



T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

OTOFAJİNİN KOLOREKTAL KANSERLERDE YERİ VE ÖNEMİ

Dr. Hilmi Erdem SÜMBÜL

UZMANLIK TEZİ

ADANA-2015

TEŞEKKÜR

Tez süresince her aşamada bana özveri ile yardımcı olan bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Hikmet Akkız'a,

Asistanlığım boyunca eğitimime katkıda bulunan Prof. Dr Melek Erkişi, Prof. Dr Murat Sert, Prof. Dr. Birol Güvenç ve tüm saygıdeğer hocalarıma,

Çalışmanın yapılmasında emeği geçen Dr.Ersin Akgöllü, Dr.Mahmut Büyükşimşek, Dr.Alper Yıldırım, Dr.Onur Taktakoğlu, Dr. Mert Tohumcuoğlu, Dr.Ufuk Cinkara, Dr.Kuntay Kaplan, Yard. Doç.Dr. Kubilay Dalcı, Yard. Doç.Dr İsmail Cem Eray, Yard. Doç.Dr. Orçun Yalav'a ve tüm mesai Arkadaşlarıma

Çalışmamda büyük emeği olan ve ufkumu açan Doç.Dr. Devrim Gözüaçık, Dr. Dilek Çevik, Dr. Yunus Akkoç, Dr. Kumsal Ayşe Tekirdağ ve tüm Sabancı Üniversitesi Mühendislik Ve Doğa Bilimleri Fakültesi Gözüaçık Laboratuar ekibine

Hayatımın her aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen ve bugüne gelmemde büyük emekleri olan annem Gülsüm Sümbül, babam Hayri Sümbül, abim Doç.Dr. Ahmet Taner Sümbül, ablalarım Doç. Dr. Bahar Sümbül Yüksel ve Uzm. Dr. Bilge Sümbül Gültepe'ye

Bu süreç boyunca gösterdikleri sabır ve destek için eşim Dr. Merve Sümbül'e ve kızım Gülsüm Beyza Sümbül'e

Teşekkür ederim
Hilmi Erdem SÜMBÜL

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Epidemiyoloji	4
2.2. Etyoloji:	5
2.2.1. Genetik faktörler	5
2.2.2. Çevresel Faktörler	5
2.2.3. Ailesel Kolorektal Kanser:	6
2.3. Kolorektal kanser için tarama:	8
2.3.1. Ortalama riskli hastalar:	8
2.3.2. Yüksek Riskli Hastalar:	8
2.4. Evreleme	9
2.5. Programlı Hücre Ölümü Modelleri	12
2.5.1. Apoptozis:	12
2.5.2. Otofaji:	13
2.5.3. Otofajinin düzenlenmesi:	16
2.5.4. Otofaji üzerinde etkili olan moleküller:	17
2.5.5. Tümörögenezde otofajinin rolü:	18
2.5.6. Otofaji ve apoptozis arasındaki hücreyel düzeyde ilişki.	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Örneklerin Toplanması	20
3.2. Yöntem:	20
3.2.1. Gen ekspresyonu:	20

3.2.2 Protein İzolasyonu:	24
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	54

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Kolorektal Kanserde TNM evreleme sistemi	11
Tablo 2. SEER programı 2010 verilerine göre evreye göre 5 yıllık rölatif sağ kalım oranları (47).	12
Tablo 3. Demografik , klinik ve patolojik veriler -1	33
Tablo 4. Demografik , klinik ve patolojik veriler -2	34
Tablo 5. Cinsiyet ve Histolojik Grade arasındaki ilişki	34
Tablo 6. Lenfovasküler invazyon ve Histolojik Grade arasındaki ilişki	35
Tablo 7. Perinöral invazyon ve Histolojik grade arasındaki ilişki	35
Tablo 8. Hastaların TNM evreleri	35
Tablo 9. TNM evreleri ve perinöral invazyon arasındaki ilişki	36
Tablo 10. TNM evreleri ile lenfovasküler invazyon arasındaki ilişki	36
Tablo 11. Becklin-1 gen ekspresyonu ile TNM evreleri arasındaki ilişki	37
Tablo 12. Becklin-1 gen ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon arasındaki ilişki	37
Tablo 13. Becklin-1 gen ekspresyonu ile perinöral invazyon arasındaki ilişki	38
Tablo 14. ATG5 gen ekspresyonu ile TNM evreler arasındaki ilişki	38
Tablo 15. ATG5 gen ekspresyonu ile perinöral invazyon arasındaki ilişki	39
Tablo 16. ATG5 gen ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon arasındaki ilişki	39
Tablo 17. ATG12 gen ekspresyonu ile TNM evreler arasındaki ilişki	40
Tablo 18. ATG12 gen ekspresyonu ile perinöral invazyon arasındaki ilişki	40
Tablo 19. ATG12 gen ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon arasındaki ilişki	41

