



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLON KANSERLİ HASTALARDA FAS VE TRAIL GEN
POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

Merve ATEŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE 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 FAS ve TRAIL Genlerinin Polimorfizmlerinin İncelenmesi”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

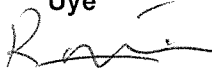
Tarihi: 21/03/2012

TEZ SINAV JÜRİSİ

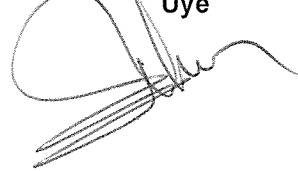


Yrd. Doç. Dr. Kürşat Oğuz YAYKAŞLI
Düzce Üniversitesi
Başkan


Yrd. Doç. Dr. Recep ERÖZ
Düzce Üniversitesi
Üye



Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KAYA
Düzce Üniversitesi
Üye



Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 28 / 03 / 2012 tarih ve 18 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 safhalarda 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 eklediğimi, yine bu tezin çalışılması ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

09.03.2012

Merve Ateş

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, deneysel çalışmalarımı yapabilmem için gerekli olan tüm laboratuvar olanaklarının ve tezim için gerekli hasta örneklerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı başkanı çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Kürşat Oğuz YAYKAŞLI ve Recep ERÖZ'e,

Tezim için gerekli hastaların seçimi, örneklerin sağlanması ile klinik değerlendirmelerindeki destek ve katkılarından dolayı Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi patoloji Anabilim Dalından saygıdeğer hocalarım, Yrd. Doç. Dr.Havva ERDEM ve Murat OKTAY'a,

Ayrıca bu araştırmanın iyi bir şekilde yapılabilmesi için Düzce Üniversitesi Bilimsel araştırma Projesi Komisyon Başkanlığı'nca BAP-2011.04.HD-20 nolu proje olarak desteklenmiştir. BAP ile ilgili konularda gösterdikleri ilgi ve hassasiyetlerinden dolayı Mehmet AYGAN, Zekiye ÖZDAŞ ve Beytullah ÇITIR'a,

Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan aileme, dostlarıma yürekten teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
BEYAN	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
RESİMLER LİSTESİ.....	VIII
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ.....	IX
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. KOLON EPİDEMİYOLOJİSİ.....	5
2.2. KOLON ETİYOLOJİSİ.....	6
2.3. LOKALİZASYON.....	6
2.4. GENETİK DİSPOZİSYON.....	6
2.4.1.Herediter nonpolipozis kolon kanseri sendromları (HNPCC)	
2.4.2.Muir-Torre sendromu	
2.4.3.Ailesel polipozis koli(FAP)	
2.4.4.Gardner sendromu	
2.4.5.Turcot sendromu	
2.4.6.Peutz-Jeghers sendromu	
2.4.7.Cowden sendromu	
2.5. KOLON EMBRİYOLOJİSİ.....	9
2.6. KOLON ANATOMİSİ.....	9
2.7. KOLON HİSTOLOJİSİ.....	10
2.8. ADENOMLAR.....	11
2.9. DİYETE BAĞLI FAKTÖRLER.....	11
2.9.1.Toplam kalori	

2.9.2.	Et,yağ ve protein	
2.9.3.	Fiber	
2.9.4.	Sebze ve meyve	
2.9.5.	Yaşam tarzı	
2.9.6.	Nsaid	
2.9.7.	Obezite	
2.9.8.	Sigara içimi	
2.9.9.	Radyasyon	
2.10.	AİLESEL KOLOREKTAL KARSİNOM.....	13
2.11.	SPORADİK KOLOREKTAL KARSİNOM.....	13
2.12.	TANI	13
2.13.	TARAMA.....	14
2.13.1.	Normal Populasyonda Kolorektal Kanser Taraması.....	15
2.13.2.	Yüksek Riskli Gruplarda Kolorektal Kanser Taraması.....	15
2.14.	ERKEN TANI.....	15
2.15.	MAKROSKOPİK BULGULAR.....	15
2.16.	MİKROSKOPİK BULGULAR.....	16
2.17.	KOLOREKTAL KANSERDE DİĞER HİSTOLOJİK TİPLER.....	16
2.18.	HİSTOLOJİK GRADE	16
2.19.	KOLON KANSERİNDE TÜMÖR YAYILIMI VE EVRELEME.....	17
2.20.	KOLOREKTAL KARSİNOGENEZDE MOLEKÜLER GENETİK DEĞİŞİKLİKLER.....	18
2.21.	APOPTOZİS VE MOLEKÜLER MEKANİZMASI.....	19
2.22.	APOPTOZİS MEKANİZMASI VE HÜCREİÇİ VE DIŞI SİNYAL İLETİMİ.....	19
2.22.1.	Hücre dışı sinyal iletimi.....	19
2.22.2.	Hücre içi sinyal iletimi-mitokondriyal yol.....	21
2.23.	FAS GENİ, ÖZELLEİKLERİ VE APOPTOZİS İLE İLİŞKİSİ.....	22
2.24.	TRAIL GENİ, ÖZELLİKLERİ VE APOPTOZİSİLE İLİŞKİSİ.....	23
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1.	Gereçler.....	25
3.1.1.	Çalışma Populasyonu.....	25

3.1.2.Cihazlar ve Teknik malzemeler.....	25
3.1.3.Sarf malzemeler.....	26
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	27
3.1.4.1.Stok etidyum bromür çözeltisi hazırlanışı.....	27
3.1.4.2.%1.5'lik agaroz jel hazırlanışı.....	27
3.1.4.3.%2'lik agaroz jel hazırlanışı.....	27
3.2.Yöntem.....	27
3.2.1.Parafin dokudan DNA izolasyonu.....	28
3.2.2.Periferik kandan DNA izolasyonu.....	29
3.2.3.DNA saflığı ve derişimin ölçümü.....	29
3.2.4.Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	30
3.2.5.Agaroz Jel Elektroforezi.....	31
3.2.6.RFLP.....	32
3.3.İstatistiksel Analizler.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1.Fas geni için söz konusu bulgular.....	34
4.2.Trail geni için sözkonusu bulgular.....	36
4.3.PZR kontrol ürünlerine ait bulgular.....	37
4.3.1.Fas geni Promotor bölge PZR ürünlerine ait bulgular.....	37
4.3.2.Trail geni Ekzon bölge PZR ürünlerine ait bulgular.....	38
4.4.Kesim ürünlerine ait bulgular.....	39
4.4.1.Fas geni Promotor bölge Kesim ürünlerine ait bulgular.....	39
4.4.2.Trail geni ekzon bölge hasta grupları kesim ürünlerine ait bulgular.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	41
6. KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR LİSTESİ

Tablo1. Ailede kolon kanseri varlığında ve herediter sendromlarda kolon kanseri gelişme riski.

Tablo2: Fas geni -1377 G \ A ve Trail geni +1595 için C \ T için kullanılan primer çiftleri

Tablo 3: Kullanılan PZR şartları.

Tablo 4: Fas ve trail geni ilgili polimorfizmler için optimal amplifikasyonlar

Tablo 5: Fas ve Trail geni SNP'leri için uygun RFLP reaksiyon koşulları

Tablo 6: Çalışma popülasyonunun (toplam, kadın ve erkek) karakteristik özellikleri ve laboratuvar parametrelerinin ve genotiplerinin fas gen polimorfizmi açısından karşılaştırılması

Tablo 7: Sayısal demografik ölçümlere ait tanımlayıcı değerler

Tablo 8: Çalışma popülasyonunun (toplam, kadın ve erkek) karakteristik özellikleri ve laboratuvar parametrelerinin ve genotiplerinin trail gen polimorfizmi açısından karşılaştırılması

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil1.Kolorektal kanserin kolonda yerleşim yerine göre dağılımı (27).

Şekil2.Kolorektal kanserde evreleme; Asler Coller /Dukes (üst) ve TNM (alt) sınıflamalarının şematik görünümü (27).

Şekil3; Fas/Fas-L, TRAIL ve reseptörleri DR4 ve DR5.

Şekil 4. Apoptosisin hücre içi ve dışı yolları. DED (death effector domain)

Şekil 5.fas, fasl ve trail genlerinin genlerinin apoptozisteki rolü(41).

Şekil 6 ; Trail ve reseptörleri (40).

Şekil 7:Apoptosisin major düzenleyicilerinden bazılarının membran yüzeyindeki ligand-reseptör ilişkileri şeklinde gösterimi

Şekil 8. TRAIL ekzon 5'in 3'UTR bölgesinin PCR ürünü ve Rsa I enzim kesimi sonrası verdiği bantların şematik jel görünümü

Şekil 9. FAS geni promotor -1377 bölgesinin PCR ürünü ve BstI enzim kesimi sonrası verdiği bantların şematik jel görünümü

Şekil 10.Çalışma grubunda cinsiyet dağılımı

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Fas promotor bölge PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

Resim 2. Trail ekzon bölge PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

Resim 3. Fas promotor bölge hasta grupları kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

Resim 4. Trail ekzon bölge hasta gruplarının kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

SİMGE VE KISALTMALAR

KRK:	Kolorektal kanser
FADD:	Fas'a bağlı ölüm bölgesi
DD:	Ölüm bölgesi
MS:	Multipl Skleroz
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
SNP:	Tek nükleotid polimorfizmi
SSCP:	Tek iplikli konformasyon polimorfizmi
TNF:	Tümör nekroz faktör
TNFR:	Tümör nekroz faktörü reseptörü
UTR:	Kodlanmayan bölge
Trail:	TNF-ilişkili apoptoz-indükleyici ligand
Fas:	CD95 (APO-1) TNF sitokin ailesinin bir üyesi.
NSAID :	Nonsteroid (steroid olmayan) antiinflatuvar ilaçlar.
Taq polimeraz	: PZR'de Kullanılan DNA Polimeraz Enzimi
dNTP	: Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
TBE	: Tris-Borik asit EDTA
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	: Etidyum Bromid
Mg Cl ₂	: Magnezyum Klorür
SPSS	:(Statistical Packages for theSciences-Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
RNP	: Ribonükleo Protein
bç	: Baz Çifti
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
3'UTR	: 3'kodlanmayan bölge
5'UTR	:5' kodlanmayan bölge
OR	: Risk katsayısı

ÖZET

KOLON KANSERİ HASTALARINDA FAS VE TRAIL GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ

Merve ATEŞ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD

TezDanışmanı Yrd.Doç.Dr.Kürşat Oğuz YAYKAŞLI

Mart 2012

Gelişmiş ülkelerde yaşam sürecinde kolorektal kanser (KRK) gelişimi oranı %5 olup ölüme neden olan kanser türlerinin arasında 2. sırasında yer alır. KRK de aile öyküsü varlığı %25-35 oranında olup, iyi bilinen bir risk faktörüdür. Apoptozis, programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılır. Organizmadaki istenmeyen hücreler apoptozis işlemiyle yok edilerek bu denge muhafaza edilir. Bu çalışmada apoptozisle ilişkili Fas ve Trail genlerindeki polimorfizmlerin kolon kanseri ile ilişkisi incelenmiştir. Fas geni promotor bölge -1377G\A polimorfizmi ile Trail geni ekzon 5 bölge +1595 polimorfizmi bu çalışma kapsamında araştırılmıştır. Bu aşamada ilk olarak kolon kanserli bireylerden parafin doku örnekleri ve sağlıklı bireylerden kan örnekleri alındı. Ve DNA izolasyonu kit kullanılarak yapılmıştır. Hasta ve sağlıklı bireylerden izole edilen bu DNA'larda ilgili polimorfizmlerin incelenmesi için PZR, RFLP yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen bulgular uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Fas promotor bölge -1377 ve Trail ekzon bölge +1595 polimorfizmlerinin kolon kanserinde belirleyici bir nitelik olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmaya 56 kolon kanserli hasta ve 46 sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiştir. Çalışmamız sonuçlarına göre fas promotor -1377 ve trail ekzon +1595 genotipleri ve allel dağılımlarında kolon kanserli hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Hastalarda Fas A>G genotipi (p=0.001) ve Trail C>T genotipi (p=0.015), bunların kontrol gruplarından ve diğer genotiplerden daha sık görülmüştür. Ayrıca Trail ve Fas genotipleri ile cinsiyet, tümör derecesi, tümör tipi, aile hikayesi, sigara ve alkol arasında bir ilişki saptanmamıştır. Bu bulguların, KRK de genetik risk faktörlerinin belirlenmesine klinik anlamda yardımcı olabileceği ve hastalığın moleküler mekanizmasının çözümlenmesine katkı sağlayacak çalışmalara yeni bir bakış açısı getirebileceği düşüncesindeyiz.

Anahtar sözcükler: : kolon kanseri, fas, trail, polimorfizm, RFLP

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF FAS AND TRAIL GENES POLYMORPHISMS IN COLON CANCER PATIENTS

MerveATEŞ

Tıbbi Biology ve Genetik AD

Tez Danışmanı Yrd.Doç.Dr.Kürşat Oğuz YAYKAŞLI

Mart 2012

In developed countries, life in the process of development of colorectal cancer rate is 5%. it is the second leading cause of death from cancer. The presence of family history of colorectal cancer is 25-35% and it is a well-known risk factor. Apoptosis is called as a programmed cell death. The unwanted cells in an organism are eliminated to maintain equilibrium. In this study, fas ve trail genes are associated with apoptosis in their relation with colon cancer were investigated. In this study, a polymorphism of the Trail gene at position 1595 exon 5 and Fas gene at position 1377 promotor region were examined in this study. Firstly paraffin tissue samples were taken from colon cancer individuals and blood samples were taken from healthy individuals. Then DNA was isolated using by kit. These polymorphisms were investigated using PZR-RFLP methods. The findings were evaluated by the appropriate statistical methods. We have examined Fas -1377 and Trail +1595 polymorphisms as a marker of tumour risk and progression in colon cancer. 56 patients with colon cancer and 46 healthy controls were enrolled in this study. According to our results, There were found a significant association in the distribution of Fas -1377 genotypes and Trail +1595 genotypes and their alleles between patients with colon cancer and controls. Fas -1377 AG genotype ($p=0.001$) and Trail +1595 CT ($p=0.015$) genotype in patient were seen more than those in controls and than other genotype. There were no association between sex, tumor grade and type, family history, cigarette and alcohol at Trail or Fas genotypes.

These findings if confirmed would have clinical value in helping to assess the genetic risk and tumour progression for brain tumours thus opening new perspectives for the study of molecular factors underlying the mechanisms of colon cancer.

Key Words: colon cancer,fas,trail,polymorphism,RFLP

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal Kanserler (KRK) dünyada farklı toplumlarda farklı sıklıkta görülen onkolojik bir problem olup sanayileşmiş ülkelerde görülme sıklığı gelişmekte olan ülkelere daha fazladır. Düşük riskli bölgelerden yüksek riskli bölgelere göç edenlerde kolorektal kanser görülme sıklığı artmaktadır.

