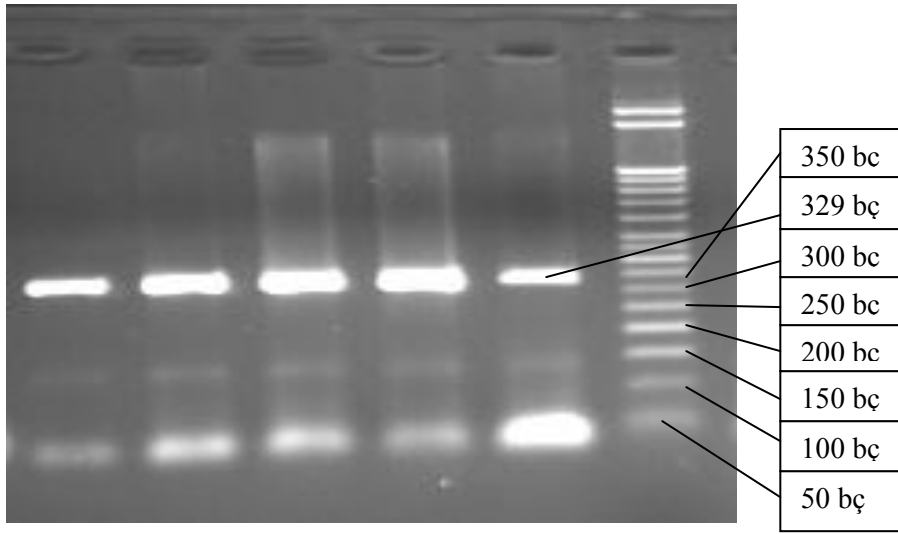
Tablo 4.8. Survivin -1547 A/G polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin histopatolojik ve demografik özellikleri

Özellikler		Kontrol (n=45)		Hasta (n=66)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon	
		Sayı	%	Sayı	%		P	OR
Cinsiyet	K	17	53.1	23	38.3		2.00	0.311
	E(referans)	15	46.9	37	61.7		1.00	---
Tümör Derecesi	Düşük	--	--	6	12.5		---	---
	Orta	--	--	31	64.6		---	---
	Yüksek	--	--	11	22.9		---	---
Tümör tipi	Adenokarsinom	--	--	47	85.5		---	---
	Karsinom	--	--	4	7.3		---	---
	Taşlıyüzük	--	--	2	3.6		---	---
	Adenom	--	--	2	3.6		---	---
Aile hikayesi	Yok	--	--	32	80		---	---
	Var	--	--	8	20		---	---
Sigara	Yok	19	76	33	82.5		1.00	---
	Var(referans)	6	24	7	17.5		0.46	0.36
Alkol	Yok	24	96	38	95			
	Var(referans)	1	4	2	5			

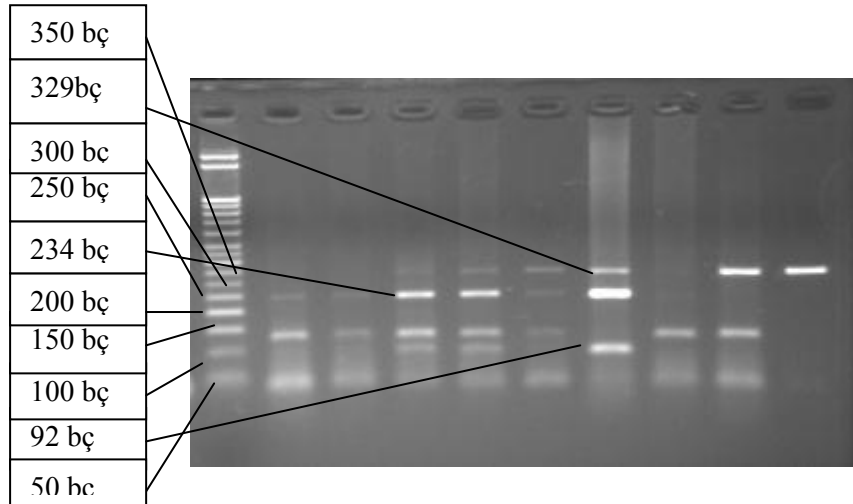
4.2. Survivin Gen Polimorfizmlerinin PZR ve Enzim Kesimi Sonuçları

Survivin -31 G/C polimorfizmini belirlemek için uygun primerler kullanılarak 329 bç'lik DNA bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltıldı (Resim 4.1). Çoğaltılan bu DNA bölgesi Eco0109I restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edildi. Elde edilen

enzim kesim ürünlerini belirlemek için %2'lik agaroz jelde yürütüldü. PZR ürünlerinin Eco0109I restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamelesi sonrası bu polimorfizmi heterozigot taşıyan bireylerde (GC) 329, 234, 92 olmak üzere 3 bant görülürken homozigot C alleli taşıyan bireylerde ise 329 bant büyüklüğü görüldü. Homozigot G alleli taşıyan bireylerde 234 ve 92 olmak üzere iki bant gözlemlendi (Resim 4.2).