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil no</u>	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1. Apoptozis ve Otofaji arasında farklar. (50)	13
Şekil 2. Otofaji Mekanizmaları (59).	15
Şekil 3. Otofaji basamakları: Otofajik kese oluştuktan sonra uzamaya başlar. Uzama sonrasında ise geç endozom veya lizozom ile birleşerek taşıdığı yapıların parçalanmasını sağlar, yıkım sonrası açığa çıkan aminoasit ve yağ asitleri gibi yapıtaşları tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılmış olur (61).	16
Şekil 4. Tümör dokusunda Becklin1 gen ekspresyonu	27
Şekil 5. Sağlam dokuda Becklin-1 gen ekspresyonu	28
Şekil 6. Tümör dokusunda ATG5 gen ekspresyonu	28
Şekil 7. Sağlam Dokuda ATG5 gen ekspresyonu	29
Şekil 8. Tümör dokusunda ATG12 gen ekspresyonu	29
Şekil 9. Sağlam Dokuda ATG12 gen ekspresyonu	30
Şekil 10. Protein ekspresyonu -1 (Bant Görüntüsü)	31
Şekil 11. Protein ekspresyonu -2 (Bant Görüntüsü)	31
Şekil 12. Protein ekspresyonu -3 (Bant Görüntüsü)	32
Şekil 13. Protein ekspresyonu -4 (Bant Görüntüsü)	32

KISALTMA LİSTESİ

Atg	: Otofaji genleri
FAP	: Familyal Adenomatöz Polipozis
GGK	: Gaitada gizli kan
HNPCC	: Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser
IHK	: İmmün histokimya
KRK	: Kolorektal kanser
3-MA	: 3-metil adenin
MMR	: Mismatch Repair
MSI	: Mikrosatellit insitabilite
mTOR	: Mammalin target of Rapamycin (Memelilerde Rapamisin hedefi)
NSAI	: Nonsteroid anti inflamatuvar
OS	: Genel sağkalım
PCR	: Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyon)
PFS	: Progresyonsuz sağkalım
PI3K	: Fosfo Inozitol 3 Kinaz
SEER	: Sürvey Epidemiyoloji ve Sonuçlar
TNM	: Tümör Nod Metastaz

ÖZET

Otofajinin Kolorektal Kanserde Yeri Ve Önemi

Kolon kanseri tüm dünyada kadınlar ve erkeklerde üçüncü en sık gözlenen kanserdir. Yılda yaklaşık 1.200.000 yeni vaka ve yaklaşık 609.000 ölüm tahmin edilmektedir. Erkek ve kadınlardaki kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır.. Otofaji, hücrel proteinlerin otofajik vakuoller aracılığı ile lizozomal degradasyonudur. Otofaji gelişimde, uzun yaşamda ve kanser gibi pek çok hastalığın patogenezinde büyük rol oynamaktadır. Tümör gelişimi ve uyarılması üzerine bazı etkiler gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmanın amacı, otofajinin, otofaji ilişkili ATG5 , ATG12 ve Beclin-1 genlerinin ve proteinlerinin ekspresyonu ve kolorektal kanserin klinikopatolojik özellikleri ile ilişkisinin belirlenmesidir.

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında kolorektal kanser nedeniyle opere edilen 45 hasta dahil edildi. Hastaların hem tümör hem de eşlenik normal kolon dokularından alınan örnekler ameliyathaneden itibaren sıvı azotta bankalandı. Daha sonra SYBR Green qPCR yöntemiyle ATG5, ATG12, Beclin-1 gen ekspresyonlarına ve Western Blot yöntemiyle ATG5 , Beclin-1 , LC3 protein ekspresyonlarına bakıldı.Ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik özellikler karşılaştırıldı.