Kolon kanseri ile ilgili yapılan istatistiksel verilere göre ABD’de kolorektal kanserler; erkeklerde prostat ve akciğer, kadınlarda meme ve akciğer kanserlerinden sonra üçüncü sırada görülmektedir. Yani ABD’de kansere bağlı ölüm sebepleri arasında kolorektal kanser üçüncü sırada yer almaktadır (5). Kolorektal kanserler (KRK) 2005 yılı T.C. Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı verilerine göre kanserler arasında görülme sıklığı açısından 7. sırada yer almaktadır (6). Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı kanser kayıt verilerine göre tüm kanserler içerisindeki KRK görülme oranı erkeklerde %4, kadınlarda ise %3,7 olarak belirlenmiştir (7). Bu tümörlerin etiolojisinde çevresel ve genetik faktörler rol aldığı gibi, bazı kanser öncülü lezyonlar da tümör gelişimine sebep olabilir. Kolorektal kanserlerde klinik bulgular; tümörün lokalizasyonu, makroskopik yapısı ve oluşturduğu komplikasyonlara göre farklılıklar gösterir. Yaklaşık olarak %50’si rektosigmoid bölgede, %30’u sağ kolonda, %20’si ise kolonun diğer kısımlarında gelişir. Kolorektal karsinom için küratif rezeksiyondan sonra 5 yıllık yaşam süresinin %40-60 arasında olduğu belirtilmektedir. Rekürrenslerin %71’i ilk iki yılda, %91’i ise beş yıl içinde meydana gelir (8). Çok genç ve çok yaşlı hastalarda görülen tümörler kötü prognozla ilişkilidir. Gençlerdeki kötü prognoz, tanıdaki gecikme, zeminde ülseratif kolit varlığı, taşlı yüzük hücreli ve müsinöz karsinomların daha sık görülmesi ile ilişkilendirilmiştir. Kadınlardaki prognoz, erkeklere göre daha iyidir. Tümörün lokalizasyonunun prognoz üzerine etkisi tartışmalıdır. Tümör boyutu ve prognoz arasında da belirgin bir ilişki saptanmasına rağmen, bu ilişkinin güvenilir bir belirleyici olmadığı da ileri sürülmüştür. Histopatolojik tip ve farklılaşma derecesi ile prognoz arasında kuvvetli bir ilişki bulunmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar kadınlarda kolon kanserinin aynı yaşta erkeklerle göre daha az sıklıkta görüldüğünü ortaya koymuştur. Hiç doğum yapmamış kadınlarda kolon kanseri gelişme riski, doğum yapmış kadınlara göre daha yüksektir ve hormon replasman tedavisinin de kolon kanseri gelişimini azalttığı düşünülmektedir (9). Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL/APO-2L) TNF sitokin ailesinin bir üyesi olan tip II transmembran proteindir. Tümör hücrelerinde reseptörleri ile etkileşerek apoptotik hücre

ölümünü tetikler. CD95 (APO-1/Fas) TNF sitokin ailesinin diğer bir üyesidir. Fas hücre yüzeyinde eksprese olan tip I transmembran reseptörüdür. Fas ligand ile etkileşerek yine kaspaz yolağı üzerinden apoptozisi tetikler (10).

Bugüne kadar literatürde Trail geninin ekzon 5 bölgesinde tanımlanan +1595 polimorfizminin ve Fas (-1377G\A) polimorfizmlerinin kolon kanseriyle ilişkisine dair bir çalışma literatürde olmadığından söz konusu polimorfizmlerin kolon kanseri ile ilişkili olup olmadığının araştırılmasını planlamaktayız.

2.GENEL BİLGİ

2.1.Kolon epidemiyolojisi

Kolon kanseri gelişmişülkelerde üçüncü sıklıkta görülen kanser tipi olup bütün kanserlerin yaklaşık %9'unu oluşturur (11) . Kolorektal karsinomlar için her yıl tahmin edilen yeni vaka sayısı 150.000'dir. Hayat boyunca kolorektal karsinom gelişme riski yaklaşık % 6'dır. Bu oran erkeklerde kadınlardan daha yüksektir. Ortalama görülme yaşı ise 62 olup kanser gelişme riski 40 yaşından sonra erkek ve kadınlar için artmaktadır (12). Kolorektal kanser 1990 yılında dünya çapındaki ölümlerin 472.000'sinden sorumlu bulunmuş olup kanser kaynaklı ölümlerin dördüncü sebebidir. Kolorektal kanser geniş bir coğrafik alanda gözlenir. En sık Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda, Avustralya gibi endüstri gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Ayrıca, ülke içinde de görülme sıklığı açısından farklı bölgeler mevcuttur. Örneğin Amerika Birleşik Devletlerinde, endüstriyel kuzeydoğuda oran en fazla iken, kırsal güneydoğuda en azdır. Japonya, Polonya gibi düşük riskli bölgelerden Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya gibi yüksek riskli bölgelere göç edenlerde kolon kanser oranları hızlı bir artış göstermektedir. Kolorektal kanser, gelişmişlik ve batılılaşmanın artışıyla çoğalmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri gibi yüksek riskli ülkelerde beyaz ve siyah ırk oranları benzer olmakla beraber Afrika kökenliler, ispanyol ve Hint kökenlilerde hızla artmaktadır (11).

2.2.Kolon etiyojisi

Kolorektal karsinomlar hem çevresel hem de genetik faktörler ile ilişkilidir. Bunun dışında bazı kanser öncülü lezyonlar da, tümör gelişimine sebep olabilir. Adenomlar, kalın bağırsak epitel ve destekleyici stroma içeren benign tümörlerdir. Tek ya da çok sayıda olabilirler. Kanser gelişme sıklığı benzer olmakla birlikte adenomlar, erkeklerde kadınlardan üç kat fazla görülür.

Boyutlarına, makroskopik görünümüne (sesil, pedinküllü, düz), mikroskopik yapısal görünümüne (tübüler, villöz, tübülovillöz) ve displazi derecelerine (hafif, orta, ağır) göre sınıflandırılabilirler. Yetmiş yaş ve üstünde görülme sıklıkları %53-63 arasındadır; elli yaş altında sık görülmezler. Kolondaki tüm adenomların malign potansiyelleri vardır. Adenomların kansere dönüşme riski polibin çapı, sayısı, histolojik tipi ve derecesi ile ilişkilidir (13). Histolojik tiplerine göre kanser gelişme sıklığı villöz adenomda %10-18, tübülovillöz adenomda %6-8, tübüler adenomda %2-3'tür. Bu oran, çapı 1 cm'nin altında olan tübüler adenomlarda % 0.3, tübülovillöz adenomlarda % 1.5, villöz adenomlarda % 2.5 iken; 2 cm'nin üstündeki tübüler adenomlarda % 6.5, tübülovillöz adenomlarda % 11.4, villöz adenomlarda % 17'dir. Adenom sıklığı yüksek olan populasyonlarda kolorektal kanser sıklığı da yaygın olup, bunun tersi de geçerlidir. Kolorektal adenomların yaygınlığı kolorektal karsinomlara göre daha fazladır (14).

2.3.Lokalizasyon

Karsinomların %50'si rektosigmoid bölgededir. Ancak bu özellik azalıyor gibi görünmekte ve giderek proksimale doğru kaymaktadır (13). Düşük riskli ülkelerde kolorektal karsinom çekum ve çıkan kolonda, sol kolondan daha sık oluşurken; yüksek riskli ülkelerde rektosigmoid bölgede görülme oranı daha fazladır.

Sağ kolon karsinomları özellikle kadınlarda yaş ile beraber artmaktadır. Sağ kolon kanserleri, kolon malignitelerinin %33-63,4'ünü oluşturur. 70 yaştan sonra erkek ve kadınlarda baskın olarak proksimal kolon kanserleri görülmektedir (11). Birden fazla odaklı karsinom vakalarının %3-6'sında bulunur (13).

2.4.Genetik dispozisyon

Aile hikayesi yaşam boyu kolorektal kanser riskinin artışında etkin olmakla birlikte artmış risk aile hikayesinin doğasına bağlı olarakta değişir. Ailesel faktörler birinci derece, ikinci derece akraba ya da her ikisi ve kolorektal kanserin başlangıç yaşına bağlı olarak sporadik kolorektal kanser riskine önemli bir şekilde katkıda bulunur. En az birinci derece yakınlarından bir kişide olması riski iki katına çıkarır (15).

2.4.1. Herediter nonpolipozis kolon kanseri sendromları (HNPCC)

Ailesel kolon kanseri sendromlarının bir nevi örneğidir. Otozomal dominanttır. Her yıl tanı konan kolorektal karsinomlarının %10'undan sorumludur. HNPCC iki sendromdan (Lynch family I ve Lynch family II) oluşur.

Lynch I sendromu; otozomal dominant kalıtım, erken başlangıç, başlıca sağ taraf, sıklıkla birden çok, kolon kanseri gösterir.

Lynch II sendromu; Lynch I sendromuna benzer ve ek olarak endometriyum, meme, over, mide kanserleri gibi, kolon dışı kanserlere, eğilim gösterir.

HNPCC için Amsterdam kriterleri tanımlanmıştır. Buna göre:

- Kolorektal kanser en az üç aile üyesinde olmalıdır.
- Üç aile üyesinden birisi, diğer ikisinin birinci derece akrabası olmalıdır.
- Birbirini takip eden en az iki nesil etkilenmiş olmalıdır.
- Etkilenen aile üyesinin en az birinde 50 yaşından önce kolorektal kanser gelişmelidir.
- Kanser tanısı patolojik olarak doğrulanmalıdır.

HNPCC, ailesel polipozis koli sendromundan bes kat fazla görülmektedir. LynchII sendromlu hastaların birinci derece akrabalarında kolon kanser insidansı yedi kat artmıştır. HNPCC hastaları, sporadik kanserli hastalardan daha genç yasta ortaya çıkar ve ortalama yaş erkeklerde 39 iken kadınlarda 37'dir (13).

Tablo1. Ailede kolon kanseri varlığında ve herediter sendromlarda kolon kanseri gelişme riski (FAP:Familyal adenomatöz polipozis, HNPCC: Herediter nonpolipozis kolorektal kanser)(27).

Aile öyküsü	Hayat boyunca kolon kanseri gelişme riski
Ortalama risk (>50 yaş, ailede kolon ca. öyküsü yok)	%5-6
Bir 1.derece yakınında +	2-3 kat
İki 2.derece yakınında + (veya <50 yaş bir 1. derece yakınında +)	3-4 kat
Bir 2.veya 3.derece yakınında +	1,5 kat
FAP	%100
HNPCC	%80

2.4.2.Muir- Torre sendromu

Otozomal dominanttır. Lynch II sendromuna benzer. Kolon kanseri erken yaşta gelişir. Sağ taraf kolon kanseri daha sıktır ve sporadik kolon kanserinden daha iyi prognozu vardır. Bu hastalarda birden fazla deri lezyonu ve iç organ kanserleri gelişir.

2.4.3.Ailesel polipozis koli (FAP)

Otozomal dominant kalıtım gösterir. APC tümör süpresör geninde mutasyon vardır. Sorumlu APC geni 5q21'de lokalizedir. Genellikle hayatın ikinci on yılında görülür. Radyografik ve makroskopik olarak bağırsakta normal mukozanın çok hafif kabarıklıklarından büyük kitlelere kadar değişen polipler vardır. Hastada birkaç polip FAP varlığını göstermez.

En az 100 polip olmalıdır. Tedavi edilmeden bırakılırsa hemen hemen daima kalın bağırsakta bir veya daha fazla karsinom gelişecektir (13).

2.4.4.Gardner sendromu

Otozomal dominant geçişlidir. Kalın bağırsakta adenomatöz poliplerle birlikte kafatası ve mandibulada birden fazla osteomlar, deride birden fazla keratinöz kistler, özellikle fibromatozis olmak üzere yumusak doku neoplazilerinin görüldüğü ailesel bir durumdur. Kalın bağırsak karsinomu gelişim potansiyeli ailesel polipozis kadar yüksektir (64).

2.4.5.Turcot sendromu

Otozomal dominant kalıtım gösterir. Kolorektal adenomatöz poliplerle birlikte genellikle glioblastom tipi beyin tümörleri vardır.

2.4.6.Peutz-Jeghers sendromu

Otozomal dominant bir sendrom olup LKB1 gen mutasyonu sebebiyle oluşur. Ağır derecede adenomatöz poliplerin bazılarında kolorektal kanser gelişebilir. Bu sendromda pankreas, meme, akciğer, kolon, over ve uterus kanser gelişim riski artmıştır(13).

2.4.7.Cowden sendromu

Mukokutanöz lezyonlar (fasial trisilemmoma, akral keratoz ve oral mukozal papillom), kolorektal polipler ve değişik bölgelerde artmış malignite riski ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. 10. kromozomda lokalize PTEN geninde mutasyon vardır(13).

2.5.Kolon embriyolojisi

Bağırsak gelişimi intrauterin hayatın 3. haftasında embriyoda, ön bağırsak (foregut), orta bağırsak (midgut), arka bağırsak (hindgut) olarak farklılaşır (16).

2.6.Kolon anatomisi

İleumun bitiminden anüse kadar uzanan ve ortalama 150 cm uzunluğunda olan kalın bağırsak, sindirim kanalının 1/5'ini oluşturur. Periton içinde ve retroperitoneal alanda karaciğer, dalak, mide, duodenum, ince bağırsak, böbrekler, üreterler ve mesane gibi çok sayıda organla komşuluk gösterir. İnce bağırsaktan farklı olarak çapı daha geniştir. Uzunluğu ise daha kısadır. Bunaek olarak, düzgün bir dış yüzeyi bulunan ince bağırsağın tersine kalınbağırsağın dışyüzü rektum hariç düz degildir.

Kalın bağırsak çekum, çıkan kolon (asendan kolon), transvers kolon, inen kolon (desendan kolon), sigmoid kolon ve rektum olmak üzere bölümlere ayrılmıştır.

Sag iliak fossada intraperitoneal olarak yerlesen çekum, kalın bağırsağın ilk parçasıdır. Uzunluğu ortalama 6 cm, genişliği 7.5-8.5 cm olan çekum, kolonun en geniş kısmıdır.

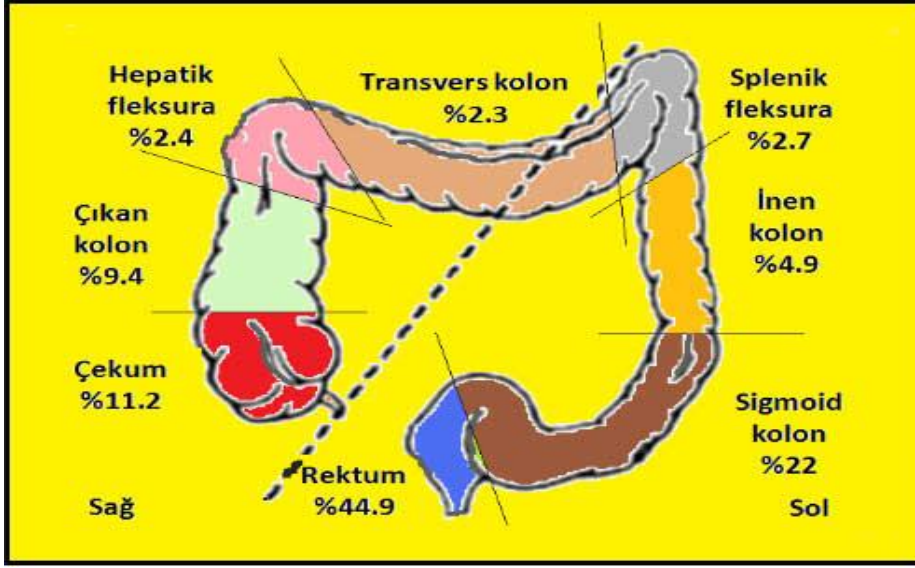
Çıkan kolon, çekumdan karaciğerin sağ lobunun alt yüzüne kadar uzanır ve sola, biraz öne doğru bükülerek burada hepatik fleksurayı yapar. Kolonun bu kısmı duodenum ikinci kıtasının ön yüzünde yer alır. Yaklaşık 15-20 cm uzunluğundadır.