Resim 4.1. Survivin -31 G/C polimorfizmini PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



Resim 4.2. Survivin -31 G/C polimorfizmini kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

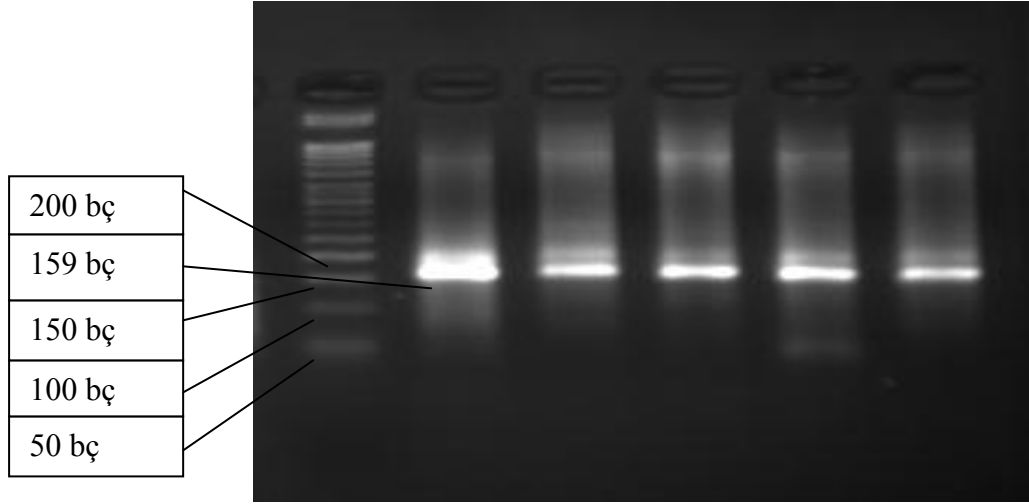
Çalışma grubunu oluşturan bireylerin 16 (%26.7)'sının homozigot G alleli, 35 (%58.3)'inin GC alleli, 9 (%15)'unun ise homozigot C alleli taşıdığı tespit edildi. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin 25 (%55.6)'inin homozigot G alleli, 16 (%35.6)'sının GC alleli, 4 (%8.9)'ünün ise homozigot C alleli taşıdığı tespit edildi.

Yaptığımız istatistiksel analizler sonucu çalışma ve kontrol grubundaki bireylerin genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p<0.05$). Homozigot C alleli taşıyan bireylerde kolon kanserine yakalanma riskinin önemli derecede fazla olduğu bulundu (OR=13.4). Aynı zamanda heterozigot GC genotipine sahip bireylerde de hastalığa yakalanma riskinin homozigot G alleli taşıyanlara göre daha yüksek olduğu bulundu (OR=5.39). C alleli taşıyıcılığının kolon kanserine yakalanma riskini önemli derecede arttırdığı gözlemlendi. Sonuçlar tablo 4.7’de gösterildi.

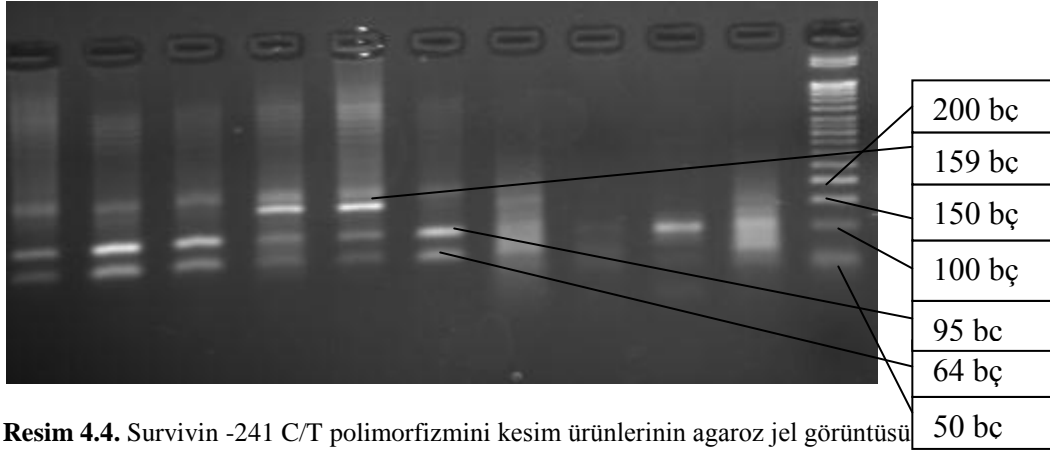
Tablo 4.7. Survivin -31 G/C polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin genotip dağılımları

Genotip	Kontrol (n=45)		Hasta (n=59)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon	
	Sayı	%	Sayı	%	P	OR	P
GG (referans)	25	55.6	16	26.7	0.011	1.00	---
CG	16	35.6	35	58.3		5.39	0.006
CC	4	8.9	9	15		13.40	0.01

Survivin -241 C/T polimorfizmini belirlemek için uygun primerler kullanılarak 159 bç’lik DNA bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltıldı (Resim 4.3). Çoğaltılan bu DNA bölgesi HaeII restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edildi. Elde edilen enzim kesim ürünlerini belirlemek için %2’lik agaroz jelde yürütüldü. PZR ürünlerinin HaeII restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamelesi sonrası bu polimorfizmi heterozigot taşıyan bireylerde (CT) 159, 95, 64 olmak üzere 3 bant görülürken homozigot T alleli taşıyan bireylerde ise 159 bant büyüklüğü görüldü. Homozigot C alleli taşıyan bireyler 95 ve 64 olmak üzere iki bant gözlemlendi (Resim 4.4).