Gen ve protein ekspresyonları hem tümör hem de eşlenik normal doku örneklerinin çoğunda saptandı. Gen ekspresyon düzeyleriyle klinikopatolojik ve demografik veriler arasında anlamlı ilişki saptanamadı.Örneklerin TNM evreleriyle perinöral invazyon ve lenfovasküler invazyon arasında anlamlı ilişki saptandı.

Bu çalışmanın sonuçları otofajinin kolorektal karsinogenezisde işe karıştığını önermektedir. Genişletilmiş çalışmaların yapılması otofaji ve kolorektal kanser ile ilişkili klinikopatolojik özellikleri belirlemede faydalı olabilecektir.

Anahtr Kelimeler: ATG, OTOFAJİ ,KOLOREKTAL KANSER

ABSTRACT

Importance of Autophagy in Colorectal Cancer

Colon cancer is the third most common cancer in women and men all over the world. Colorectal cancer is diagnosed in over 1.2 million people globally each year. The disease is responsible for approximately 609,000 deaths a year (10% of all cancer cases in women and men). Autophagy is the basic catabolic mechanism that involves cell degradation of unnecessary or dysfunctional cellular components through the actions of lysosomes. The development of autophagy plays a great role in the pathogenesis of many diseases. It was found that autophagy can influence on tumor progression and stimulation. The purpose of this study is to determine the relationship between autophagy and autophagy related ATG5, ATG12, Beclin-1 gene and protein expressions and clinicopathological features of colorectal cancer.

The data of 45 patients operated on for colorectal cancer in General Surgery Department of Cukurova University The Faculty of Medicine Balcali Hospital was included to the study. There were totally 90 tissue samples taken and banked in liquid nitrogen: 1 tissue sample from tumor and 1 from normal from each patient. ATG5, ATG12, Beclin-1 gene expression levels in all samples were examined using SYBR-Green qPCR method, and, ATG5 , Beclin-1 , LC3 protein levels were analysed using Western blotting technique. Expression levels were compared to clinicopathologic characteristics.

Gene and protein expression in both tumor and normal tissue equivalents were studied in most of the examples. There was no significant correlation between gene expression levels and demographic or clinicopathological features. The TNM stage of cases significantly correlated with perineural invasion and lymphovascular invasion.

The results of this study suggest that autophagy plays a role in carcinogenesis of colorectal cancers. The further studies are required to determine the relationship between autophagy and clinicopathologic features associated with colorectal cancers.

Key Words: ATC ,AUTOPHAGY ,COLORECTAL CARCINOMA

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kolon kanseri tüm dünyada erkekler ve kadınlarda görülen kanserler arasında üçüncü en sık gözlenen kanserdir. Yılda yaklaşık 1.200.000 yeni vaka ve yaklaşık 609.000 ölüm görülmektedir. Erkek ve kadınlarda tüm kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2009 yılı verilerine göre yeni kanser vakalarının % 10 ve kansere bağlı ölümlerin % 9'undan kolorektal kanserler sorumludur. Şu anda kullanılan güncel tedavi rejimlerine karşın 5 yıllık sağkalım %30-40'ı geçememektedir. (1).

Kolon kanseri insidansı, etkili bakım ve yaşam biçimi değişiklikleri sonucunda batı ülkelerinde azalmıştır. Kolorektal karsinogenezinde genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi önemli role sahiptir. Özellikle ileri evrede, diğer solid tümörlerle karşılaştırıldığında son iki dekatta moleküler mekanizması daha iyi anlaşılmasına rağmen kolorektal kanser (KRK) prognozunda belirgin bir gelişme olmamıştır. 5 yıllık sağkalım Survey Epidemiyoloji ve Sonuçlar (SEER) program veritabanı analizine göre oranları 1980'lerin başlarında tanı konan hastalar için %56.5'den 1990'ların başlarında tanı konan hastalar için % 63.2'ye kadar ve son zamanlarda erken tanı ve tedaviye bağlı olarak % 64.9'a yükselmiştir (2). Son 30 yılda kolon kanseri insidansı azalmış ve 1990 ile 2007 yılları arasında mortalite %35 oranında azalmıştır. Bunun muhtemel nedenleri erken tanı ve tedavideki gelişmelerdir (3).