Transvers kolon, hepatik fleksuradan başlar, aşağıya doğru konveks bir kavis yaparak umbilikal ve sol hipokondriyak bölgeyi çaprazlayarak geçer. Dalağın alt ucundan aşağıya doğru bükülerek splenik fleksurayı oluşturur. Ortalama 50 cm uzunluğuyla kolonun en uzun kısmıdır.

İnen kolon, splenik fleksuradan sol iliak fossaya kadar uzanır. Çıkan kolona göre daha derindedir. Ortalama 25 cm uzunluğunda olup, kolonun en dar lümene ve en kalın kas tabakasına sahip olan bölümüdür.

Sigmoid kolon, krsta iliaka hizasında psoas major kasının iç kenarından minör pelvis giriminde başlar; 3. sakral vertebra hizasında rektumda sonlanır.

Rektum, 3. sakral vertebra hizasından başlayıp sakrum eğilimini takip ederek anal kanalla devamlılık gösterir. Sakrumla koksiksin konkavlığına uygun bir eğrilik göstererek aşağıya doğru uzanır. Kalın bağırsaklar inferior ve süperior mezenterik arterden beslenir (17).



Şekil1.Kolorektal kanserin kolonda yerleşim yerine göre dağılımı (27).

2.7.Kolon histolojisi

Çekumdan rektuma kadar olan kolon kısmı hemen hemen aynı histolojik yapıya sahiptir. Mukoza, submukoza, muskularis propriya ve seroza (rektumda perimuskuler doku) olmak üzere başlıca dört tabakadan oluşur. Kalın bağırsağın epitel hücreleri, bezlerin 1/3 alt kısımlarındaki hücrelerin farklılaşması ve proliferasyonu ile yaklaşık her altı günde bir yenilenir. Bu yüksek yenilenme oranını, kanser kemoterapisinde olduğu gibi antimitotik ilaçların verilmesi süratle değiştirir. Bu ilaçlar hücre proliferasyonunu inhibe ederek epitel atrofisini hızlandırır ve sonunda besinlerin yetersiz emilimi, aşırı sıvı kaybı ve diyare ortaya çıkar. Kriptlerdeki Paneth hücrelerinde ise yenilenme çok yavaştır; bu hücrelerin yaşam süresi yaklaşık 30 gündür (18).

2.8.Adenomlar

Benign glandüler neoplaziler olup kolon kanseri gelişiminin habercisi olabilirler. Tek veya birden fazla görülebilirler. Birden fazla olduklarında genetik bir sendrom ile ilişkili olabilirler. Adenomlar erkeklerde kadınlardan daha sık oluşur. Adenom insidansı 60- 70 yaşlarında pik yapar. Sol kolon adenomları genç hastalarda sık görülürken, sağ kolonda lokalize olanlar 65 yaş üstünde daha sıktır. Makroskopik olarak; pediküllü (saplı), sesil (sapsız) ve yassı (deprese) olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Adenomlar yapılarına göre tubüler, villöz veya tubülovillöz olarak ayrılır. Tubüler adenom % 75'den fazla tubüler yapı, villöz adenom % 50'den fazla villöz yapı, tubülovillöz adenom ise % 25- 50 villöz yapı içerir. En sık tubüler adenom görülürken, en az oranda da villöz adenom görülür. Adenomlarda malignite riski boyut, histolojik yapı ve epitel displazisinin derecesine bağlıdır. Tanısal olarak düşük ve yüksek dereceli displazi, karsinoma insitu, intramukozal karsinom ve invaziv karsinomun tespiti önemlidir. Düşük dereceli displazide çok katlı displasti, silindirik epitel hücreleri vardır. Çekirdek iğsi veya ovaldir. Çok katlı çekirdekler epitel yüksekliğinin ¾'ünü geçmezler. Yüksek dereceli displazide epitel yüzeyine kadar gelmiş nükleuslar ve nükleositolazmik oranı artmış hücreler mevcuttur (11).

intraepitelyal karsinoma (karsinoma insitu)'da malign hücreler bazal membrana sınırlıdır. Yüksek dereceli displaziler metastaz yapmazlar. Klinik olarak benign lezyonlardır. Lenfatik kanallar kolon mukozasında yok kabul edilir.

Nadiren lamina propria bazalinde izlenirler. Bundan dolayı intramukozal karsinom malign potansiyeli yok veya çok az kabul edilir (19). Patologlar kronik ve aktif enflamatuvar hastalıkta oluşan reaktif değişiklikleri displaziden ayırmada bazen zorlanmaktadırlar (11,19).

2.9.Diyete bağlı faktörler

2.9.1.Toplam kalori: Obezite ve toplam kalori alımı kolorektal kanser için bağımsız risk faktörleri olduğu kohort ve vaka kontrol çalışmaları gösteriyor. Artmış vücut kitlesi kolorektal ca da iki kat artışla sonuçlanabilir (20).

2.9.2.Et, yağ ve protein: Kırmızı et tüketimi artmış kolorektal kanser ile ilişkili olup kuvvetli bağımsız risk faktörüdür. Yüksek protein alımı karsinogenezi artırabilir fakat kesin kanıt mevcut değildir. Kırmızı etin yağlı elemanları tümör büyümesini artırabilir çünkü yağlar

luminal bakteriler tarafından anormal kolon epitelyum proliferasyonuna neden olabilen karsinojenlere metabolize edilebilir (21).

2.9.3.Fiber : Klasik olarak yüksek fiber diyet düşük kolorektal kanser insidansı ile ilişkili olduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (22).

2.9.4.Sebze ve meyve: Genel olarak sebze ve meyve tüketiminin kolorektal kansere karşı koruyucu etkisi olduğuna inanılır(21).Daha çok çiğ, yeşil ve turpgiller türündeki sebzelerde gözlemlenmiştir. Kalsiyum da koruyucu etkisi olanlara dahil edilmiştir. Kalsiyumun zararlı safra asitlerine bağlanabildiği ve kolonik epitel proliferasyonunu azalttığı görülebilir (21).

2.9.5.Yaşam tarzı: Fiziksel inaktiflik rektal kanserden daha çok kolon kanseri ile ilişkilidir. Mekanizma açık olmamasına rağmen sedanter yaşam tarzı kolorektal ca için artmış bir risk faktörüdür. Alkol ve sigara da artmış kolorektal kanser riski ile ilişkilidir (21).

2.9.6.Nsaid: Çalışmalar Aspirin ve diğer NSAİD ile kolorektal kanser ve adenomlar arasında ters bir ilişki olduğunu kuvvetle desteklemektedir(12). NSAİD kullanım süresi önemli ve sağ kolon kanserleri sol kolondan daha fazla yarar görebilir. İlginç olarak NSAİD türü önemli değildir (23).

2.9.7.Obezite

Özellikle abdominal yağlanma ve artmış vücut kitle indeksi kolon kanseri riskini ve kanserden ölümleri arttırmaktadır. Fazla kilolu ve fiziksel olarak inaktif erkeklerde kolon kanseri gelişimi riski yüksektir (11).

2.9.8.Sigara içimi

Tütün kullanımı rektal kanser ve adenom insidansını önemli ölçüde arttırmaktadır. İlk kullanım yaşının erken olması ve yıllık paket sayısı kanser riskini artırır (11).

2.9.9.Radyasyon

Kolorektal kanserlerin çok az bir kısmında radyasyon etiyolojik bir rol oynar. Servikal, uterus veya prostat karsinomlarının tedavisi için radyoterapi alan hastalarda rektal kanserin daha sık geliştiği bildirilmiştir (11).

2.10.Ailesel kolorektal karsinom

Kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %20-30'u bilinen sendromlardan ayrı olarak genetik eğilim gösterirler. Ailesel kanser sendromlarındaki gibi birinci derece akrabasında kolorektal kanser olanlarda kanser riski artmaktadır. Kanser riski başlangıç yaşı ve tutulan akraba sayısına göre 1.8-8 kat artabilmektedir. Birinci derecede akrabada bir kişide şayet kanser öyküsü varsa risk 1.8 kat, iki veya daha fazla birinci derecedeki akrabalarda kanser öyküsü varsa risk 2.75 kat artmaktadır. 45 yaşından genç olan birinci derece akrabalarda kanser öyküsü varsa KKK riski 5.37 kat artmaktadır (24).

2.11.Sporadik kolorektal karsinom

Düzenli yapılan çalışmalar sonucu, KKK oluşumu ile ilgili bilgiler artmıştır. Normal kolon mukozasından adenomatöz polip ve kanser gelişimi ortalama 10-15 yıl kadar sürmektedir. Bunun için çeşitli mutasyonlar gerekmektedir. Yapılan araştırmalar sonucu kolorektal tümörögeneziste iki genetik yol tanımlanmıştır.

Birinci yol; Adenomatöz poliplerin neredeyse %80'i APC gen mutasyonu sonucu meydana gelmektedir.

İkinci yol; Sporadik KKK' in yaklaşık %15'i alternatif bir yol olan MSI (Mikrosatellit İnstabilite) yolağı ile gelişmektedir. MSI tümörlerinde ortaya çıkan mutasyonlar akkizdir. Mutasyonlar, sapmış hücrel çoğalmaya ve kanser gelişmesine yol açar (5).

2.12.Tanı

KRK'in semptomları kanama, bağırsak alışkanlığında değişiklikler, karın ağrısı, kilo kaybı, iştah değişikliği ve güçsüzlük olup, özellikle obstrüksiyon alarm semptomdur. Bununla birlikte obstrüktif semptomlar hariç diğer semptomlar hastalığın evresinden bağımsızdır ve özellikle tanısız açıdan fikir verici değildir.

Fizik muayene ile ele gelen kitle, rektumda taze kan bulaşığı (genellikle sol kolon kanserlerini) veya melena (sağ kolon kanserlerinde) ve gizli kanama bulgusu olarak gaitada gizli kan saptanabilir. Adenopati, hepatomegali, sarılık ve pulmoner bulgular metastaza bağlı olabilir. Kolon kanserinin yaptığı obstrüksiyon daha çok sol kolon ve sigmoid kolon tutulumunda ortaya çıkmaktadır. Ancak, sağ kolon kanserleri çok daha sinsi seyredirler. Akut

gastrointestinal kanama, akut obstrüksiyon, perforasyon ve uzak organ metastazına bağlı komplikasyonlar görülebilir.

Laboratuvar yöntemleriyle demir eksikliği anemisi, elektrolit dengesizlikleri ve karaciğer fonksiyon bozuklukları saptanabilir. Preoperatif hastaların yaklaşık % 20' sinde CEA düzeyi yükselebilir. Cerrahi sonrası normale gelirse postoperatif takip için oldukça önemli bir belirteçtir. Değerlendirme tam öykü, aile öyküsü, fizik muayene, laboratuvar testleri, kolonoskopi ile yapılmalıdır ve tanı konulduktan sonra metastaz şüphesi varsa, tüm vücut tomografisi çekilmelidir. Tanı ve evrelemede rektum kanserinde endoskopik ultrasonografi de kullanılabilir. Moleküler biyolojik tekniklerin gelişmesi sonucu gaita testleri ve kan testleri ile genomik DNA veya protein izole edilerek genetik tarama yapılmasını sağlayan yöntemlerin gelişmesine olanak sağlayacaktır. Geniş boyutta çalışmalar devam etmektedir. Geniş adenomatöz polipleri veya KRK olduğu bilinen hastalarda sınırlı genetik değişikliklerin aynısı gaita örneklerinde bulunabilir. Gaita aracılı tanılar için ilgi çekici özellik; KRK' lı hastaların yüksek, orta ve düşük riskli olarak sınıflandırılmalarına ve bunların tarama şeklini ve sıklığını belirlemede yardımcı olmasındaki beklentilerdir (5).

2.13.Tarama

Adenomatöz polipler ve KRK' in değişken büyüme davranışı, sıklığının gittikçe artması ve erken tanının sağkalım üzerinde olan etkileri beraber alındığında yoğun tarama yaklaşımları gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Adenomatöz polipler, invaziv kolorektal kanser için iyi tanımlanmış öncül lezyonlardır. Genel popülasyonda adenom gelişme riski % 19 ve bu sporadik poliplerden invaziv kansere dönüşüm oranı %2-5' dir.

En iyi tarama metodu basit, hızlı, hassas, maliyet açısından avantajlı olanıdır. Günümüzde en çok kullanılan tarama yöntemleri rektal tuşe, gaitada gizli kan (GGK), sigmoidoskopi, baryumlu kolon grafisi ve kolonoskopidir (5).

2.13.1.Normal Populasyonda Kolorektal Kanser Taraması

Asemptomatik, aile öyküsü olmayan, 50 yaş üzeri populasyonda yıllık dijital muayene ve GGK, 5 yılda bir fleksible sigmoidoskopi önerilmektedir. Alternatif olarak 10 yılda bir kolonoskopi ve 5-10 yılda bir baryumlu grafi de önerilmektedir.

2.13.2.Yüksek Riskli Gruplarda Kolorektal Kansere Taraması

60 yaşından önce kolon kanseri veya adenomatöz polip tanısı almış birinci derecede akrabası olanlar, herhangi bir yaşta KKK tanısı almış birinci derecede iki akrabası olanlarda ,40 yaşında kolonoskopi taraması yapılması önerilmektedir. Ya da ailede en erken KKK tanısı konulan kişinin tanı yaşından 10 yıl önce kolonoskopi taraması yapılmalı ve her 5 yılda bir tekrarlanmalıdır(25).

2.14.Erken tanı

50 yasından itibaren çoğu kişi kolorektal kanser açısından ortalama risk taşıdığından malignite ve polip açısından düzenli olarak taranmalıdır. Tavsiye edilen tarama yöntemleri şöyledir:

- 1- Senede bir defa gaitada gizli kan testi
- 2- Her bes yılda bir fleksibl sigmoidoskopi
- 3- Senede bir gaitada gizli kan testi ve her bes yılda bir fleksibl sigmoidoskopi.
- 4- Her bes- 10 yılda bir çift kontrastlı baryum enema.
- 5- Her on yılda bir kolonoskopi.

Birinci derece akrabalarında kolorektal kanser veya adenomatöz polip hikayesi olanlarda tarama 40 yaşında veya akrabasının tanı aldığı yaştan 10 yıl önce başlamalıdır. Kolonoskopi ile tüm kolonun değerlendirilmesi gerekmektedir (26).

2.15.Makroskopik bulgular

Küçük karsinomlar 1- 2 cm çapında olup genelde kırmızı, granüler, düğme benzeri mukozadan kabarık lezyonlardır. Sıklıkla keskin sınırlı ve makroskopik olarak adenomlara benzerler (11).

2.16.Mikroskopik bulgular

Kalın bağırsak tümörlerinin %95'i klasik adenokarsinomdur. Bunlar değişik derecede müsin salgılayan iyi, orta ve az gradede diferansiye adenokarsinomdur (9).

2.17.Kolorektal kanserde diğer histolojik tipler

- 1-Müsinöz karsinom: Kolorektal karsinomların %10-15'ini ve rektal kanserlerin %33'ünü oluşturur .
2. Taslı yüzük hücreli karsinom: Genelde genç hastaları tutar. Kolorektal kanserin nadir bir tipidir. Kolorektal kanserlerin yaklaşık %1,1'ini oluşturur. Taslı yüzük hücreli karsinomu olan hastalar, klasik adenokarsinoma göre tanı anında daha yaygın hastalık oluştururlar.
3. Bazaloid (kloakojenik) karsinom: Anal kanaldaki eş değerine benzer. Çok nadirdir.
4. Berrak hücreli karsinom: Spesifik bir tip değildir. Adenokarsinomun minör çeşididir.
5. Hepatoid adenokarsinom: Daha yaygın olan gastrik eşdeğerine benzer. Hepatoselüler karsinomdan ayrılamaz.
6. Medüller adenokarsinom: Genelde kadınlarda, çekum ve sağ kolon yerleşimlidir. Nadir görülür.
7. Anaplastik (iğsi ve dev hücreli sarkomatoid) karsinom: Diğer karsinomlardan ayırt edilmelidir. Görünümü diğer organlardakine benzer. Çok saldırgandır (11).