Resim 4.3. Survivin -241 C/T polimorfizminin PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



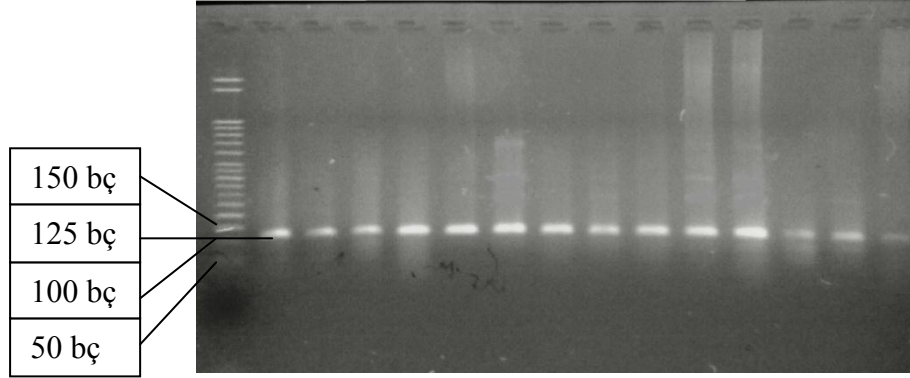
Resim 4.4. Survivin -241 C/T polimorfizmini kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

Çalışma grubunu oluşturan bireylerin 8 (%11.8)'inin homozigot T alleli, 39 (%57.4)'unun CT alleli, 21 (%30.9)'inin ise homozigot C alleli taşıdığı tespit edildi. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin 3 (%6.7)'ünün homozigot T alleli, 7 (%15.6)'sinin CT alleli, 35 (%77.8)'inin ise homozigot C alleli taşıdığı tespit edildi. Yaptığımız istatistiksel analizler sonucu çalışma ve kontrol grubundaki bireylerin genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Heterozigot CT genotipine sahip bireylerin kolon kanserine yakalanma riskinin daha yüksek olduğu bulundu (OR=12.0, $p=0.0001$). Sonuçlar tablo 4.8'de gösterildi.

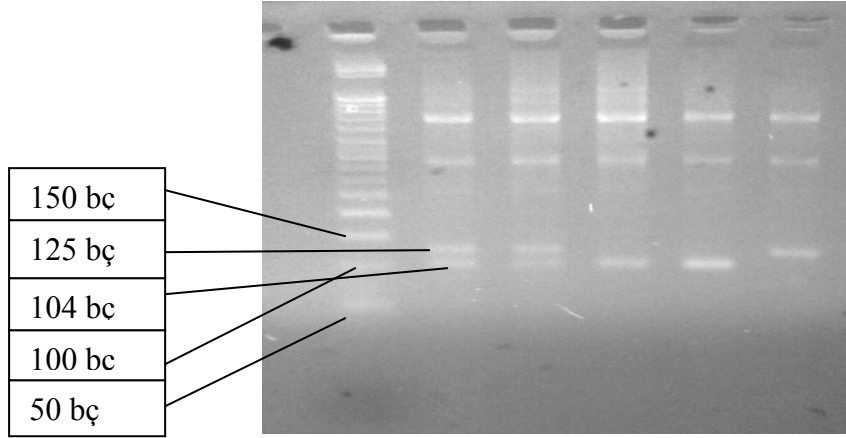
Tablo 4.8. Survivin -241 C/T polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin genotip dağılımları

Genotip	Kontrol (n=45)		Hasta (n=68)		Tek değişkenli analizler P	Lojistik regresyon	
	Sayı	%	Sayı	%		OR	P
TT	3	6.7	8	11.8	0.0001	2.04	0.44
CT	7	15.6	39	57.4		12.00	0.0001
CC(referans)	35	77.8	21	30.9		1.00	---

Survivin -625 C/G polimorfizmini belirlemek için uygun primerler kullanılarak 125 bç'lik DNA bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltıldı (Resim 4.5). Çoğaltılan bu DNA bölgesi BstUI restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edildi. Elde edilen enzim kesim ürünlerini belirlemek için %2'lik agaroz jelde yürütüldü. PZR ürünlerinin BstUI restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamelesi sonrası bu polimorfizmi heterozigot taşıyan bireylerde (CG) 125, 104, 21 olmak üzere 3 bant görülürken homozigot C alleli taşıyan bireylerde ise 159 bant büyüklüğü görüldü. Homozigot G alleli taşıyan bireyler 104 ve 21 olmak üzere iki bant gözlemlendi (Resim 4.6).



Resim 4.5. Survivin -625 C/G polimorfizminin PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



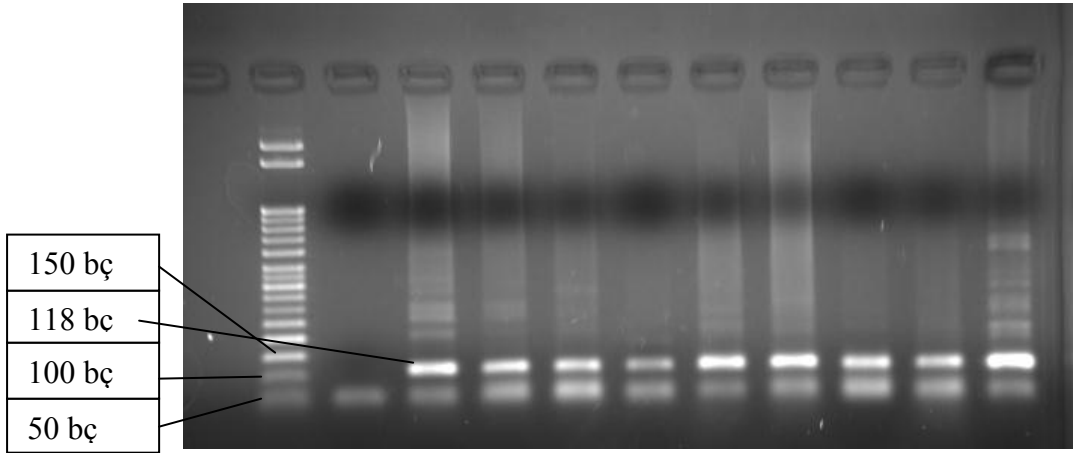
Resim 4.6. Survivin -625 C/G polimorfizminin kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