Erken evre KRK'nın primer tedavisi cerrahidir ve kür yüksek oranda sağlanabilir. Ancak nüks ve metastatik hastaların prognozu kötüdür ve medyan yaşam süresi 24 ay kadardır (4). Hastaların yaklaşık olarak yarısında metastaz gelişmektedir. Bu hastalarda temel tedavi kemoterapidir. Hedefe yönelik ajanlar ve yeni kemoterapi ajanları ile cevap oranları ve yaşam süresinde artış olmuştur (5).

Klinik pratiğe giren bu yeni ajanlara rağmen metastatik KRK (mKRK) hastalarının medyan yaşam süresi 24 ayı geçememektedir. Bunun nedeni bu bileşiklerden fayda görecektir hastaları seçmede yeterince biyomarkır olmayışı olabilir (6).

Hücre ölüm sinyalizasyonundaki bozukluklar kanserin küratif tedavisi önündeki en önemli engellerden birisidir (7).

Otofaji 1970'lerde ilk olarak mayalarda tanımlanmış, sonrasında memelilerde de evrimsel olarak korunmuş bir programlı hücre ölüm mekanizması olduğu gözlenmiştir.

Otofajinin karsinogenezdeki rolü ile ilgili son yıllarda birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda otofajinin hem kanser hücrelerinin sağkalımının sağlanması, hem karsinogenezin başlatılması hem de bunlara zıt olarak apoptozdan kaçan kanser hücrelerinin yok edilmesinde bir mekanizma olarak görev yapabileceği yönünde kanıtlar bulunmaya başlanmıştır. Özellikle tedavide otofajinin manüplasyonu (inhibisyonu veya aktivasyonu) ile başarılı olunabileceği fikri doğmuştur. Ancak elimizdeki veriler bu soruların aydınlatılması için henüz çok yetersizdir. Günümüzde birçok araştırma bu konu üzerine odaklanmaktadır.

Otofaji kendi kendini yeme anlamına gelir. Otofaji hücre içerisindeki uzun ömürlü proteinlerin, hasarlı organellerin, mikroorganizmaların ve virüslerin hücre içerisinde paketlenip lizozoma taşınarak parçalanması süreci olarak bilinmektedir (8,9). Otofaji genleri (Atg); otofajinin düzenlenmesinde rol oynarlar (10). Otofaji sitoplazmada otofagozom denilen çift zarlı keseciklerin varlığıyla tanımlanır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda otofajinin metabolizma, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, enfeksiyonlar, morfogenez, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminde de rol oynadığı görülmüştür (11).

Otofaji, hem hücrenin yaşatılabilmesi hem de hücre ölümü olmak üzere zıt iki role sahiptir (12). Otofaji hücre ölümüne de neden olduğundan dolayı "programlı hücre ölümü II" olarak isimlendirilmiştir (13). Otofajinin kanser ile ilişkisini ortaya koyan çalışmalar sonucu kanserde yeni tedavi stratejileri olarak otofaji sinyal yollarını hedefleyen ilaçlar geliştirilmektedir. Örneğin otofaji yolağını tetikleyerek etki gösteren mTOR inhibitörleri klinik olarak renal karsinom tedavisinde kullanılmaktadır (14).

Kolorektal ve gastrik kanserlerde UVRAG geninde mutasyon tanımlanmıştır (15). UVRAG, Bif1 genlerinin tümöröenezisi baskılayabileceği ve bu iki genin tümör supresör gen olabileceği öne sürülmüştür (15,16). Kolorektal ve gastrik kanserlerde Atg2B, Atg5, Atg9B genlerinde hepatoselüler ve gastrik kanserde Atg5 geninde, somatik mutasyonlar tanımlanmıştır (9,17). Bu çalışmalar sonucunda otofajik genlerin ifadelerinin kanser hücrelerinde azaldığı ve otofajinin karsinogenezde tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak önemli rol oynadığını savunan fikirler ileri sürülmüştür (18).

Moleküler düzeyde otofajinin kanserdeki rolünün tümör süpresör ve onkogenler tarafından da düzenlenebileceği ve otofaji genlerinin tümör supressör olabileceği ileri sürülen bir hipotezdir (19,20).