2.18.Histolojik grade

Adenokarsinomlar bez yapıların varlığı temel alınarak derecelendirilir. Histolojik grade prognostik değer olarak da kullanılır. Kötü diferansiye olanlarda enazından bazı bez yapıları ve müsin üretimi sözkonusudur. Karsinomlar karışık diferansiasyon yapılanması gösterdiğinde derecelendirme en az diferansiye bileşene göre yapılmalıdır.

İyi diferansiye tümörler (Grade I): Tümörün % 75'inden fazlası bez benzeri yapı içerir.

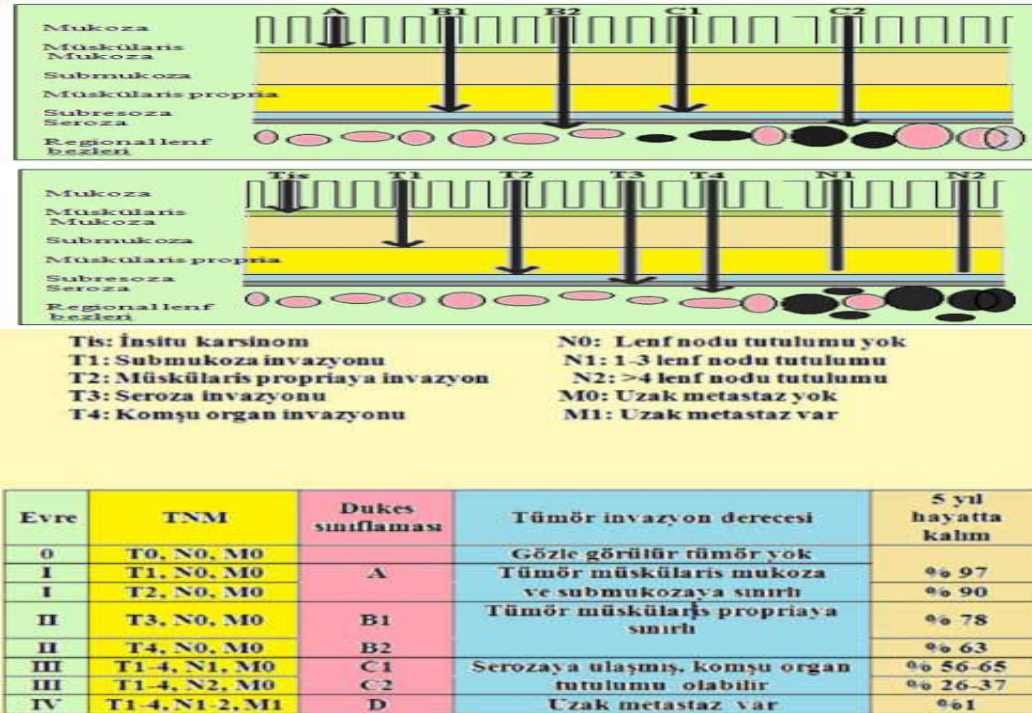
Orta derece diferansiye (Grade II): Tümörde bez benzeri yapı % 25-75 oranındadır.

Kötü diferansiye tümörler (Grade III): Bez benzeri yapı % 25'den azdır (11,12).

2.19.Kolon kanserinde tümör yayılımı (metastaz) ve evreleme

Tüm kolon tümörleri, doğrudan komşu yapılara, lenfatikler ve kan damarları yolu ile uzak organlara yayılabilirler. Metastatik yayılım en sık bölgesel lenf nodları ve karaciğere olur. Diğer sık görülen metastaz bölgeleri; periton, akciğer ve overlerdir. Daha nadir metastaz

bölgeleri santral sinir sistemi, kemik, testis, uterus ve oral kavitedir (19). Kolon kanserleri genellikle intramukozal epitelyal lezyonlar olarak başlarlar (intramukozal karsinom) ve tümörün gelişmesi ile submukozaya ulaşarak invaziv kanser haline gelirler. Bu aşamadan sonra lokal yayılım yanında lenfatik ve hematojen yayılım da ortaya çıkabilir. Lokal yayılımda tümörün bağırsak katları boyunca yayılarak serozaya doğru ilerlemesi sözkonusudur. Serozaya ulaşan tümör komşu organları tutabilir. Komşu organ yayılımı, serozası olmadığından özellikle rektum karsinomlarında daha çok görülür. Lokal yayılım perinöral ve vasküler invazyon sayesinde primer odağın 8-10cm uzağına kadar ilerleyebilir. Kolon kanseri perikolik, intermediate ve ana lenf düğümleri aracılığıyla lenfatik yayılım gösterir. Kötü diferansiye tümörlerde lenfatik yayılım daha sık görülür. Hematojen yayılım en sık portal ven aracılığı ile karaciğerde görülür. Karaciğerdeki metastatik tümörlerin %80 e yakınında primer odak bir kolorektal tümördür.. Kolon kanserinde bir diğer yayılım yolu da implantasyondur. Bu yolla bağırsak içinde ve periton boşluğunda metastazlar meydana gelebilir. Kolon kanserinde yayılım prognoz açısından son derece önemli olduğundan değişik evreleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar içinde Dukes tarafından oluşturulan evreleme sistemi ve TNM sistemi (T:Tümör invazyonu, N:Lenf nodu tutulumu, M:Metastaz) en sık kullanılan sistemlerdir. TNM sistemi aşağıdaki şekilde değerlendirilir.



Şekil2.Kolorektal kanserde evreleme; Asler Coller /Dukes (üst) ve TNM (alt) sınıflamalarının şematik görünümü (27).

2.20.Kolorektal karsinogenezde molekuler genetik değişiklikler

Kolorektal kanser normal dokuda büyümeyi kontrol eden moleküler mekanizmaların bozulmasına yol açan bir seri genetik değişiklerin birikimi sonucunda oluşmaktadır.Karsinogenezde ilk değişiklikler hucre büyümesi ve programlanmış hücre ölümü (apoptozis) arasındaki normal dengeyi etkileyen ve histopatolojik incelemelerle tesbit edilemeyen oldukça hassas olaylardır(28).

2.21.Apoptozis ve Moleküler Mekanizması

Apoptozis kontrollü bir hücre ölüm sekli olup, çok hücreli organizmaların gelişim ve homeostazilerinde merkezi bir rol oynar. Akut doku hasarı ve inflamatuvar cevabı uyaran nekroz ölüm sekline kıyasla apoptozis düzenli bir yol seklinde görülür. Apoptotik hücre ölümü, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve stoplazmik membran parçalanması gibi tipik morfolojik özelliklerle bağlantılıdır. Apoptozisin bozulması, transforme edici mutasyonların toplanmasını kolaylaştırarak, anormal olarak uzayan hücre yaşamına sebep olan karsinogenez mekanizmalardan biri olarak belirtilmektedir (29).

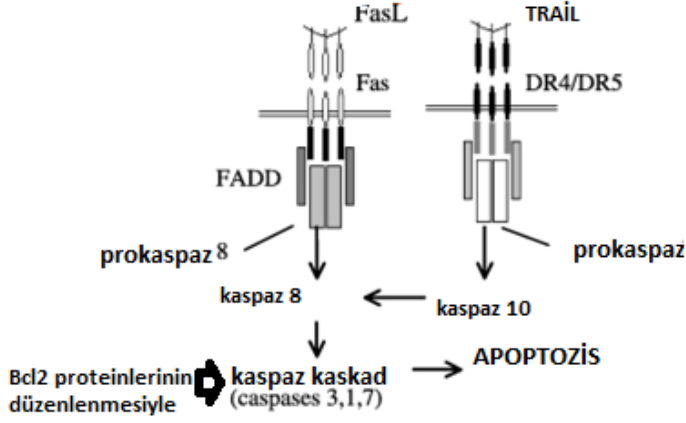
2.22.Apoptozis mekanizması ve hücre içi-hücre dışı sinyal iletimi

Apoptosis öncesi sinyal taşıyan hücre yüzeyinde reseptörler ve bunlara spesifik ligandlar vardır. Bu sekilde hücre dışı apoptosis yolu regüle edilirken hücre içinde de nükleus ve sitoplazmadan kaynaklanan uyarılarla hücre içi apoptosis regülasyonu sağlanır. Bu iki yolun ortak noktası ise kaspaz aktivasyonudur.

2.22.1.Hücre dışı sinyal iletimi

Apoptotik sinyalin dış yolunda tümör nekrosis faktör reseptör (TNF-R) denilen membran reseptörleri bulunmaktadır. Ölüm reseptörleri adı da verilen bu reseptörler hücre içine sinyal taşırlar. Bu reseptör ailesinin üyeleri arasında TRAIL-R1(DR4), TRAIL-R2(DR5), TRAIL-R3, TRAIL-R4, OPG ve Fas vardır. Bu reseptörlerin hücre dışında ligand bağlamak için

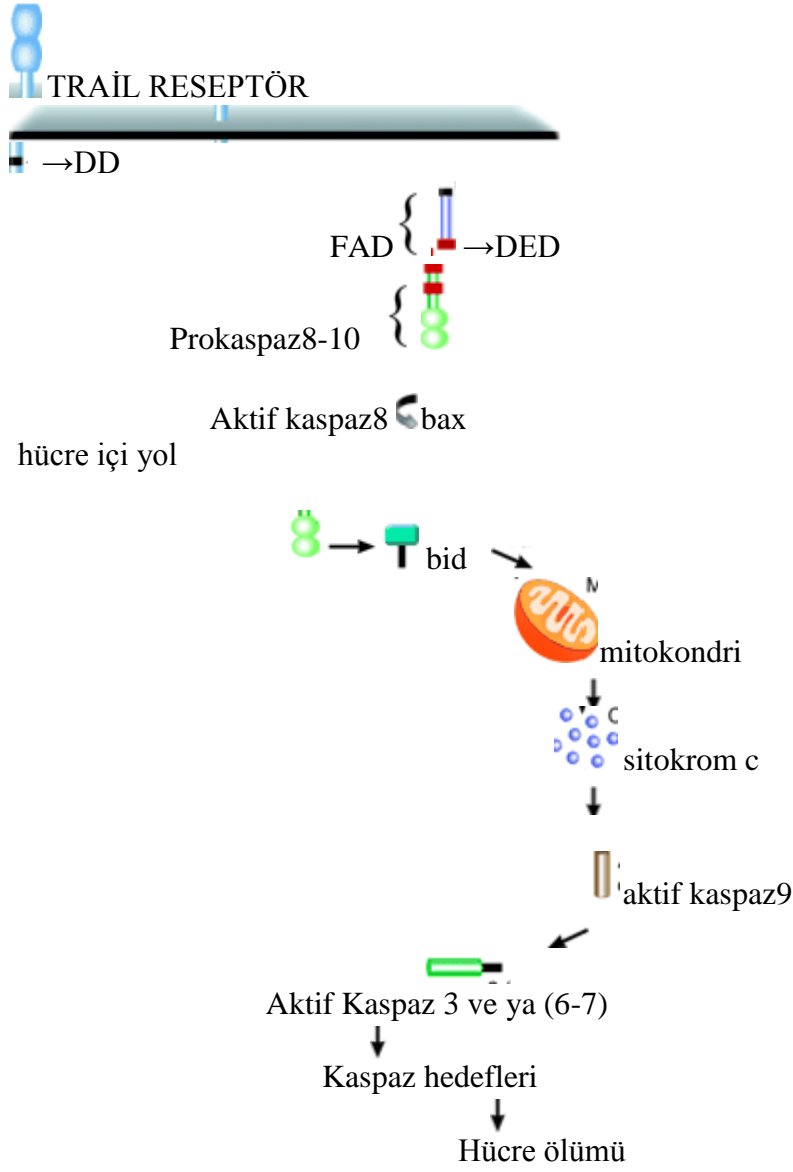
sisteinden zengin bölgeleri ve hücre içinde apoptotik sinyal tasıma için ölüm bölgesi (death domain, DD) bulunmaktadır. OPG ve TRAIL-R3 reseptörlerinin hücre içi ölüm bölgesi yoktur. TRAIL-R4’de inkomplet bir ölüm bölgesi vardır. Bu reseptörlere uygun ligandlar arasında TNF ailesinin üyelerinden Fas ve TRAIL bulunmaktadır (30).



Şekil 3; Fas/Fas-L, TRAIL ve reseptörleri DR4 ve DR5.

Apoptozis hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1), DR- 3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2)’in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmaları) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Ölüm reseptörlerinin ligandları (aktivatörleri) reseptörlerin aktifleşmelerine yol açarlar. Reseptörlerin aktifleşmelerini özgün adaptör proteinler (FADD, TRADD)’in reseptörlere bağlanması takip eder. Bu ise kaspaz sisteminin aktifleşmesine neden olur. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunurlar. İlgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL, tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve “natural killer” hücrelerde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri (“death domain”) adı verilen TRADD (“TNFR-1 associated death domain”) ve FADD (“Fas associated death domain”) ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8’i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar ve böylece apoptozis gerçekleşmiş olur (32).

HÜCRE DIŞI YOL



Sekil 4. Apoptosisin hücre içi ve dışı yolları. DED (death effector domain) .

2.22.2.Hücre içi sinyal iletimi-mitokondriyal yol

Mitokondri hücrenin enerji deposu olmasının yanında sitoplazmaya geçerek ölüm programını aktive eden faktörler salarak apoptoziste büyük rol oynar. Bu faktörlerden en önemlisi sitokrom c dir.Kaspazlar ise, ölüm proteazları caspase (Sistein aspartatik asit proteazlar) olarak bilinen ve birbirleriyle homolog büyük protein ailesidir. Kaspazlar,

proteolitik yarıklanmasıyla aktifleşen, inaktif granüller olarak üretilir Kaspazlar apoptotik yolun cellatlarıdır ve apoptozisdeki karakteristik değişikliklerin en önemli sebebidir (31).

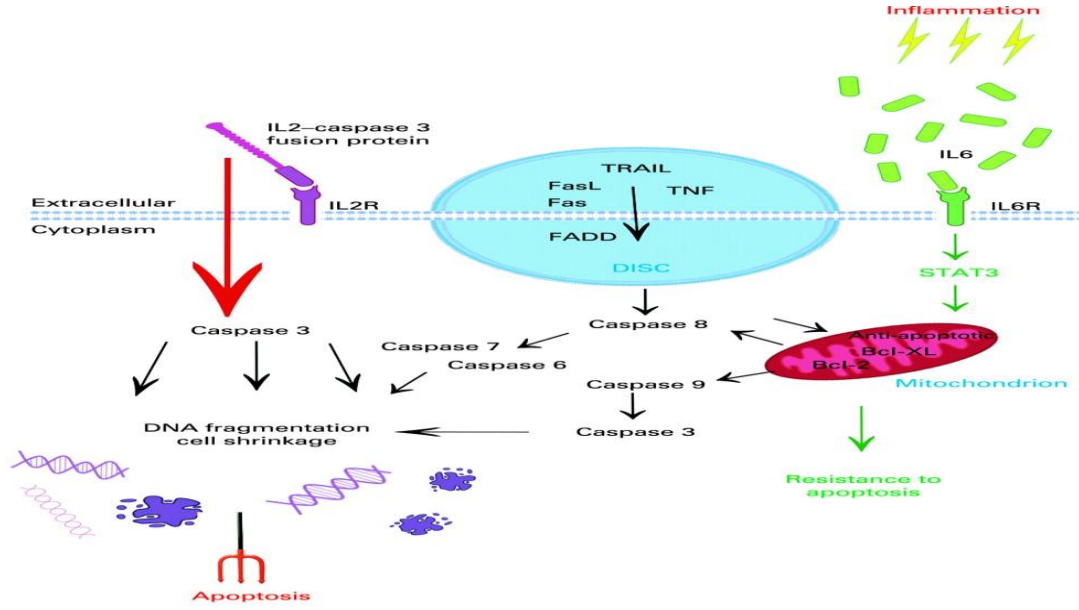
2.23.Fas geni özellikleri ve apoptozis ile ilişkisi

FAS geni 10q24.1. lokalize olmuştur. 9 ekzon 8 intron bölgesi ihtiva eder ve 325 aminoasitlik bir polipeptidi kodlar (33). Fas yani Apo-1 veya CD95 tip I hücre yüzey proteini olup 45-48 kDa büyüklüğünde TNF reseptör süper ailesinin bir üyesidir. 10. kromozomun uzun kolunda bulunur (10q24). 1989 yılında Trauth ve arkadaşları Apo-1 adını verdikleri bu proteinin lenfosit apoptozisini başlattığını buldular. 1992 yılında farelerde bu protein eksikliği gösterildi ve Fas (CD95) olarak adlandırıldı.