Çalışma grubunu oluşturan bireylerin 38 (%56.7)'inin homozigot G alleli, 29 (%43.3)'ünün CG alleli, 0 (%0)'ının ise homozigot C alleli taşıdığı tespit edildi. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin 13 (%28.9)'ünün homozigot G alleli, 18 (%40)'inin CG alleli, 14 (%31.1)'ünün ise homozigot C alleli taşıdığı tespit edildi. Yaptığımız istatistiksel analizler sonucu çalışma ve kontrol grubundaki bireylerin genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p < 0.05$). Sonuçlar tablo 4.9'de gösterildi.

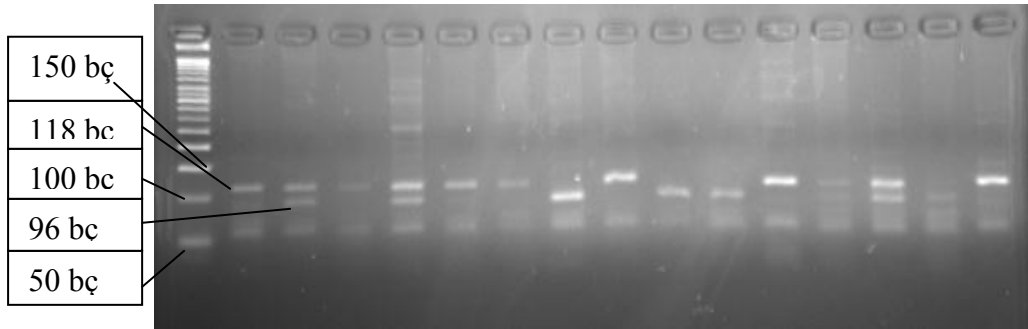
Tablo 4.9. Survivin -625 C/G polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin genotip dağılımları

Genotip	Kontrol (n=45)		Hasta (n=66)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon	
	Sayı	%	Sayı	%		P	OR
GG (referans)	13	28.9	38	56.7	0.0001	1.00	---
CG	18	40	29	43.3		0.000	0.998
CC	14	31.1	0	0		0.80	0.68

Survivin -1547 A/G polimorfizmini belirlemek için uygun primerler kullanılarak 118bp'lik DNA bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltıldı (Resim 4.7). Çoğaltılan bu DNA bölgesi HincII restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edildi. Elde edilen enzim kesim ürünlerini belirlemek için %3'lük agaroz jelde yürütüldü. PZR ürünlerinin HincII restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamelesi sonrası bu polimorfizmi heterozigot taşıyan bireylerde (AG) 118, 96, 22 olmak üzere 3 bant görülürken homozigot A alleli taşıyan bireylerde ise 118 bant büyüklüğü görüldü. Homozigot G alleli taşıyan bireyler 96 ve 22 olmak üzere iki bant gözlemlendi (Resim 4.8).



Resim 4.7. Survivin -1547 A/G polimorfizminin PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



Resim 4.8. Survivin -1547 A/G polimorfizminin kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

Çalışma grubunu oluşturan bireylerin 27 (%45)'sinin homozigot A alleli, 27 (%45)'sinin AG alleli, 6 (%10)'sının ise homozigot G alleli taşıdığı tespit edildi. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin 23 (%71.9)'ünün homozigot A alleli, 9 (%28.1)'ununun AG alleli, 0 (%0)'ının ise homozigot G alleli taşıdığı tespit edildi. Cinsiyet ve sigara hastalık oluşumunda etkili bulunmadığı için model dışı bırakıldı ve yeniden model inşaa edildi. Bu model gerçekte sağlıklı olan 32 kişinin 21 (%65.6 spesifite)' ini sağlıklı olarak tahmin ediyor. Yine gerçekte 60 hastanın 53 (%88.3 sensitivite)' ünü hasta gördü. Bu sayılar modelin başarı ölçüsünü göstermektedir (Tablo 4.10.).

Tablo 4.10. Yeni oluşturulan modelin doğruluk derecesini gösteren tablo (Sınıflandırma tablosu)

GÖZLENEN	GRUPLAR	TAHMİN GRUPLAR		DOĞRULUK YÜZDESİ	
		KONTROL	HASTA		
STEP 1		KONTROL	21	11	65.6
		HASTA	7	53	88.3
TOPLAM YÜZDE					80.4

a. Kesim değeri.500

Yaş arttıkça hastalık riskinin 1.074 kat arttığı belirlenmiştir ($p=0.001$). Son modele göre AG genotipi AA ya göre 3.383 kat daha fazla hastalık riski taşımaktadır ($p=0.026$). Ayrıca GG genotipine sahip olanlarda da hastalık riski anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol bireylerinde hiç GG genotipine rastlanmadığı için OR değeri lojistik regresyon modeli ile hesaplanamamış ancak elle yapılan hesaplamada bu riskin yaklaşık olarak en az 5 kat arttığı yönünde bir sonuç elde edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Survivin -1547 A/G polimorfizmini açısından değerlendirilen bireylerin genotip dağılımları

Genotip	Kontrol (n=45)		Hasta (n=66)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon	
	Sayı	%	Sayı	%		P	OR
AA (referans)	23	71.9	27	45	0.009	1.00	---
AG	9	28.1	27	45		3.383	0.026
GG	0	0	6	10			

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolon kanseri ekonomik açıdan gelişmiş olan toplumlarda sık rastlanan bir kanser türüdür. Kolon kanserinde vakaların %5-10'luk kısmı kalıtsal, geri kalan kısmı sporadik olarak oluşur ⁴⁸.