Apoptotik mekanizmalardaki bozukluklar hem anormal proliferasyona yol açmakta hem de sitotoksik tedaviye dirence sebep olmaktadır. Bu nedenle özellikle son on yılda apoptozisi indükleyen yeni ajanlar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (21). Kanser hücrelerinde açlığa otofajik yanıt daha az belirgin olmakla birlikte birçok tümör tipinde önemli bir sağkalım mekanizması olarak karşımıza çıkmaktadır (22). Otofaji ile karsinogenezin supresyonunun da sağlanabildiği düşünülmektedir. Apoptozise uğramayan kanser hücrelerinin yok edilmesinde bir diğer mekanizma da otofaji olabilir (23).

Sonuç olarak kolorektal ölüme yol açan ve kanser tüm dünyada sık gözlenen kanserlerden biridir. Otofaji; metabolizmanın düzenlenmesi, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminde rol almakla birlikte kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve enfeksiyon hastalıklarının nedenleri arasında da sayılmaktadır. Bu çalışmada kolorektal kanserin klinik ve patolojik özellikleri ile otofajinin ilişkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Epidemiyoloji

Kolon kanseri tüm dünyada kadınlar ve erkeklerde görülen kanserler arasında üçüncü en sık gözlenen kanserdir. Yılda yaklaşık 1.200.000 yeni vaka ve yaklaşık 609.000 ölüm görülmektedir. Erkek ve kadınlardaki kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (1).

Kolorektal kanser Amerika Birleşik Devletleri'nde üçüncü en sık görülen kanserdir ve ölüm nedeni olarak üçüncü sıradadır (24). Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın 2007-2008 yıllarında 10 il'deki kanser kayıt merkezi verilerine göre, KRK görülme sıklığı açısından tüm kanserler içinde % 7.8 ile kadınlarda üçüncü ve % 7.5 ile erkeklerde dördüncü sırada yer almaktadır (25).

Kolorektal kanser, normal glandüler epitelin invaziv kansere değişim gösterdiği genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimidir. Vogelstein ve Fearon tarafından normal kolon epitelinin adenoma, invaziv kansere ve metastatik kansere dönüşümünü içeren basamaklar tanımlanmıştır (26). Kolorektal kanser patogenezinde genomik ve epigenomik instabilite kadar, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozis, immortalizasyon, anjiogenezis ve invazyon gibi karsinogenezisde kritik olayları düzenleyen çok özel genlerin mutasyonları ve bunun sonucu değişen sinyal yolları da önemli yer tutar (27).

Kolorektal kanserli hastalarda prognostik faktörlerin bilinmesi erken evrelerde nüks riskinin belirlenmesi için, erken evre ve ileri evrelerde yaşam süresinin belirlenmesi açısından önemlidir. Kolorektal kanserde bir çok prognostik faktör tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlileri tanıda klinik evre, yapılan cerrahinin şekli (küratif /palyatif), tümör lokalizasyonu, patolojik evre ve tedavi şeklidir. Bunlarla beraber lokal nüks, progresyonsuz sağ kalım (PFS) ve genel sağkalımı (OS) etkileyen pek çok faktör belirlenmiştir (28).

Eskiden KRK yaşlılarda çok daha fazla görülürdü (29). Ancak son çalışmalarda genç popülasyonda KRK insidansının arttığı görülmektedir (30). Genç hastalar daha ileri evrede başvurmakta, daha kötü patolojik parametreler görülmekte ve çok daha agresif seyretmektedir (31).

2.2. Etyoloji:

2.2.1. Genetik faktörler

Birinci ve ikinci derece akrabalarda kolon kanseri öyküsü sporadik kolon kanseri riskini arttırmaktadır. Birinci derece yakınında kolon kanseri tanısı olması riski 2 kat arttırmaktadır (32.) İlk tanının 60 yaşından önce olması riski daha belirgin şekilde arttırmaktadır. Benzer şekilde kolon kanseri tanısı alan hastanın yakınlarında premalign adenom insidansı da artmaktadır (33).

Genetik olarak riskli gruplar kolon kanseri ve adenomu açısından daha sıkı takip edilmelidir. Ancak bu genetik yatkınlığı tam olarak belirlemek zordur. Etilen tetrahidrofolat redüktaz ve N-asetiltransferaz özellikle NAT1 and NAT2 gibi genetik polimorfizmlerin varlığı genetik yatkınlık oluşturabilir (34,35).