Fas ligand (FasL), Fas' ın çapraz bağlantılı formudur. 40 kDa büyüklüğünde tip II membran proteinidir (34). Tam biyolojik aktivitede 26 kDa' lık monomer, proteolitik aktivitede 70kDa' lıkhomotrimer yapıda dolaşımda bulunur. FasL sitoplazmik, nükleer kondensasyon ve DNA fragmentasyonu ile karakterize apoptotik hücre ölümüne yol açan formudur. TipII pnömosit, bronşial epitel hücreleri, makrofaj, T ve B hücrelerinden eksprese edilir. FasL' nin extrasellüler bölgesi Fas (CD95)' a bağlanır ve bu bağlanma aktive edilmiş hücrede Fas ekspresyonunu başlatarak apoptozisi indükler.

FasL ve Fas etkileşimi immün özelliklerin ve önceliğin korunmasında çok önemli rol oynar. Buna ek olarak kanser hücrelerinin bağışıklık sistemine yönelik davranışını da etkiler ve periferal immün toleransın sürdürülmesine yardımcı olur (42).

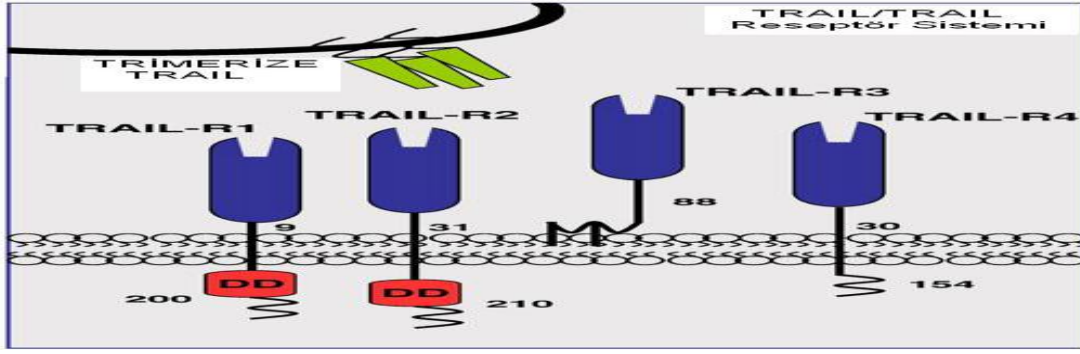
FAS bir hücre yüzeyi reseptörü olarak, birçok hücre tiplerinde apoptotik sinyalde önemli bir rol oynar. Kolon ve akciğer kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde Fas proteinin seviyesi azalmış olarak saptanmıştır. Bu nedenle Fas proteini seviyesinin kolon kanserinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Kanserli hücreler de Fas etkileşimiyle kanserli hücreler apoptozise rezistans geliştirerek immün sistemden kaçır. Buna ilaveten Fas genindeki eşey ve somatik hücre mutasyonları birçok kanser türünün oluşumuna neden olan apoptotik sinyalin azalmasıyla ilişkilidir (3).



Şekil 5.fas, fasl ve trail genlerinin genlerinin apoptozisteki rolü(41).

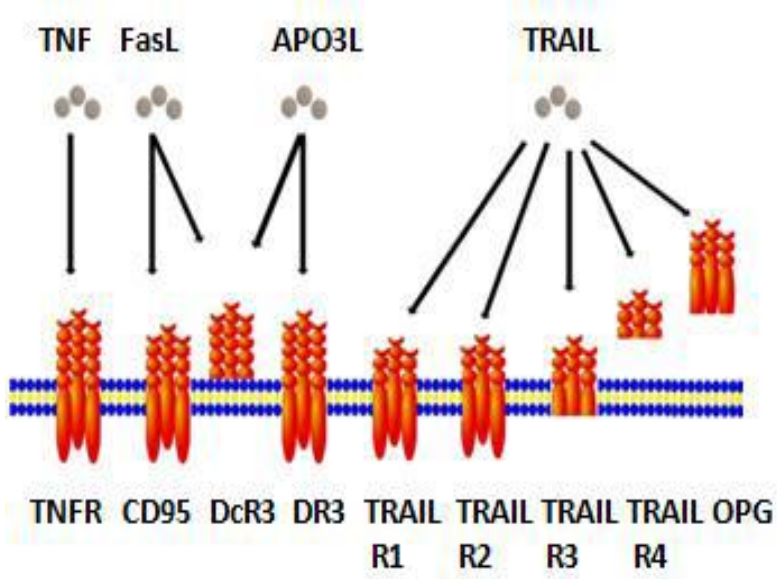
2.24.Trail geni özellikleri ve apoptozis ile ilişkisi

TRAIL geni de yine apoptotik mekanizma için önemli bir tamamlayıcıdır. İnsanlarda 3q26 kromozomun uzun kolunda yer alır ve 5 ekzon içerir (35). TRAIL geni 281 aminoasitlik bir peptidi kodlar (36). TRAIL, tümör hücrelerinde apoptozisi teşvik eder. Aynı zamanda TRAIL geni Tümör Nekroz Faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. TNF ailesinin diğer üyeleri gibi 3 reseptör moleküle bağlanabilmek için homotrimer yapıdadır. Ekspresyonu sıkı düzenlenen diğer TNF ailesi üyelerinin aksine TRAIL aktif hücrelerde geçici olarak ifade olur. TRAIL, tümör hücrelerinde apoptozisi teşvik eder fakat normal hücrelerde bunu yapmaz. TRAIL apoptozisi reseptörlerine etki ederek indükler. Beş tane TRAIL reseptörü vardır. Bunlar; TRAIL R1 (DR4), TRAIL R2 (DR5), TRAIL R3 (DcR1), TRAIL R4 (DcR2) ve osteoprotegerin (OPG)'dir. DR4 ve DR5 korunmuş bir ölüm domain motifini içerir ve proapoptotik reseptörlerdir (37).



Şekil 6 ; Trail ve reseptörleri (40).

Trail genin DR4 ve DR5 reseptörü ile etkileşmesi Trail apoptozis indüklemesinde başlangıç basamağıdır. Trail'in bağlanması ölüm reseptörlerinin trimerizasyonuna ve reseptör aracılı ölüm metabolik yolunun aktivasyonuna öncülük eder. Aktive olmuş ölüm reseptörler Fas ilişkili ölüm domaini (FADD) denilen adaptör proteinini çalıştırır ve aktive eder. FADD'nin ölüm efektör domaini (DED) işe girer ve ölüm indükleyici sinyal kompleksinin (DISC) oluşumuna aracılık eden kaspaz-8'i aktive eder. Tip 1 hücrelerde kaspaz-8'in varlığı, daha sonra apoptoziste son ölüm substratları üzerinde rol oynayan bir veya daha fazla kaspaz efektörlerinin aktivasyonunu arttırmak için yeterlidir (örn: kaspaz-3 veya -7). Fakat tip 2 hücrelerde aktive olmuş kaspaz-8'in küçük bir miktarı kaspaz efektörlerini etkilemeye yetmemesine rağmen aktive olmuş Bid tarafından mitokondri bağımlı bir apoptotik amplifikasyonu tetiklemek için yeterlidir. Bid, mitokondri içerisinde Bax birikimini indükler. Bax, sitokrom c'yi mitokondriden serbest bırakır, kaspaz-3, kaspaz-9 ve kaspaz-7'yi ve son olarak da programlanmış hücre ölümünü aktive eder. Kaspaz-8 tarafından apoptozisin indüklenmesiyle süreç devam eder (38).



Şekil 7. Apoptozisin major düzenleyicilerinden bazılarının membran yüzeyindeki ligand-reseptör ilişkileri şeklinde gösterimi. (Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) TNF ligandına bağlanarak, CD95 reseptörü Fas L (CD95L) ligandına ya da Decoy Receptor 3 (DcR3)'e bağlanarak, APO3L Death Receptor 3 (DR3) ya da Decoy Receptor 3 (DcR3)'e bağlanarak, TRAILR1, TRAILR2 reseptörleri Tumor Necrosis Factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)'e bağlanarak apoptozisi indükler) (39).

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereçler

3.1.1.Çalışma popülasyonu

Bu çalışmaya; Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından KOLON kanseri tanısı konulan 55 hasta ve kolon kanseri dışında başka sebeplerden dolayı opere edilen, kolon kanserli olmayan 45 sağlıklı kontrol grubu dahil edildi. Dokuların tamamı Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarından alındı. Çalışmaya katılacak olgulara çalışma hakkında bilgilendirme yapıldı ve çalışmaya katılım için yazılı onam alındı. Çalışma ve kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş, cinsiyet gibi değerleri de kaydedilmiştir.

3.1.2.Cihazlar ve teknik malzemeler

Bu çalışmada, aşağıda listelenmiş ve Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı bünyesinde bulunan cihazlar ve teknik malzemeler kullanılmıştır.

1. Rotary Mikrotom (LEICA RM2145)
2. Etüv (Heraeus)
3. Su Banyosu (PolyScience)
4. Santrifüj (Heraeus)
5. Mikrosantrifüj (Eppendorf)
6. Vorteks (IKA MS1)
7. Manyetik Karıştırıcı (Fisher Scientific)
8. Hassas Terazi (Boeco)
9. Spektrofotometre (BIO-RAD)
10. PZR cihazı (BIO-RAD)
11. Elektroforez tankı ve güç kaynağı (Cleaver)
12. Termal Cyclers (EPPENDORF)
13. UV jel görüntüleme cihazı (SYNGENE)

14. pH ölçüm cihazı (Seven Easy)
15. Mikrodalga (Vestel)
16. Buzdolabı (Vestel)
17. Otoklav (TOMY SX-500E)
18. Distile su cihazı (TKA-Pacific)
19. Otomatik mikropipetler (Eppendorf)

3.1.3.Sarf malzemeler

1. Borik asit (Sigma)
2. Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma)
3. Tris HCl (Sigma)
4. Tag DNA polimeraz enzimi (5U/μl) (Fermentas)
5. Magnezyum klorür (MgCl₂) (25 mM) (Fermentas)
6. PZR tamponu (10X) (Fermentas)
7. Primerler (100 pmol/μl) (Fermentas)
8. dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (2mM) (Fermentas)
9. Marker DNA (50 bç- 100 bç) (Fermentas)
10. Restriksiyon enzimleri BstUI, AatII, MspI, TaqI (10U/μl) (Fermentas)
11. Etidyum Bromür (EtBr) (10mg/ml) (Sigma)
12. Agaroz (PRONA)
13. Loading Dye (6X) (Fermentas)
14. DNA İzolasyon Kiti (analytikjena blackREP FFPE)
15. Pipet Ucu
16. PZR tüpü
17. Ependorf tüp
18. 10 ×TBE Buffer (Santa Cruz)
19. Etidyum Bromid (Sigma)

3.1.4.Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

3.1.4.1.Stok etidyum bromür çözeltisi hazırlanışı

10 mg etidyum bromür (10mg/ml) 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

3.1.4.2.% 1.5'lik agaroz jel hazırlanışı

1.5 g agaroz tartılarak erlen içine konuldu. Üzerine son hacim 100 ml olacak şekilde 1X TBE eklendi. Mikrodalga fırında kaynatılarak çözündürüldü.

Mikrodalgadan çıkarıldıktan sonra elle tutulabilir sıcaklığa düştüğünde (50-55 °C) çözünen agaroz jel içine son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde stok etidyum bromür (10mg/ml) çözeltisinden etidyum bromür eklendi.

Hazırlanan jel, yatay jel yatağına kuyucukların oluşmasını sağlayan taraklar yerleştirildikten sonra döküldü ve donmaya bırakıldı.

Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı ve örneklerin yüklenmesi için jel hazır hale getirildi.

3.1.4.3.% 2'lik agaroz jel hazırlanışı

2 g agaroz tartılarak erlene konuldu ve son hacim 100 ml olacak şekilde üzerine 1X TBE eklendi. Diğer tüm işlemler % 1.5'lik agaroz jel hazırlanış aşamasındaki protokol takip edilerek gerçekleştirildi.

3.2.Yöntem

Bu araştırma Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvar'ında yapılmıştır. Araştırmaya 55 kolon kanserli ve 45 kontrol dahil edilmiştir.

Bu çalışmada öncelikle kolon kanseri tanısı konmuş hastalara ait parafine gömülü doku örneklerinden tümör doku parçaları 2x5 µ kesitler halinde ependorf tüplerine alınarak numaralandırıldı, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ve Patoloji Anabilim Dalları hasta raporlarından hastalığın oluşumuna ve gelişimine katkısı olduğu düşünülen sosyodemografik bilgiler (yaş, aile öyküsü, sigara alkol kullanımı) alındı. Yine kontrol grubu olarak herhangi bir kanser tanısı konmamış sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinden ve kanser tanısı konmuş doku örneklerinden DNA izolasyonu kit kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen DNA'lardan PZR amplifikasyonu gerçekleştirildi ve agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonun olup olmadığı kontrol edildi. PZR ürünleri parça uzunluk kesim polimorfizmi (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism) reaksiyonuna tabi tutularak agaroz jelde yürütüldü. Jel üzerindeki bantlara bakılarak polimorfizm olup olmadığı belirlendi. Elde edilen sonuçların istatistiksel verileri, SPSS 15.0 programında Pearson Ki-kare ve lojistik regresyon analizi ile belirlendi.

3.2.1.Parafin dokudan DNA izolasyonu

Kolon kanserli hastalara ve kontrol grubu bireylere ait dokulardan DNA izole edildi. Parafine gömülü dokulardan DNA izolasyonu için DNA izolasyon kiti (analytikjena blackREP FFPE) kullanılarak aşağıdaki protokol aşamaları uygulandı.

Parafine gömülü dokulardan mikrotom ile yaklaşık olarak 2x5 µ boyutlarında kesit alınarak ependorf tüpüne konuldu.