Kolon kanserlerinin sebebi ve oluşum mekanizması çevresel ve genetik faktörlerle ilişkilidir. Özellikle diyete bağlıdır. Kolon kanseri ile et tüketimi ve hayvansal yağ alımı arasında yakın ilişki vardır.

Apoptozis, nükleoproteinlerin yıkıma uğratıldığı ve ardından hücrenin parçalara ayrıldığı aktif bir enzimatik süreçtir ¹³. Yapılan çalışmalarda özelleşmiş mikromekanizmaların, sinyal yollarının, gen aileleri kaskadlarının içerildiği genetik bir program olduğu anlaşılmıştır ⁷. IAP'ler apoptozisi birçok proteini bağlayabilen çok yönlü protein-protein etkileşim domaini olan BIR domainleri ile inhibe eden protein ailesidir ¹⁶.

Survivin, IAP ailesinin en küçük üyesidir. İn vivo ve in vitro çalışmalar, survivinin hücre ölümünü özellikle apoptozisi inhibe ettiğini göstermiştir. İn vitro, survivinin IL-3 çekilmesi, FAS stimülasyonu, TRAIL, BAX, p53, kaspaz-3,-7 ve -8 in over ekspresyonunu içeren apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik arabulucularının etkisini yok ettiği bulunmuştur ¹⁹.

Han ve arkadaşları survivin -31 G/C, -241 C/T, -625 C/G, -644 C/T ve -1547 A/G polimorfizmlerinin ovaryum kanseri üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda -31 G/C polimorfizminde homozigot C alleli taşıyıcılığının ovaryum kanseri ile ilişkili olabileceğini bulmuşlardır (p=0.058). -241 C/T (p=0.43), -625 C/G (p=0.63) ve -644 C/T (p=0.90) polimorfizmleri ile ovaryum kanseri arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. -1547 A/G polimorfizminde ise homozigot G alleli taşıyıcılığının ovaryum kanseri ile ilişkili olabileceğini bulmuşlardır (p=0.001) ⁴⁷.

Li ve arkadaşları survivin -625 C/G ve -31 G/C polimorfizmlerinin hepatosellüler karsinoma üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edememişlerdir ⁴⁹.

Jaiswal ve arkadaşları survivin -31 G/C, -1547 /G ve -241 C/T polimorfizmlerinin mesane kanseri üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda -31 G/C polimorfizminde homozigot C alleli taşıyıcılığının mesane kanseri riskini 2.6 kat arttırdığını bulmuşlardır. 1547 A/G polimorfizminin mesane kanseri ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (p=0.047). -241 C/T polimorfizminde ise heterozigot allel taşıyıcılığının mesane kanseri ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (p=0.035) [50](#).

Wang ve arkadaşları survivin -31 C/G polimorfizminin üretelyal kanser üzerine ilişkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda homozigot C alleli taşıyıcılığının (OR=4.0) ve heterozigot CG alleli taşıyıcılığının (p=2.8) üretelyal kanser riskini önemli derecede arttırdığını bulmuşlardır. Sigara kullanımının üretelyal kansere yakalanma riskini 3.8 kat arttırdığını göstermişlerdir [51](#).

Kawata ve arkadaşları survivin -31 C/G polimorfizminin mesane kanseri üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda homozigot C alleli taşıyıcılığının mesane kanseri riskini önemli ölçüde arttırdığını bulmuşlardır (p=0.001, OR=1.85) [52](#).

Ma ve arkadaşları survivin -31 C/G polimorfizminin nazofaringal karsinoma üzerine etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları bu çalışma sonucunda homozigot C alleli taşıyıcılığının nazofaringal karsinoma riskini önemli derecede arttırdığını bulmuşlardır (OR=1.40) [53](#).

Srivastava ve arkadaşları survivin -31 G/C polimorfizminin kanser üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda -31G alleli taşıyıcılığı ile karşılaştırıldığında -31C alleli taşıyıcılığının kanser riskini 1.27 kat arttırdığını bulmuşlardır. -31 C/G polimorfizminin özellikle Asya popülasyonunda kanser riski ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir [54](#).

Dai ve arkadaşları survivin -31 G/C, -625 C/G, rs4789551 ve rs1042489 polimorfizmlerinin küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde sağkalım ile ilişkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda lojistik regresyon analizi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edememişlerdir. Fakat Cox Hazard proporsiyon modeli ile -1547 A/G polimorfizminde G alleli taşıyıcılığının (AG/GG) (p=0.043), -625 C/G polimorfizminde ise GG alleli taşıyıcılığının (p=0.008) küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde sağkalım ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır [55](#).