2.2.2. Çevresel Faktörler

a-Diyet:

Total Kalori: Obesite ve artmış total kalori alımı kolorektal kanser için bağımsız risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Artmış vücut kitle indeksi erkeklerde kolon kanseri riskini 2 kat arttırırken rektum kanseri ile bu ilişki saptanmamıştır (36).

Et, Yağ ve Protein: Artmış kırmızı et tüketimi kolorektal kanser için risk faktörüdür. Kızartılmış ve işlenmiş etler özellikle rektal kanser riski ile ilişkilidir (37). Fazla proteinli diyet karsinogenezi arttırabilir ancak bununla ilgili kesin kanıt yoktur. Kırmızı ette bulunan yağlar kolonda bulunan bakteriler tarafından metabolize edilerek karsinojenik etki oluşturabilir. Yağların içeriği de önemlidir. Özellikle doymuş hayvansal yağların yüksek riskli olduğu gösterilmiştir (38).

Klasik olarak fiber, taze sebze ve meyvenin düşük kolorektal insidansı ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Yüksek fiber oranının kolon transit zamanını kısalttığı ve lümendeki karsinojenlerin konsantrasyonunu azalttığı kabul edilmektedir. Ancak yakın zamanda sonuçlanan geniş çaplı bir çalışmada bu ilişki gösterilememiştir (39).

b-Yaşam tarzı: Sedanter yaşam tarzı kolorektal kanser riskini arttırmaktadır ancak mekanizması bilinmemektedir. Yakın zamanlı çalışmalarda fiziksel aktivitenin evre I-III kolon kanserinde mortaliteyi ve nüksü azalttığı gösterilmiştir (40). Alkol kullanımı ile kolorektal kanser arasında minimal bir ilişki saptanmış ve rektum kanseri riskinin daha belirgin arttığı görülmüştür. Uzun süre sigara kullanımı artmış adenom ve

kanser riski ile ilişkili bulunmuştur. Uzun süre çay ve kahve kullanımı ile kolorektal kanser arasında kesin bir ilişki saptanmamıştır.

c-İlaçlar: Populasyon temelli çalışmalar aspirin ve diğer nonsteroid antiinflatuar (NSAI) ilaçların adenom ve kanser riskinin azalttığını desteklemiştir. Bu etki kullanılan ilacın türünden bağımsızdır ve sağ kolon sola göre daha fazla fayda görmektedir (41).

Kolorektal kanser etyolojisinde etkili diyet ve çevresel faktörler

Riski arttıran faktörler	Riski azaltan faktörler
Yüksek kalorili diyet Fazla et tüketimi	Antioksidan vitaminler Diyette yüksek fiber
Fazla pişmiş et tüketimi	Taze meyve ve sebze
Doymuş yağ miktarının fazlalığı	NSAI ilaçlar
Fazla alkol tüketimi	
Sigara	
Sedanter yaşam	
Obezite	

2.2.3. Ailesel Kolorektal Kanser:

Famlyal Adenomatöz Polipozis (FAP): FAP kolorektal kanserlerin % 1'ini oluşturur. 30 yaşından önce kolonda yüzlerce hatta binlerce polip oluşur ve total kolektomi yapılmazsa %100 kolon kanseri gelişir. FAP'ta görülen benign kolon dışı bulgular; retinal pigment hipertrofisi, mandibular osteom, epidermal kist, adrenal adenom ve desmoid tümördür. Birlikte görülen maligniteler ise tiroid tümörleri, duodenum veya Ampulla Vateri kanseri ve beyin tümörleridir. FAP otozomal dominant geçiş gösterir. Ancak hastaların %30' u de novo mutasyon gösterir ve bilinen aile öyküsü yoktur. Kromozom analizinde 5q21 de bulunan APC "adenomatozis polipozis coli" geninde mutasyon vardır (42).

Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanseri (HNPCC): HNPCC kolorektal kanserlerin yaklaşık %3' ünü oluşturur. Kolonda yaklaşık 100 kadar polip görülür. Ortalama kanser gelişme yaşı 43' tür. HNPCC tip I ve tip II formu vardır. Tip II de birlikte mide, ince barsak, safra yolları, renal pelvis, mesane, cilt, uterus ve over kanseri görülebilir. HNPCC' li hastalarda yaşam boyu kolorektal kanser gelişme riski %80, endometrium kanseri riski yaklaşık %40 ve diğer kanserlerin gelişme riski %10' dan azdır.