- 1- Alınan kesitler üzerine 400 µl liziz solüsyonu ve 25µl proteinaz K eklenerek bu karışım 5 saniye vortekslendi. 50 °C'de 1 saat ve 90 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından maksimum hızda (13.000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.
- 2- Santrifüj sonrası karışımın üst kısmı 1,5 ml'lik tüpe alınarak üzerine 200 µl bağlama solüsyonu eklenerek vortekslendi. Farklı bir tüpe spin filtre takıldı ve karışım bu tüpe alındı. Daha sonra yaklaşık 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- 3- Karışımın üzerine 700 µl yıkama solüsyonu eklenerek yaklaşık 12.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Aynı işlem iki kez tekrarlandı.
- 4- Tüpten filtre çıkarılarak yeni bir tüpe alındı. Maksimum hızda (13.000 rpm) 1 dk. santrifüj edildi.
- 5- Daha sonra filtre çıkarılarak elüsyon tüpüne alındı ve 100 µl elüsyon tamponu eklendi. 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Ardından filtre çıkarılarak atıldı. Elde edilen DNA, 20 °C'de saklandı.

3.2.2.Periferik Kandan DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu, PureLink™ Genomik DNA İzolasyon kiti (Invitrogen) kullanılarak aşağıdaki gibi yapıldı.

1. 200 µL kan örneği eppendorf tüpe alındı.
2. 20 µL Proteinaz K eklendi.
3. 20 µL RNase eklendi. Vorteks yapıldı ve 2 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
4. 200 µl Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve vorteks yapıldı.
5. 55°'de 10 dk. inkübasyona bırakıldı.
6. 200 µL %96-100'lük ethanol eklendi ve 5sn. vortekslendi.
7. Karışım filtreli tüpe alındı.
8. 1200 rpm'de 1 dk. oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.
9. Filtreli kısım başka bir tüpe alındı.
10. 500 µL Wash Buffer 1 eklendi.
11. 1200 rpm'de 1 dk. oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.
12. Filtreli kısım başka bir tüpe alındı.
13. 500 µL Wash Buffer 2 eklendi.
14. Oda sıcaklığında max. hızda 1 dakika santrifüj yapıldı.
15. Filtreli kısım 1,5'lik eppendorf tüpe alındı.
16. 100 µL Genomic Elution Buffer eklendi.
17. Oda sıcaklığında 1 dk. inkübasyona bırakıldı.
- 18.En yüksek hızda oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj yapıldı

3.2.3.DNA saflığı ve derişiminin ölçümü

Stok DNA tüpünden 1 µl örnek alındı spektrofotometre küvetine aktarıldı. Üzerine 99 µl distile su eklendi.

1.Örneğin spektrofotometrede 260 ve 280 nm UV dalgaboyunda absorpsiyon değerleri okundu.

2.DNA miktarı formüle göre hesaplandı:

$$\text{Konsantrasyon} = 100 (\text{Sulandırma}) \times 50 (\text{sabit}) \times \text{OD } 260 = \text{ng}/\mu\text{l DNA}$$

$$\text{OD } 260/280 > 2 \text{ ng}/\mu\text{l RNA}, < 1.8 \text{ ng}/\mu\text{l protein kontaminasyonu olarak değerlendirildi.}$$

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çalışmamızda PZR çalışmamız amacıyla fas geni -1377 polimorfizmi F: 5'-TGTGTGCACAAGGCTGGCGC-3' R: 5'-TGCATCTGTCACTGCACTTACCACCA-3' primerleri kullanılarak, trail geni ekzon 5 bölgesinde tanımlanan +1595 polimorfizmi F 5'-TGAGCACTACAGCAAACATGA -3' R 5'-GCACCACTAAAAGATCGCAGT -3' primerleri kullanıldı. Kullanılan primerlerin baz değişimi ve baz büyüklükleri tablodaki gibidir.

Tablo2: Fas geni -1377 G \ A ve Trail geni +1595 için C \ T için kullanılan primer çiftleri

Genler	Pozisyon ve baz değişimi	Primerler	Enzimler	Uzunluk (bp)	Sıcaklık (°C)
TRAIL	+1595 ekzon 5 C \ T rs1131580	FP 5'-TGAGCACTACAGCAAACATGA -3' RP 5'-GCACCACTAAAAGATCGCAGT -3'	<i>RsaI</i>	391	37
FAS	-1377 G \ A rs2234767	F: 5'-TGTGTGCACAAGGCTGGCGC-3' R: 5'-TGCATCTGTCACTGCACTTACCACCA-3'	<i>Bstul</i>	122	61

Tablo 3: Kullanılan PZR şartları.

SNP	DNA (150-200ng)	PZR tamponu (10X)	Primerler (F ve R) (10 pmol)	MgCl ₂ (25mM)	dNTP (2mM)	Taq DNA polimeraz (5U/μl)	dH ₂ O	Toplam hacim
Fas 1377	2	3	1+1	1.2	3	0.5	13.3	25
Trail 1595	2	3	1+!	1.2	3	0.5	13.3	25

PZR aşamasında; 1.2 μl MgCl₂ (25mM), 3 μl dNTP (2mM), her bir primerden (10 pmol/μl) 1'er μl, 3 μl PZR tampon (10X), 0,5 μl Taq DNA polimeraz (5U/μl), 2 μl saflaştırılan

genomik DNA (150-200ng) ve toplam hacim 25 µl olacak şekilde dH₂O eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Optimal amplifikasyonların gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri aşağıdaki tablodaki gibidir.

Tablo 4: Fas ve trail geni ilgili polimorfizmler için optimal amplifikasyonlar

SNP	Ön Denatürasyon Aşaması (1 döngü)	Tepkime Döngüsü (35 Döngü)			Son sentez Aşaması (1 döngü)
		Denatürasyon Aşaması	Hibridizasyon Aşaması	Sentez (uzama) Aşaması	
Fas -1377 G/A	95°C' de 5 dk	95 °C'de 30 sn	65°C'de 30 sn	72°C'de 30 sn	72°C'de 10 dk
Trail +1595 C/T	95°C'de 5 dk	95 °C'de 30 sn	61 °C'de 30 sn	72 °C'de 45 sn	72°C'de 10 dk

Yapılan PZR işlemi sonucunda elde edilen PZR ürünleri % 1.5'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

3.2.5. Agaroz jel elektroforezi

Elde edilen PZR ürünlerini değerlendirmek amacıyla %2'lik agaroz (A 9539-500G, Sigma) jele yüklendi. Agaroz jel için 10X TBE (Santa Cruz) stok tamponu 1/10 oranında sulandırılarak 1X TBE tamponu hazırlandı. 2 gram agaroz, 100 mL 1X TBE tamponuna ilave edilip mikrodalga fırında çözününceye kadar ısıtıldı. Çözelti yaklaşık 50-60 °C'a kadar soğutulduktan sonra uygun miktarda Et-Br (10 µg/ml Ethidium bromür) ilave edildi. Agaroz çözeltisi jel kaseti içine dökülerek taraklar yerleştirildi ve donması için 20-30 dakika beklenildi. 12 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme boyası (6X Loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 150 V elektrik akımında yaklaşık 30 dakika yürütüldü ve jel UV illüminatörde (304 nm dalga boyunda) bakılarak değerlendirildi.

Değerlendirme sonucunda Fas -1377 polimorfizmi içeren 122 (bç) büyüklüğünde ve Trail +1595 polimorfizmini içeren 491 (bç) büyüklüğünde bantlar gözlemlendi.

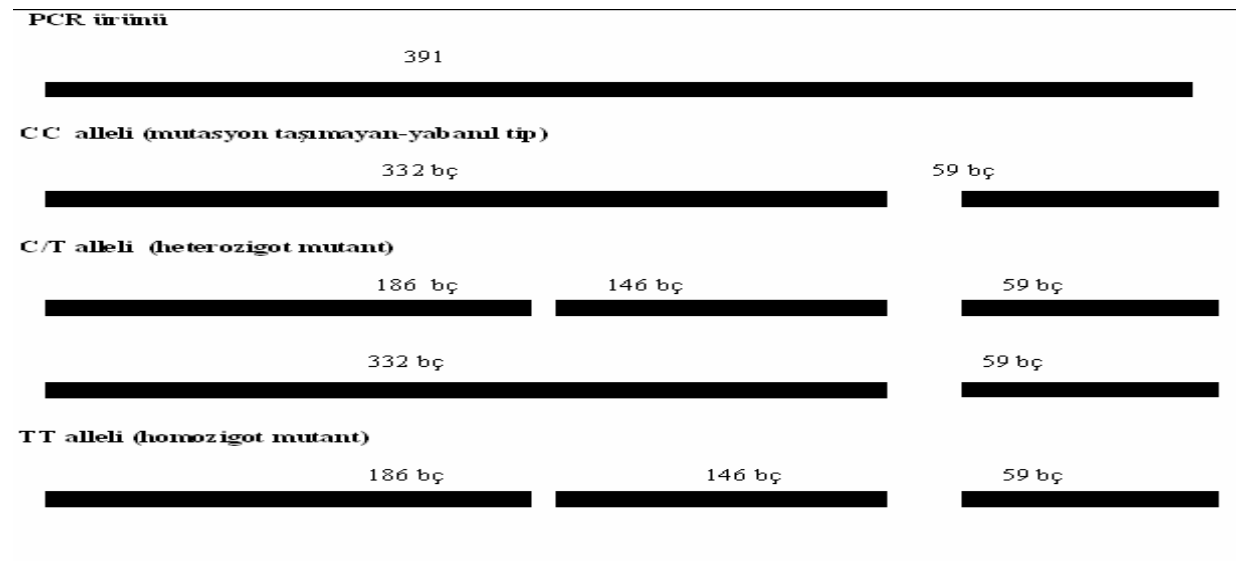
3.2.6.RFLP

Agaroz je elektorforezi ile amplikasyonları tamamlandığından emin olduğumuz dna örnekleri her bir polimorfizm bölgesine spesifik olan restriksiyon enzileri ile kesildi. Enzimle kesim yani RFLP işlemi sırasında her bir enzim kendi spesifik bileşimi ve sıcaklığına göre muamele olundu. Reaksiyonun bileşenleri tablodaki gibidir.

Tablo 5: Fas ve Trail geni SNP'leri için uygun RFLP reaksiyon koşulları

Gen-SNP- Enzim	Tampon (10X)	Restriksiyon Enzimi (10U/ μ l)	PZR Ürünü (0.2 μ g/30 μ l)	dH ₂ O	Toplam Hacim (μ l)	Reaksiyon Süresi	
Fas BstI	-1377	2 μ l	1 μ l	10 μ l	17 μ l	30 μ l	61°C, 5dk.
Trail Rsa I	+1595	2 μ l	1 μ l	10 μ l	17 μ l	30 μ l	65°C, 5dk.

Reaksiyon ürünleri % 2'lik agaroz jele yüklenerek 100 volt'luk akımda 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elde edilen kesim ürünlerine ait elektroforez sonuçları UV görüntüleme cihazı ile görüntülenerek değerlendirildi. Her bir enzim bölgesi özellikleri ve o bölgelere özgü elde edilen parça büyüklükleri tabloda gösterilmiştir.



Sekil 8. TRAIL ekzon 5'in 3'UTR bölgesinin PZR ürünü ve Rsa I enzim kesimi sonrası verdiği bantların sematik jel görünümü

PCR ürünü

122 bç



GG alleli (mutasyon taşımayan yabani tip)

122 bç



G/A alleli (heterozigot mutant)

122 bç



108 bç



14 bç



AA alleli (homozigot mutant)

108 bç



14 bç



Sekil 9. FAS geni promotor -1377 bölgesinin PZR ürünü ve BstI enzimi kesimi sonrası verdiği bantların sematik jel görünümü

3.3. İSTATİKSEL ANALİZLER

Çalışmamızda kullanılan verilerin ortalama \pm standart sapma ve % sıklığı değerlerini bulmak için SPSS 15.0 for Windows istatistik paket programı kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1.Fas geni için söz konusu bulgular

Çalışmamızda kolorektal kanser tanısı konmuş hastaların parafine gömülü doku örnekleri Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir. Bu şekilde elde edilen 54 kolon kanseri tanısı konmuş hasta parafin doku örneklerinden 23' ü kadın (%42.6), 31' inin erkek (%57.4) olduğu tespit edilmiştir. Olguların yaşları 23 ile 89 arasında olup ortalama yaş 66.27 ± 14.17 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu ise herhangi bir kanser tanısı konmamış bireylerden alınan kan örneklerinden temin edilmiştir. Söz konusu kontrol grubu 28 kadın 18 erkek olmak üzere 46 kişiden oluşmaktadır. Kolon kanseri olgularının cinsiyete göre dağılımı aşağıdaki grafikte verilmiştir.



Şekil 10.Çalışma grubunda cinsiyet dağılımı

Çalışmaya katılacak olgulara çalışma hakkında bilgilendirme yapıldı ve çalışmaya katılım için yazılı onam alındı. Çalışma ve kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş, cinsiyet ♀, sigara, alkol, tümör derecesi, tümör tipi ve aile hikayesi verileri kaydedildi.Bu özellikler tablo' 6 da belirtilmiştir.

Tablo 6: Çalışma popülasyonunun (toplam, kadın ve erkek) karakteristik özellikleri ve laboratuvar parametrelerinin ve genotiplerinin fas gen polimorfizmi açısından karşılaştırılması

Özellikler	Kontrol (n=46)		Hasta (n=54)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon		
	Sayı	%	Sayı	%	P	OR	P	
Cinsiyet	K (referans)	28	60.9	23	42.6	0.068	1.00	---
	E	18	39.1	31	57.4		4.4	0.061
Tümör Derecesi	Düşük	--	--	6	15		---	---
	Orta	--	--	26	65		---	---
	Yüksek	--	--	8	20		---	---
Tümör tipi	Adenokarsinom	--	--	45	91.8		---	---
	Karsinom	--	--	1	2		---	---
	Taşlyüzük	--	--	2	4		---	---
Aile hikayesi	Adenom	--	--	1	2		---	---
	Yok (referans)	--	--	41	77.4		1.00	---
	Var	--	--	12	22.6		4.98	0.178
Sigara	Yok (referans)	30	83.3	43	81.1	0.791	1.00	---
	Var	6	16.7	10	18.9		0.91	0.929
Alkol	Yok	36	100	51	94.4	0.150	---	---
	Var	0	0	3	5.6		---	---
Genotip	AA (referans)	21	44.7	4	7.3		1.00	---
	AG	17	36.2	15	27.3	0.0001	1.81	0.560
	GG	9	19.1	36	65.5		19.42	0.005

Yukarıdaki tabloya göre tek değişkenli analizde GG alleli p değeri 0.005 olarak çıkmıştır. Bu da GG homozigot allelinin istatistiksel olarak kolon kanserinde etkili olabileceği söylenebilir. Yine yaşın kolon kanserinde etkisi tek değişkenli analizde istatistiksel ölçümü aşağıdaki tablo7' deki gibidir.

Tablo 7. Sayısal demografik ölçümlere ait tanımlayıcı değerler

Özellikler	Kontrol (n=46)		Hasta (n=54)		Tek değişkenli analizler
	Ort±SD	Min-Max	Ort±SD	Min-Max	P
Yaş	51.36±10.61	31-78	66.27±14.17	23-89	0.0001

Kolon kanseri olan hasta grubu ve kanser tanısı konmamış kontrol grupları üzerinde yapılan istatistiksel analizlerde alkol, sigara, tumor tipi, tumor derecesi, aile hikayesi, cinsiyet parametreleri açısından anlamlı çıkmamıştır. Yaş parametresi ($p=0.0001$) ve genotipler açısından ise GG ($p=0.005$) alleli istatistiksel açıdan oldukça anlamlı çıkmıştır.