Qin ve arkadaşları survivin -31 C/G polimorfizminin renal hücreli karsinom üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda G alleli taşıyıcılığının (CG, GG)

renal hücre kanseri riskini önemli derecede arttırdığını bulmuşlardır (p=0.006, OR=1.38) ⁵⁶.

Borges ve arkadaşları survivin geninin mide kanseri üzerine etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda G alleli taşıyıcılığının mide kanseri riskini arttırdığını bulmuşlardır (OR=2.22) ⁵⁷.

Andric ve arkadaşları keratosistik odontojenik tümör gelişimi üzerine survivin -31 C/G polimorfizminin etkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda GG alleli taşıyıcılığının tümör gelişiminde risk taşıyabileceğini söylemişlerdir ⁵⁸.

Yazdani ve arkadaşları survivin -31 G/C polimorfizminin papiller tiroid kanseri ile ilişkisini incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda GC ve CC genotipine sahip bireylerin kontrollere göre tiroid kanserine yakalanma riskinin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (p=0.02, OR=1.7) ⁵⁹.

Bayram ve arkadaşları survivin -31 G/C polimorfizminin hepatosellüler karsinoma ile ilişkisini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (p=0.28) ⁶⁰.

Upadhyay ve arkadaşları da survivin -31 G/C polimorfizminin özefagus kanseri ile ilişkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda CC genotipine sahip bireylerin özefagus kanserine yakalanma riskinin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (OR=2.29, p=0.006) ⁶¹.

Jang ve arkadaşları akciğer kanseri ile survivin -644T>C, -625G>C, -31C>G polimorfizmlerinin ilişkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda -31G alleli taşıyıcılığının akciğer kanserini önemli ölçüde arttırdığını bulmuşlardır (p=0.02, OR=0.74) ⁶².

Borbely ve arkadaşları -31 G/C polimorfizminin servikal kanser ile ilişkisini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır ⁶³.

Gazouli ve arkadaşları sporadik kolorektal kanseri ile survivin -31 G/C polimorfizminin ilişkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda -31C alleli ve CC genotipinin hasta bireylerde sağlıklı bireylerden daha fazla olduğunu bulmuşlardır (p=0.0001) ⁶⁴.

Yang ve arkadaşları skuamöz hücreli özefagus kanseri ile survivin -31G/C, -241 C/T, -625 G/C, -644 T/C polimorfizmlerinin ilişkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda

-625CC genotipinin özefagus kanseri riskini önemli derecede arttırdığını bulmuşlardır (OR=2.404) ⁶⁵.

Bizim çalışmamız sonucunda ise; survivin -31C alleli ve -31GC genotipine sahip bireylerin kolon kanserine yakalanma riskinin önemli derecede fazla olduğu bulundu (OR=13.4, OR=5.39). C alleli taşıyıcılığının kolon kanserine yakalanma riskini önemli derecede arttırdığı gözlemlendi.

-241CT genotipine sahip bireylerin kolon kanserine yakalanma riskinin daha yüksek olduğu bulundu (OR=12.0, p=0.0001).

-625 C/G polimorfizmi açısından hasta ve sağlıklı bireyler arasında tek değişkenli analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasına rağmen lojistik regresyon analizi sonucunda anlamlı bir fark bulunamadı.

-1547AG genotipi -1547AA ya göre 3.383 kat daha fazla hastalık riski taşımaktadır (p=0.026). Ayrıca -1547GG genotipine sahip olanlarda da hastalık riski anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p<0.05). Kontrol bireylerinde hiç GG genotipine rastlanmadığı için OR değeri lojistik regresyon modeli ile hesaplanamamış ancak elle yapılan hesaplamada bu riskin yaklaşık olarak en az 5 kat arttığı yönünde bir sonuç elde edilmiştir (p<0.05).

Sonuç olarak survivin -31 G/C, -241 C/T ve -1547 A/G polimorfizmlerinin kolon kanserine yatkınlık oluşturabileceği düşünülebilir. Çalışma ve kontrol grubundaki bireylerin sayısı artırılıp yeni bir çalışma yapıldığında daha net sonuçlar alınabilir.

KAYNAKLAR

1. Harpaz N, Saxena R: Modern Surgical Pathology. In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM. Gastrointestinal Tract, Large Intestine. Vol 1, 1st ed: Saunders, 2003:749-852.
2. Smith, G., Carey, F.A., Beattie, J., Wilkie, M.J.V., Lightfoot, T.j., Coxhead, J., Garner, R.C., Steele, R.J.C., and Wolf, C.R., 2002, "Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer", PNAS, November, Vol. 99, pp. 9433-9438.
3. Rosai J: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. In: Rosai J. Gastrointestinal Tract, Large Bowel. Vol 1. 9 th ed: Mosby, 2004:776-855.
4. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. Mod Pathol. 2003;16(4):376-88.
5. Iannolo, G., Conticello, C., Memeo, L., De Maria, R., 2008. Apoptosis in normal and cancer stem cells. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 66, 42–51.
6. Lorenzo, H.K., Susin, S.A., 2007. Therapeutic potential of AIF-mediated caspaseindependent programmed cell death. Drug Resist. Updates 10, 235–255.
7. Qiao, L., Wong, B.C.Y., 2009. Targetting apoptozis as an approach for gastrointestinal cancer therapy. Drug. Resist. Updates 12, 55-64.
8. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery Nat Rev Cancer 2008;81:61–70.
9. Li F. Survivin study: what is the next wave? J Cell Physiol 2003;1971:8–29.
10. Schrupp DS, Altorki NS. *Principles and practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001.
11. Sullivan J. (2006) In: Cells alive. http://www.cellsalive.com/cell_cycle.htm
12. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. New York; 1983.
13. Kumar V, Abbas A.K, Fausto N, Mitchell R.N. Basic Pathology. Çevikbaş U, Güllüoğlu M, Mete Ö (Editörler). 8. Basım. İstanbul: Özgün Ofset; 2008.
14. Srinivasula S.M., Ashwell J.D. IAPs: What's in a Name? Molecular Cell 30, April 25,2008.