HNPCC otozomal dominant geçiş gösterir. DNA "mismatch repair" geninde mutasyon olduğu saptanmıştır (43).

Muir-Torre sendromu: Otozomal dominant geçer, kolon kanseri erken yaşta gelişir, sporadik kolon kanserinden daha iyi prognozu vardır(42).

Gardner sendromu: OD geçişlidir. Kalın barsakta adenomatöz polipler, kafatası ve mandibulada osteomlar, deride keratinöz kistler, yumuşak doku 7 neoplazilerinin görüldüğü ailesel bir hastalıktır. Kolorektal kanser gelişme riski yüksektir(42).

Turcot sendromu: OD geçişlidir. Kolorektal adenomatöz poliplerle birlikte glioblastom tipi beyin tümörleri vardır(43).

Peutz-Jeghers sendromu: OD kalıtım gösterir. LKB1 gen mutasyonu mevcuttur. Ağır derecede atipi gösteren adenomatöz poliplerin bazılarında KKRK gelişebilir. Pankreas, meme, akciğer, over ve uterus kanser gelişim riski artmıştır(43).

Cowden sendromu: Mukokutanöz lezyonlar (fasyal trisilemmoma, akral keratoz ve oral mukozal papillom), kolorektal polipler ve değişik bölgelerde artmış malignite riski ile karakterize OD bir hastalıktır. 10. kromozomda lokalize PTEN geninde mutasyon vardır(42).

Cronkhite-Canada sendromu: Mide, ince barsak ve kolon boyunca, juvenil tipte jeneralize gastrointestinal polipozis ile karakterizedir. Bu poliplerde adenomatöz değişiklikler ve kolon kanseri gelişebilir. Kutanöz hiperpigmentasyon, alopesi, onikodistrofi, diyare, kanama, kilo kaybı vardır(43).

2.3. Kolorektal kanser için tarama:

Tarama için kullanılacak en uygun yöntem hakkında tartışmalar devam etmektedir. Tarama yönteminin basit, hasta uyumu kolay, sensitif, spesifik ve kost efektif olması istenir. Şu anda optik kolonoskopi en efektif ve tercih edilen tarama yöntemidir. Tarama için hastalar ortalama riske sahip ve yüksek riskli olarak iki gruba ayrılarak değerlendirilmelidir.

2.3.1. Ortalama riskli hastalar:

Kendisinde ve ailesinde adenomatöz polip ve kolon kanseri öyküsü olmayan, gizli ve aşikar kanaması olmayan, 50 yaşın üzerinde kadın ve erkek bireyler olarak tanımlanır.

Bu hastalar için önerilen tarama metotlar:

1. Gaitada gizli kan (GGK) testi: Yıllık olarak yapılması önerilir. Ardışık 3 örnekleme ile yapılmalıdır. Pozitiflik saptandığında hastaya kolonoskopi yapılmalıdır.
2. Fleksibl Sigmoidoskopi: 5 yılda bir yapılması önerilir.
3. GGK testi ve Sigmoidoskopi: Yıllık GGK testi ve 5 yılda bir sigmoidoskopi kombinasyonu yapılabilir.
4. Kolonoskopi: 10 yılda bir yapılması önerilir.

2.3.2. Yüksek Riskli Hastalar:

1. Aile öyküsü : Birince derece yakınlarından birine (kardeş, anne, baba, çocuk gibi) 60 yaşından önce kolon kanseri veya adenomatöz polip tanısı konmuş kişiler veya birinci derece yakınlarından 2 kişiye herhangi bir yaşta kolon kanseri tanısı konmuş kişiler olarak tanımlanır. Bu hastalara 40 yaşında veya tanı konan aile bireyinin yaşından 10 yıl daha genç yaşta başlayarak 5 yılda bir kolonoskopi yapılması önerilir.

2. FAP: 10-12 yaşlarından başlayarak fleksibl sigmoidoskopi ve üst endoskopi yapılması önerilir.

3. HNPCC: 20-25 yaşlarında başlayarak 1-2 yılda bir kolonoskopi yapılmalıdır. Ayrıca uterus ve over kanseri açısından da tarama yapılmalıdır.