4.2.Trail geni için söz konusu bulgular

Çalışmamızda kolorektal kanser tanısı konmuş hastaların parafine gömülü doku örnekleri Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir. Bu şekilde elde edilen 56 kolon kanseri tanısı konmuş hasta parafin doku örneklerinden 24' ü kadın (%42.9), 32' inin erkek (%57.1) olduğu tespit edilmiştir. Olguların yaşları 31 ile 83 arasında olup ortalama yaş 57 ± 14.17 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu ise herhangi bir kanser tanısı konmamış bireylerden alınan kan örneklerinden temin edilmiştir. Söz konusu kontrol grubu 26 kadın 18 erkek olmak üzere 44 kişiden oluşmaktadır.

Tablo 8: Çalışma popülasyonunun (toplam, kadın ve erkek) karakteristik özellikleri ve laboratuvar parametrelerinin ve genotiplerinin trail gen polimorfizmi açısından karşılaştırılması

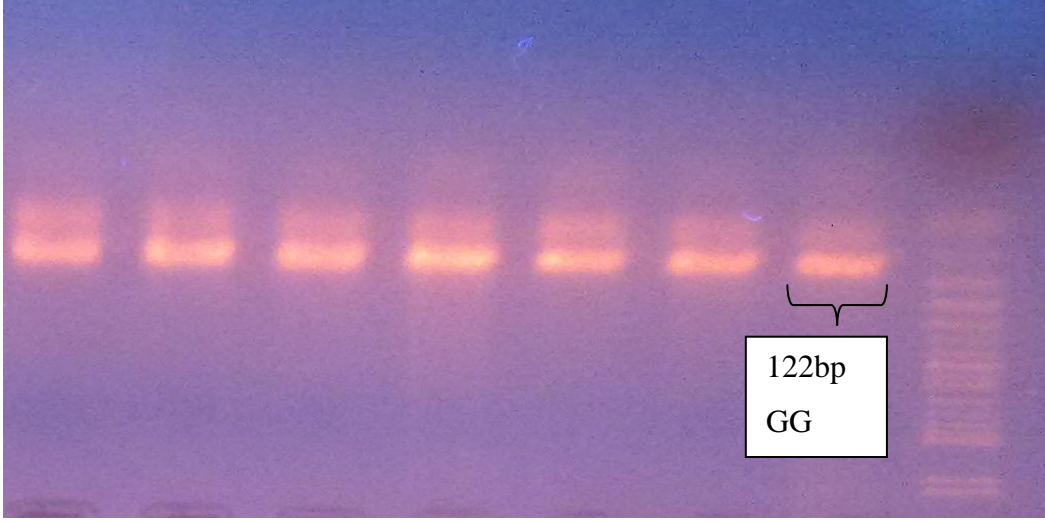
Özellikler	Kontrol (n=44)		Hasta (n=56)		Tek değişkenli analizler	Lojistik regresyon		
	Sayı	%	Sayı	%	P	OR	P	
Cinsiyet	K (referans)	26	59.1	24	42.9	0.107	1.00	---
	E	18	40.9	32	57.1		2.072	0.173
Tümör Derecesi	Düşük	--	--	6	14		---	---
	Orta	--	--	30	69.8		---	---
	Yüksek	--	--	43	16.3		---	---
Tümör tipi	Adenokarsinom	--	--	46	90.2		---	---
	Karsinom	--	--	3	5.9		---	---
	Taşlyüzük	--	--	1	2		---	---
Aile hikayesi	Adenom	--	--	1	2		---	---
	Yok (referans)	--	--	39	76.5		---	---
	Var	--	--	12	23.5		---	---
Sigara	Yok (referans)	28	84.8	45	84.9	0.994	---	---
	Var	5	15.2	8	15.1		---	---
Alkol	Yok	33	100	49	94.2	0.160	---	---
	Var	0	0	3	5.8		---	---
Genotip	CC (referans)	26	57.8	18	32.1		2.00	---
	CT	13	28.9	32	57.1	0.015	1	0.50
	TT	6	13.3	6	10.7		1	0.351

Tablo 8 e göre Trail geni CT alleli p değeri 0.015 olarak çıkmıştır. Bu da bu allelin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir. Diğer verilerin hiçbiri istatistiksel açıdan anlamlı bulunamamıştır.

4.3. PZR KONTROL ÜRÜNLERİNE AİT BULGULAR

4.3.1. Fas Geni Promotor Bölge PZR Ürünlerine Ait Bulgular

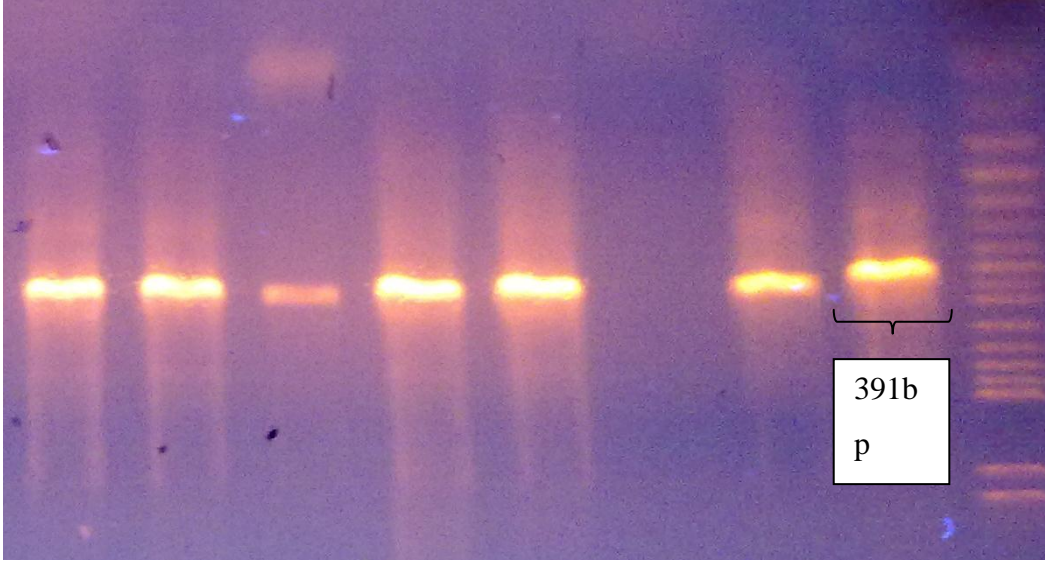
Fas geni promotor bölgesinin polimorfizmine ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde promotor polimorfizminin tespiti için 122 bç'lik özgül PZR ürününe ait bantlar elde edildiği gözlemlendi (resim1).



Resim 1: Fas promotor bölge PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

4.3.2. Trail Geni Ekzon Bölge PZR Ürünlerine Ait Bulgular

Trail geni ekzon bölgesinin polimorfizmine ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde promotor polimorfizminin tespiti için 391 bç'lik özgül PZR ürününe ait bantlar elde edildiği gözlemlendi (resim2).

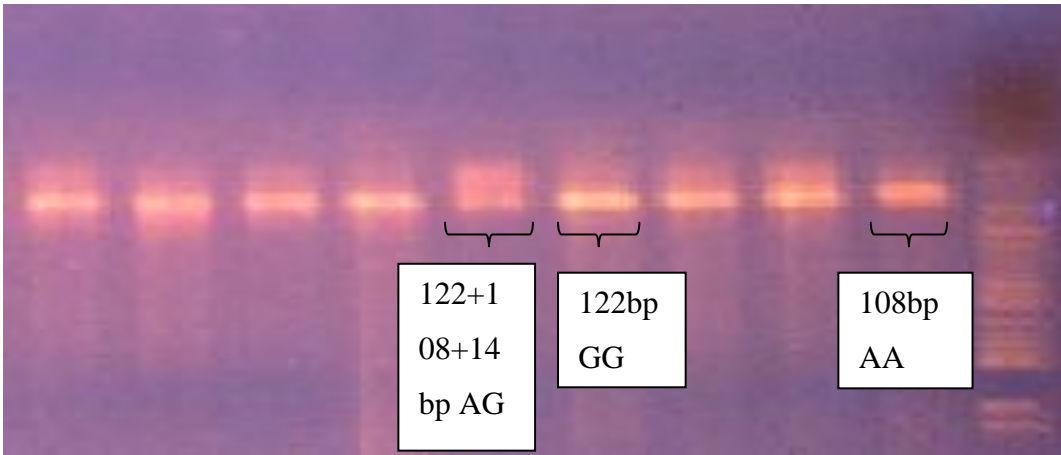


Resim 2. Trail ekzon bölge PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

4.4.KESİM ÜRÜNLERİNE AİT BULGULAR:

4.4.1. Fas Geni Promotor Bölge Kesim Ürünlerine Ait Bulgular

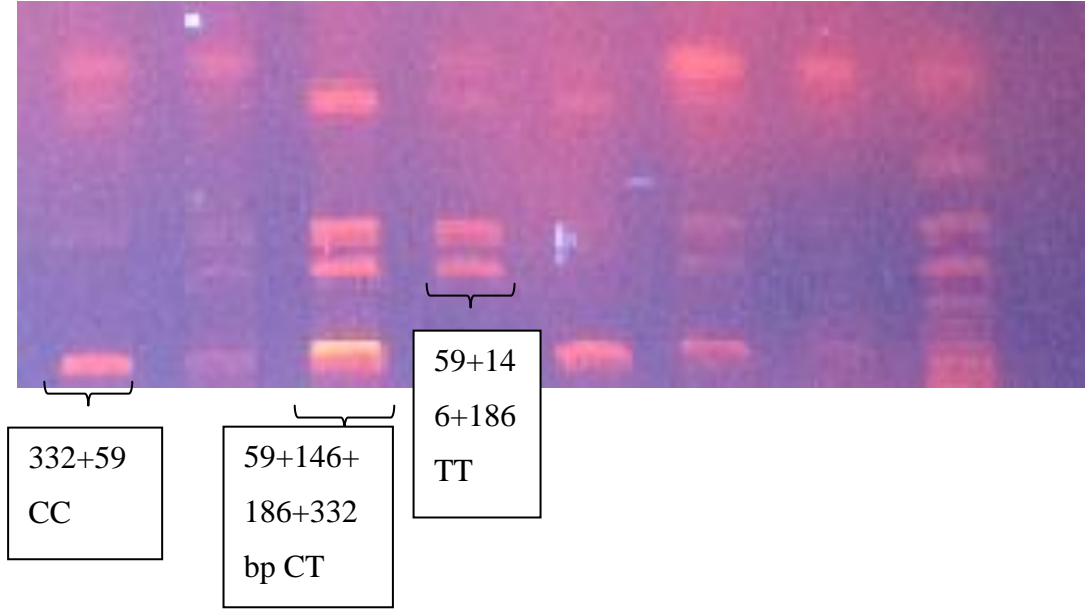
Fas Geni Promotor Bölge PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenip kontrol edildikten sonra, 122 bç'lik ürünün BstI enzimi ile kesimi gerçekleştirildi. Kesim sonrası elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel elektroforez yöntemiyle yürütüldü. Fas geni promotor bölge G/A polimorfizminde BstI enzimi ile kesilmeden kalan 122bç'lik tek banda sahip örnekler (GG) homozigot olarak, BstI enzim kesimi olan ve agaroz jel elektroforezde 108 bç ve 14 bç'lik iki bant veren örneklerde homozigot AA genotipi şeklinde değerlendirilirken ; 122 bç, 108 bç ve 14 bç olmak üzere üç bant veren örnekler ise heterozigot GA genotipi olarak değerlendirildi (resim 3).



Resim3.Fas promotor bölge hasta grupları kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

4.4.2. Trail Geni ekzon Bölge hasta grupları kesim ürünlerine ait bulgular

Trail Geni ekzon Bölge PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenip kontrol edildikten sonra, 391 bç'lik ürünün Rsa I enzimi ile kesimi gerçekleştirildi. Kesim sonrası elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel elektroforez yöntemiyle yürütüldü. Trail geni ekzon bölge C/Topolimorfizmde Rsa I enzimi ile kesilen ve 332 ve 59 bç'lik bantlara sahip örnekler (CC) homozigot olarak, Rsa I enzimi ile yine kesimi olan ve agaroz jel elektroforezde 59+146+186 şeklinde 3 bant veren örneklerde homozigot mutant TT genotipi şeklinde değerlendirilirken ; 59+146+186 bç ve 59+332 bç'lik 5 bant veren örnekler ise heterozigot (CT) genotipi olarak değerlendirildi (resim4).



Resim 4. Trail ekzon bölge hasta gruplarının kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser riskini arttıran başlıca genetik faktörler; mutasyonlar, kimyasalları aktive eden ve detoksifiye eden enzimlerin yapısını ve ifade edilme düzeyini (karsinojen metabolizmasını) etkileyen kişisel genetik farklılıklar, DNA hasarının onarım kapasitesini etkileyen polimorfik/genetik değişikliklerdir.

Polimorfizmler, mutasyonlara göre daha sık rastlanır. Toplumda %1'den daha yüksek sıklıkta bulunan genetik çeşitlilik tipine polimorfizm denir. İnsan genomunda en çok bulunan genetik çeşitlilik tipi, tek nükleotit polimorfizmleridir (single nucleotide polymorphism, SNP). Genomda binlerce aday polimorfik genin bulunması ve genomunda bu farklılıkları taşıyan kişilerin kanser gelişimine olan duyarlılıklarını etkileyebilecek olması pek çok araştırmacıyı bu çalışma alanına sürüklemektedir (43).

Gelişmiş ülkelerde yaşam sürecinde kolorektal kanser gelişimi oranı %5 olup ölüme varlığı %25-35 oranında olup, iyi bilinen bir risk faktörüdür (1).

Yüksek protein alımı karsinogenezi artırabilir fakat kesin kanıt mevcut değildir. Kırmızı etin yağlı elemanları tümör büyümesini artırabilir çünkü yağlar luminal bakteriler tarafından anormal kolon epitelyum proliferasyonuna neden olabilen karsinojenlere metabolize edilebilir(24).

Yüksek lifli diyetin fekal karsinojenleri seyrelttiği, kolondan geçiş zamanı kısalttığı ve lümende uygun bir ortam oluşturduğuna inanılmıştır. Bununla beraber yapılan daha büyük çalışmalar kolorektal kanser ile fiber alımı arasında ters bir ilişki olduğunu göstermemektedir (44). Normal bir dokuda hücre poliferasyonu ile hücre ölümü denge halindedir. Hücre ölümü olarakta adlandırılan apoptozis işlemiyle, organizmadaki istenmeyen hücreler yok edilerek bu denge muhafaza edilir. Bunun yanı sıra bağışıklık bozuklukları ve tümör gelişimi gibi bazı patolojik süreçleri kapsayan çeşitli fizyolojik fonksiyonları da vardır. FAS bir hücre yüzeyi reseptörü olarak, birçok hücre tiplerinde apoptotik sinyalde önemli bir rol oynar. Ancak kolon ve akciğer kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde Fas proteinin seviyesi azalmış olarak saptanmıştır. Bu nedenle Fas proteini seviyesinin kolon kanserinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Kanserli hücreler de Fas etkileşimiyle kanserli hücreler apoptozise rezistans geliştirerek immün sistemden kaçır. Buna ilaveten Fas genindeki eşey ve somatik hücre mutasyonları birçok kanser türünün oluşumuna neden olan apoptotik sinyalin azalmasıyla ilişkilidir (3).

FAS geni Yapılan araştırmalara göre fas geni; Kolorektal kanserde ve karaciğer

metastazında (45), akciğer kanserinde (3), beyin tümörü oluşumunda (46), böbrek kanseri oluşumunda(47), nazofaringeal karsinoma da (48), gastrik adenokarsinoma da(49) ,prostat kanserinde(50), meme kanserinde (51) araştırılmış ve ilgili bulunmuştur. Ayrıca sarımsaktan elde edilen alisin maddesinin mide kanserinde etkili olduğu ve bu etkinin yine fas ilişkili apoptozisin hücre yaşam süresini azaltarak hücre ölümü geliştirdiği bulunmuştur (52).