15. Altieri, DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanism. *Biochem. J.* 2010;430:199-205.
16. Mace PD., Shirley S., Day CL. Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins. *Cell Death and Differentiation* 2010;17:46-53.
17. Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, et al. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol.* 2000; 7: 602-608.
18. Ryan B.M., O'Donovan N., Duffy M.J. Survivin: A new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews* (35). 2009; 553-562.
19. Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, et al. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell.* 2001; 104: 791-800.
20. Johnson ME, Howerth EW. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Pathol.* 2004; 41: 599-607.
21. Du C, Fang M, Li L, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000; 102: 33-42.
22. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to an antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000, 102: 43-53
23. İlgi S., Göksen Y., Sayek İ.: Temel Cerrahi. Edit.: Sayek İ. Gastrointestinal Sistem Anatomisi, Kolorektal Polipler ve Polipozis sendromları, Kolorektal Karsinomlar. Cilt 1,2. baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 1991:555-67,816-839.
24. Buğra, D., (2003). Kolonun anatomisi. *Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları*. Ed.: Alemdaroglu, K., Akçal, T., Bugra, D. İstanbul : Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği. s.1-17
25. Uchida, H., Ando, H., Maruyama, K., Kobayashi, H., toda, H., Ogawa, h., Ozawa, T., Matsuda, Y., Sugimura, H., kano, T., and Baba, S., 1998, "Genetic Alterations of Mixed Hyperplastic Adenomatous Polyps in the colon and Rectum", *Jpn. J. Cancer Res.*, March, Vol. 89, pp. 299-306.
26. Crawford JM, Kumar V: Robbins Temel Patoloji. In Çevikbaş U. *Ağız Boşluğu ve Gastrointestinal Sistem* 7.ed, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2003: 563- 590.
27. Alvarez, M.G. and P.C. Besa, Molecular basis of cancer and clinical applications. *Surg Clin North Am*, 2000. 80(2): p. 443-57.

28. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJC. The prognostic significance of K-ras, p53 and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005; April, Vol. 12, pp 586-1590.
29. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ; American Cancer Society. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004;54(1):8
30. Yılmazlar, T., Öztürk, E., (2004). Kolon Kanseri. Kolon & Rektal Cerrahinin El Kitabı. Ed.: Corman ML., Allison SI., Kuehne JP. Çev.Ed.: Alabaz Ö. Adana: Nobel Tıp Kitapevleri. s.423–474.
31. Büyükdoğan M. Kolorektal Kanserde Genetik ve Etyolojik Faktörler. *Selçuk Tıp Derg* 2009;25 (3):171-180.
32. Boyle P, Leon ME. Epidemiology of colorectal cancer. *Br Med Bull.* 2002;64:1-25.
33. Hardy, R.G., Meltzer, S.J., and Jankowski, J.A., 2004, “ABC of colorectal cancer: Molecular basis for risk factors”, *BMJ*, December, Vol. 321, pp. 886-889
34. Houlston, R., S., 2001, “What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer”, *F Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* March, Vol. 54, pp. 206-214.
35. Fenoglio- Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Listrom MB, Rilke FO. Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. In: *Gastrointestinal pathology an atlas and text.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999: 909-1068.
36. Boring C. C, Squires T. S and Tong T. Cancer Statistics. *Cancer J. Clin.* 1993; (43): 7- 10.
37. Jass JR. Diagnostic Histopathology of Tumours. In Fletcher CDM, Livingstone C. *Tumours of the Small and Large Intestines (Including the Anal Region).* Vol 1, second ed: 2000: 369- 409.
38. Bozfakıoğlu Y, Müslümanoğlu M: Cerrahi Gastroenteroloji. Edit: Değerli Ü, Bozfakıoğlu Y. *Kolon Hastalıkları* 4. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1997 142-168.
39. Kuşakçıoğlu Ö. *Kolorektal Kanser Hastalıkları.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2003.
40. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, Rubio CA, Sobin LH, Fogt F, Winawer SJ, Goldgar DE, Jass JR: World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the digestive System.

In Hamilton SR, Aaltenon LA. Tumours of Colon and Rectum. 1 st ed. Lyon, France: IARC Pres; 2000: 103- 143.

41. Gönen Ö. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi, Kolorektal Özel Sayısı. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery* 2004; **9**: 57-65. 101.

42. Figen D. Kolorektal karsinomda sınıflama ve prognostik faktörler. Türk Patoloji Derneği Mezuniyet sonrası Eğitim Toplantısı Gastrointestinal Sistem Patolojisi Günleri, İstanbul. 2005: 47- 56.

43. Ekbom, A., et al., Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*, 1990. 323(18): p. 1228-33.

44. <http://www.cancer.org/Cancer/ColonandRectumCancer/OverviewGuide/colorectal-cancer-overview-what-causes>.

45. Anne B B, Clive A. Colorectal cancer. Clinical review. *BMJ*, 2007; 335: 715-8.

46. Shike, M., et al., Primary prevention of colorectal cancer. The WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bull World Health Organ*, 1990. 68(3): p. 377-85.

47. Chan H. Han, Qingyi Wei, Karen K. Lu, Zhensheng Liu, Gordon B. Mills, Li-E Wang. Polymorphisms in the survivin promoter are associated with age of onset of ovarian cancer. *Int J Clin Exp Med* (2009) 2, 289-299.

48. Stewart BW, Kleihus P, editörler. *World Cancer Report*. Lyon: IARC Press; 2003.

49. Li Y, Wang J, Jiang F, Lin W, Meng W. Association of polymorphisms in survivin gene with the risk of hepatocellular carcinoma in Chinese han population: a case control study. *BMC Medical Genetics* 13:1, 2012.

50. Jaiswal PK, Goel A, Mandhani A, Mittal RD., Functional polymorphisms in promoter survivin gene and its association with susceptibility to bladder cancer in North Indian cohort, *Mol Biol Rep*. 2011.

51. Wang YH, Chiou HY, Lin CT, Hsieh HY, Wu CC, Hsu CD, Shen CH. Association between survivin gene promotör -31 G/C polymorphism and urothelial carcinoma risk in Taiwanese population. *Urology* 73 (3), 2009.

52. Kawata N, Tsuchiya N, Horikawa Y, Inoue T, Tsuruta H, Maita S, Satoh S, Mitobe Y, Narita S, Habuchi T. Two survivin polymorphisms are cooperatively associated with bladder cancer susceptibility. *International Journal of Cancer* 129, 1872-1880; 2011.

53. Ma F, Zhang H, Zhai Y, Huang W, Zhao C, Ou S, Zhou H, Yuan W, Wang Z, Wang H, Yue W, Yu L, Li P, Xia X, Cai M, Zhang Y, Cui Y, He F, Ma Y, Zhou G. Functional Polymorphism -31C/G in the Promoter of BIRC5 Gene and Risk of Nasopharyngeal Carcinoma among Chinese. *Plos One*, 6:2; 2011.
54. Srivatava G, Srivastava A, Mittal B. Survivin promoter -31 G/C (rs9904341) polymorphism and cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* 39: 1509-1516; 2012.
55. Dai J, Jin G, Dong J, Chen Y, Xu Y, Hu Z, Shen H. Prognostic significance of survivin polymorphisms on non-small cell lung cancer survival. *Journal of Thoracic Oncology*; 5:11; 2010.
56. Qin C, Cao Q, Li P, Ju X, Wang M, Chen J, Wu Y, Meng X, Zhu J, Zhang Z, Lu Q, Yin C. Functional promoter -31 G>C variant in survivin gene is associated with risk and progression of renal cell cancer in Chinese population. *Plus One* 7:1; 2012.
57. Borges BN, Burbano RR, Harada ML. Survivin -31 C/G polymorphism and gastric cancer risk in a Brazilian population. *Clin. Exp. Med.* 11:189-193; 2011.
58. Andric M, Nikolic N, Boskovic M, Milicic B, Skodric S, Basta Jovanovic G, Milasin J. Survivin gene promoter polymorphism -31G/C as a risk factor for keratocystic odontogenic tumor development. *Eur. J. Oral. Sci.* 120: 9–13; 2012.
59. Yazdani N, Sayahpour FA, Haghpanah V, Amiri P, Farahani MS, Moradi M, Mirmiran A, Khorsandi MT, Larijani B, Mostaan LV, Amoli MM. Survivin gene polymorphism association with papillary thyroid carcinoma. *Pathology – Research and Practice* 208:100– 103; 2012.
60. Bayram S, Akkız H, Bekar A, Akgöllü E. The association between the survivin -31G/C promoter polymorphism and hepatocellular carcinoma risk in a Turkish population. *Cancer Epidemiol.* 35(6):555-9; 2011.
61. Upadhyay R, Khurana R, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. Role of survivin gene promoter polymorphism (-31G>C) in susceptibility and survival of esophageal cancer in northern India. *Ann. Surg. Oncol.* 18(3):880-7; 2011.
62. Jang JS, Kim KM, Kang KH, Choi JE, Lee WK, Kim CH, Kang YM, Kam S, Kim IS, Jun JE, Jung TH, Park JY. Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer. *Lung Cancer.* 60(1):31-9; 2008.
63. Borbély AA, Murvai M, Szarka K, Kónya J, Gergely L, Hernádi Z, Veress G. Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* 60(3):303-6; 2007.

64. Gazouli M, Tzanakis N, Rallis G, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Kostakis A, Anagnou AP, Nikiteas N. Survivin -31 G/C promoter polymorphism and sporadic colorectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* 24:145-150, 2009.
65. Yang X, Xiong G, Chen X, Xu X, Wang K, Fu Y, Yang K, Bai Y. Polymorphisms of survivin promoter are associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135:1341-1349, 2009.
66. <http://www.google.com.tr/imgres>
67. Alain C. Mita, Monica M. Mita, Steffan T. Nawrocki, et al. Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer Therapeutics. *Clin. Cancer Res.* 2008;14:5000-5005.

ÖZGEÇMİŞ

Nesibe Yamak. 1986 yılında Düzce'de doğdu. 2001 yılında Düzce İsmet Paşa İlköğretim Okulu'ndan mezun oldu. 2005 yılında Düzce Arsal Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde üniversite hayatına başladı. 2009 yılında üniversiteden mezun oldu. 2010 yılında Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrencisi olarak eğitim hayatına devam etmektedir.