TRAIL geni de yine apoptotik mekanizma için önemli bir tamamlayıcıdır (35). Bugüne kadar TRAIL geninin promotör bölgesinde -692 A/G, -716 C/T, -760 T/C ve -802 C/T polimorfizmleri tanımlanmıştır. -716 C/T polimorfizminin meme kanseri riskini arttırdığı gözlenmiştir (53).

TRAIL ile ilgili bildirilen önemli polimorfizmlerden biri, ilk defa Gray tarafından 2001 yılında tanımlanan ekzon 5'in 1595 pozisyonundaki polimorfizmdir. Gray ve ark. Afrika Amerikalı ve beyaz ırkta TRAIL ile ilgili 3'UTR bölgesinde yer alan 3 adet polimorfik bölgeyi incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda 3'UTR 1595 pozisyonundaki C-T değişim polimorfizminin analizi sonucu, Afrikalı Amerikalılarda C allelini 0.842, T allelini ise 0.158 olarak saptamışlardır. Beyaz ırkta C allelini 0.712, T allelini ise 0.288 olarak saptamışlardır. Çalışmamız sonucunda, TRAIL 3'UTR 1595 gen polimorfizmine ait genotip dağılımımızda % 49 CC, % 42.1 CT, % 8.8 TT bulunmuştur. Buna göre çalışmamızda C aleli frekansını 0.701, T alleli frekansını ise 0.298 olarak saptadık. TRAIL 3'UTR 1595 gen polimorfizmine ait allel frekanslarımız Gray ve ark. TRAIL allel frekans bulgularıyla uyumlu bulunmuştur.

TRAIL'in 5. ekzon 3'UTR 1595 pozisyonundaki polimorfizmi ile ilgili literatürde nadir sayıda çalışma yer almaktadır. Bunlardan en önemli çalışmalardan bir tanesi, MS hastalığında TRAIL polimorfizm analizi amaçlı yapılan çalışmadır (54).

Son zamanlarda TRAIL promotöründe yüksek bir polimorfik bölge daha tanımlanmıştır (55). TRAIL promotöründe bulunan 111 bç lik bir parça üzerinde 4 SNP saptamışlardır. Bu dört promotor polimorfizmlerinden bir tanesinin (-707nt) AP-1 transkripsiyonel faktörünün bağlanma bölgesi üzerinde olduğu tanımlanmıştır (56). Genelde transkripsiyonel bağlanma bölgesi ve promotor bölge üzerindeki bir SNPnin, söz konusu proteinin düzenlenmesi ve ekspresyonu üzerine etki etmekte olduğu bilinmektedir (57,58).

Çalışmamızda; Fas geni promotör bölge -1377 G/A ve Trail ekzon bölge C/T polimorfizmlerinin kolon kanserindeki etkisinin varlığı araştırılmıştır. Çalışmamızda 56 hasta ve 47 kontrol grubumuz mevcuttur. Fas geninde 47 kontrol vakasının 21'i AA genotipinde %44.7,17'si AG genotipinde %36.2 'si,9'u GG genotipinde %19.1 oranında bulunmuştur. Bu sonuca göre GG genotipinin uygun istatistiksel hesaplamalarla çıkan p değeri:0.005 çıkmıştır.

Bu da fas geni 1377 polimorfizminin GG genotipinin kolon kanserinde etkili olabileceği sonucunu vermiştir.

Trail geni promotor bölge +1595 polimorfizminin kolon kanserindeki etkisinin varlığı incelenmiştir. Çalışmaya 56 hasta hasta ve 45 kontrol vakası dahil edilmiştir. Sonuçlara göre hasta vakalarından 18 CC genotipi %32.1 oranında,,32 CT genotipi %57.1 oranında, 6 TT genotipi %10.7 oranında gözlenmiştir. Kontrol gruplarında ise 26 CC genotipi %57.8 oranında,13 CT genotipi %28.9 oranında, 6 TT genotipi %13.3 oranında gözlenmiştir. Yapılan uygun istatistiksel çalışmalar sonucunda CT allelinin p değeri; 0.015 çıkmıştır. Bu da bize CT genotipinin kolon kanserinde risk oluşturabileceğini söylenebilir.

Sonuç olarak fas 1377 (GG)ve Trail 1595(CT) genotipli polimorfizlerin kolon kanserine yatkınlık oluşturduğu düşünülebilir.

6.KAYNAKLAR

1. W Neklason D., W Done , M., R Sargent ,N., G Schwartz, A, Culver ,H-A., Griffin,C.A., Ahnen ,D.J., Schildkraut ,J.M., Tomlinson ,G.E., Strong,L. , Miller,A.M., Stopfer,J.E., Burt ,R.(2011). Activating mutation in MET oncogene in familial colorectal cancer. BMC Cancer, 10.1186/1471-2407-11-424
2. Cinel, İ., Oral, U. (2001) SIRS, Sepsis, MODS Patofizyolojisinde Apoptozis. Türk Anest f
3. Zhang, X., Miao, X., Sun, T., Tan, W., Qu, S., Xiong, P., Zhou, Y., Lin, D.(2005) Functional polymorphisms in cell death pathway genes FAS and FASL contribute to risk of lung cancer. J Med Genet ;42:479–484. doi: 10.1136/jmg.2004.030106.
4. Timmer T, de Vries EG, de Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? J Pathol. 196: 125-34, 2002.
5. Libutti SK, Saltz LB, Rustgi AK, Teper JE. Cancer of Colon. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). Principles and Practice of Oncology. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005:1060- 1109.
6. <http://www.kanser.gov.tr/index.php?cat=11>. “Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Dairesi Başkanlığı (Epidemiyoloji ve Koruma Şube Mudurluğu) 2005 Yılı Türkiye Kansere İstatistikleri”,2005.
7. . <http://www.saglik.gov.tr/TR/BelgeGoster.aspx>? Erişim tarihi: 24.01.2008
8. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. Mod Pathol. 2003;16(4):376-88.
9. Rosai J: Rosai and Ackerman’s Surgical Pathology. In: Rosai J. Gastrointestinal Tract, Large Bowel. Vol 1. 9 th ed: Mosby, 2004:776-855
10. Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. Exp Cell Res; 256:58-66, 2000
11. 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.
12. Christine A. Iacobuzio-D., Elizabeth M. Epithelial neoplasms of the colorectum. In: Gastrointestinal and Liver Pathology. Churchill Livingstone Elsevier, 2005:367-394.

13. Rosai J: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. In: Rosai J. Gastrointestinal Tract, Large Bowel. Vol 1. 9 th ed: Mosby, 2004:776-855.
14. Cooper HS. Intestinal neoplasms. In Mills SE, Carter D, Greenson JK, Oberman HA, Reuter V, Stoler MH eds. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, 4th ed. Philadelphia, Lippicott Williams&Wilkins, 2004, pp: 1543-1601
15. Silverberg SG, De Lellis RA, Frable WJ, Li Volsi VA, Wick MR. Neoplastic diseases of the small and large intestines. In: Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology, Volume 2. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2006: 1419- 1464.
16. Sadler T.W.: Langman's Medikal embriyoloji. Edit: Basaklar A.C.. Sindirim sistemi. 7. baskı, Ankara, Palme kitabevi, 1996: 231-259.
17. İlgi S., Gökse Y., Sayek _.: Temel Cerrahi. Edit.: Sayek _.. Gastrointestinal Sistem Anatomisi, Kolorektal Polipler ve Polipozis sendromları, Kolorektal Karsinomlar. Cilt 1,2. baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 1991:555-67,816-839.
18. Levine DS, Haggitt RC: Histology for Pathologists. In: Sternberg SS. Colon. 1 st ed. New York: Raven Press Ltd, 1992:573-591
19. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. The gastrointestinal tract. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7 th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Company, 2005: 857-869
20. Singh PN, Fraser GE. Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. Am J Epidemiol 1998;148:761.
21. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. J Natl Cancer Inst 1999;91:916.
22. Burkitt DP. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. 1971. Dis Colon Rectum 1993;36:1071.
23. Rosenberg L, Louik C, Shapiro S. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and reduced risk of large bowel carcinoma. Cancer 1998;82:2326.
24. Burt RW, Bishop DT, Cannon LA, et al. Dominant inheritance of adenomatous colonic polyps and colorectal cancer. N Engl J Med 1985;312:1540.
25. Winawer S, Fletcher R, Rex D, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale- update based on new evidence. Gastroenterology 2003;124:544
26. Thomas E. R, Ira J.K. Colorectal cancer: Risk factors and recommendations for early detection. American Family Physician, 1999 : 1-12.
27. <http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri>.

28. Bresailer RS. Malignant and premalignant lesions of the colon. In Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology. Eds: Friedman SL, McQuaid KR, Grendell JH. McGraw Hill, New York, 2003, pp:407-435.
29. Rudin CM and Thompson C.B.: Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev. Med*; 1997; 48, 267-281
30. Timmer T, de Vries EG, de Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol*. 196; 125-34, 2002.
31. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res*. 59 Suppl 7: 1693s-700s, 1999.
32. Ayaşlıoğlu E. Apoptoz. *T Klin J Med Sci*. 2001; 21.57-62
33. Butler, L.M., Hewett P.J., Butler W.J., Cowled P.A. (1998) Down-regulation of Fas gene expression in colon cancer is not a result of allelic loss or gene rearrangement. *British Journal of Cancer*. 77(9), 1454-1459
34. GeneCards, Fas ligand (TNF superfamily, member 6) Erişim: <http://www.genecards.org/cgi-bin/> Erişim tarihi: 16.08.2008.
35. Kikuchi, S., Miyagishi, R., Fukazawa, T., Yabe, I., Miyazaki, Y., Sasaki, H., 2005. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 167, 170-174
36. Nagane, M., Huang, H.-J.S., Cavanee, W.K., 2001. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis* 6, 191-197.
37. Chen, B., Liu, S., Wang, X.L., Xu, W., Li, Y., Zhao, W. H., Wu, J. Q., 2009. TRAIL-R1 polymorphisms and cancer susceptibility: An evidence-based meta-analysis. *European Journal of Cancer* 45, 2598-2605.
38. Zhnag, L., Fang, M., 2005. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Therapy* 12, 228-237.
39. Mahmood Z, Shukla Y. Death receptors: Targets for cancer therapy. *Exp Cell Res* 2010; 316: 887-99.
40. Holoch PA, Griffith T. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): A new path to anti-cancer therapies. *Eur J. Pharmacol*. 2006; 625:63-72.
41. Benno Weigmann¹, Markus F Neurath. Selective targeting of activated T cells in chronic intestinal inflammation. *Gut* 2009; 58:747-748 doi:10.1136/gut.2008.170183.

42. Leithauser F et al. Downregulation of Fas ligand by shedding Lab. Invest 1993;69:415-419
43. Abdullah Ekmekçi, Ece Konaç, H. İlke Önen, 2008. Gen Polimorfizmi ve kansere yatkınlık. Marmara Medical Journal ;21(3);282-295
44. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, et al. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. N Engl J Med 1999;340:169
45. Kykalos S, Mathaiou S, Karayiannakis AJ, Patsouras D, Lambropoulou M, Simopoulos C. (2011) Tissue Expression of the Proteins Fas and Fas Ligand in Colorectal Cancer and Liver Metastases. J Gastrointest Cancer.
46. Ho IA, Ng WH, Lam PY. (2010) FasL and FADD delivery by a glioma-specific and cell cycle-dependent HSV-1 amplicon virus enhanced apoptosis in primary human brain tumors. Mol Cancer. 2010 Oct 13;9:270.
47. Zhong Y, Guan K, Guo S, Zhou C, Wang D, Ma W, Zhang Y, Li C, Zhang S. (2010) Spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells. Cancer Lett. Dec 28;299(2):150-60. Epub 2010 Sep 16.
48. Cao Y, Miao XP, Huang MY, Deng L, Lin DX, Zeng YX, Shao JY. (2010) Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL and risk of nasopharyngeal carcinoma. Mol Carcinog. 2010 Nov;49(11):944-50
49. Boroumand-Noughabi S, Sima HR, Ghaffarzadehgan K, Jafarzadeh M, Raziee HR, Hosseinnezhad H, Moaven O, Rajabi-Mashhadi MT, Azarian AA, Mashhadinejad M, Tavakkol-Afshari J. (2010) Soluble Fas might serve as a diagnostic tool for gastric adenocarcinoma. BMC Cancer. Jun 10;10:275.
50. Shao P, Ding Q, Qin C, Wang M, Tang J, Zhu J, Chen J, Cao Q, Li J, Xu B, Zhang Z, Zhang W, Yin C. (2011) Functional polymorphisms in cell death pathway genes FAS and FAS ligand and risk of prostate cancer in a Chinese population. DOI: 10.1002/pros.21328
51. M Jaberipour¹, M Habibagahi², A Hosseini¹, M Abbasi¹, A Sobhani-lari¹, A Talei³, A Ghaderi⁴ (2010). Detection of B cell lymphoma 2, tumor protein 53, and FAS gene transcripts in blood cells of patients with breast cancer. Volume: 47 Issue: 4 Page: 412-417.
52. Zhang W, Ha M, Gong Y, Xu Y, Dong N, Yuan Y. (2010 Dec) Allicin induces apoptosis in gastric cancer cells through activation of both extrinsic and intrinsic pathways. Oncol Rep. ;24(6):1585-92.

53. Pal, R., Gochait, S., Chattopadhyay, S., Gupta, P., Prakash, N., Agarwal, G., Chaturverdi, A., Husain, N., Husain, S.A., Bamezai, R.N.K., 2010. Functional implication of TRAIL -716 C/T promoter polymorphism on its in vitro and in vivo expression and the susceptibility to sporadic breast tumor.
54. Kikuchi S, Miyagishi R, Fukazawa T, Yabe I, Miyazaki Y, Sasaki H. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*; 2005;167, 170-4.
55. Weber A., Wandinger K.P., Mueller W., Aktas O., Wengert O., Grundstrom E., Ehrlich S., Windemuth C., Kuhlmann T., Wienker T., Bruck W., Zipp F. Identification and functional characterization of a highly polymorphic region in the human TRAIL promoter in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*; 2004: 149, 195–201
56. Folatte V C, Segal D H, Cohen D.R. Transcriptional regulation in the immune system: all road lead to AP-1. *J. Leuko. Biol.* 1998;63, 139-152
57. Abraham L J, Kroeger K M. Impact of the -308 TNF promotor polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J. Leuko. Biol.* 1999: 66, 562-566
58. Hackstein H, Hecker M, Kruse S, Bohnert A, Ober C, Deichmann KA, Bein G. A novel polymorphism in the 5' promoter region of the human interleukin-4 receptor alpha-chain gene is associated with decreased soluble interleukin-4 receptor protein levels. *Immunogenetics.* 2001 May-Jun;53(4): 264-9.

ÖZGEÇMİŞ

Merve Ateş. 1985 yılında Düzce'de doğdu.1999 yılında düzce Uzunmustafa İlköğretim okulundan mezun oldu. 2003 yılında Düzce Arsal Anadolu lisesinde mezun oldu. Daha sonra 2004 yılında Çukurova üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde üniversite hayatına başladı. 2008-2009 yılında yine Çukurova Üniversitesi Tezsiz Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. 2010 yılı itibariyle Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda eğitimine başladı. Ve halen Tıbbi Biyoloji ve Genetik anabilim Dalı'nda öğrenci olarak eğitimine devam etmektedir.