4. Adenomatöz polip saptanan kişiler:

- a) Bir veya daha fazla büyük ve sesil polip, malignite saptanmışsa veya kolonoskopi optimal yapılamamışsa kısa süre sonra kolonoskopi tekrarlanmalıdır.
- b) Üç veya daha fazla polip saptanmışsa 3 yıl içinde kolonoskopi yapılmalıdır.
- c) Bir cm'den küçük 1-2 polip saptanmışsa 5 yıl sonra kontrol kolonoskopi yapılmalıdır.

5. Kolorektal kanser tanısı olan hasta:

- a) Tanı anında yapılan kolonoskopi obstrüksiyon nedeniyle tamamlanamamışsa cerrahiden sonra 6 ay içinde tekrarlanmalıdır.
- b) Tanıda kolonoskopi yapılmışsa 3 yıl içinde kontrol yapılmalı, eğer normalse sonraki kontrol 5 yıl sonra yapılmalıdır (44).

2.4. Evreleme

KRK evrelendirilmesi ilk defa 1930 yılında Dukes tarafından yapılmıştır. 1954 yılında Dukes sınıflaması gözden geçirilerek modifiye edilmiştir. Amerikan Kanser Birliği [American Joint Committee on Cancer (AJCC)] ve Uluslararası Kanser Birliği [Union Internationale Contrele Cancer (UICC)] TNM evreleme sistemini geliştirmişlerdir (45). TNM evreleme sistemine göre değerlendirildiğinde kolon ve rektum kanserleri evrelerine göre benzer sağkalım gösterdikleri için ikisi için de aynı evreleme sistemi kullanılmaktadır (46). AJCC tarafından önerilen ve 2010 yılında güncellenen patolojik TNM evreleme sistemi ve evrelere özgü beş yıllık sağ kalım oranları tabloda özetlenmiştir (Tablo 1 ve 2).

Primer Tümör Boyutu (T)

Tx: Primer tümör değerlendirilemedi

T0: Primer tümör ile ilgili kanıt yok

Tis: Karsinoma in-situ

T1: Tümör submukozaya invaze

T2: Tümör muskularis propriaya invaze

T3: Tümör muskularis propriadan perikolorektal dokulara uzanım göstermekte

T4a: Tümör visseral periton yüzeyine kadar uzanmış

T4b: Tümör komşu organ ve dokulara invaze

Bölgesel Lenf Nodları (N)

Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: Bir-üç lenf nodu metastazı var

N1a: Bölgesel bir lenf nodu metastazı

N1b: Bölgesel iki-üç lenf nodu metastazı

N1c: Bölgesel lenf nodu metastazı olmadan non-peritonize perikolik veya perirektal dokularda veya subserozal, mezenterik tümör depozit(ler)i varlığı

N2: Dört veya daha fazla lenf nodu metastazı

N2a: Bölgesel dört-altı lenf nodu metastazı

N2b: Bölgesel yedi veya daha fazla lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz (M)

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

M1a: Bir organ veya bölgede (örn; karaciğer, akciğer, bölgesel olmayan lenf nodu) metastaz

M1b: Birden fazla organ/bölge veya periton metastazı var

Tablo 1. Kolorektal Kanserde TNM evreleme sistemi

EVRE	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1-N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1-N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Herhangi T	Herhangi N	M1a
IVB	Herhangi T	Herhangi N	M1b

Tablo 2. SEER programı 2010 verilerine göre evreye göre 5 yıllık rölatif sağ kalım oranları (47).

Evre	5 yıllık sağkalım oranları (%)
I	97.1
IIA	87.5
IIB	71.5
IIIA	87.7
IIIB (T1-T2, N2)	75
IIIB (T3, N1)	68.7
IIIC (T3, N2)	47.3
IIIC (T4, N1)	50.5
IIIC (T4, N2)	27.1

2.5. Programlı Hücre Ölümü Modelleri

Programlı hücre ölümü modelleri 1990' lı yıllarda Clarke tarafından üç ayrı grupta tanımlanmıştır. Apoptozis tip I, Otofaji tip II, lizozomal olmayan hücre ölümü tip III hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (48).

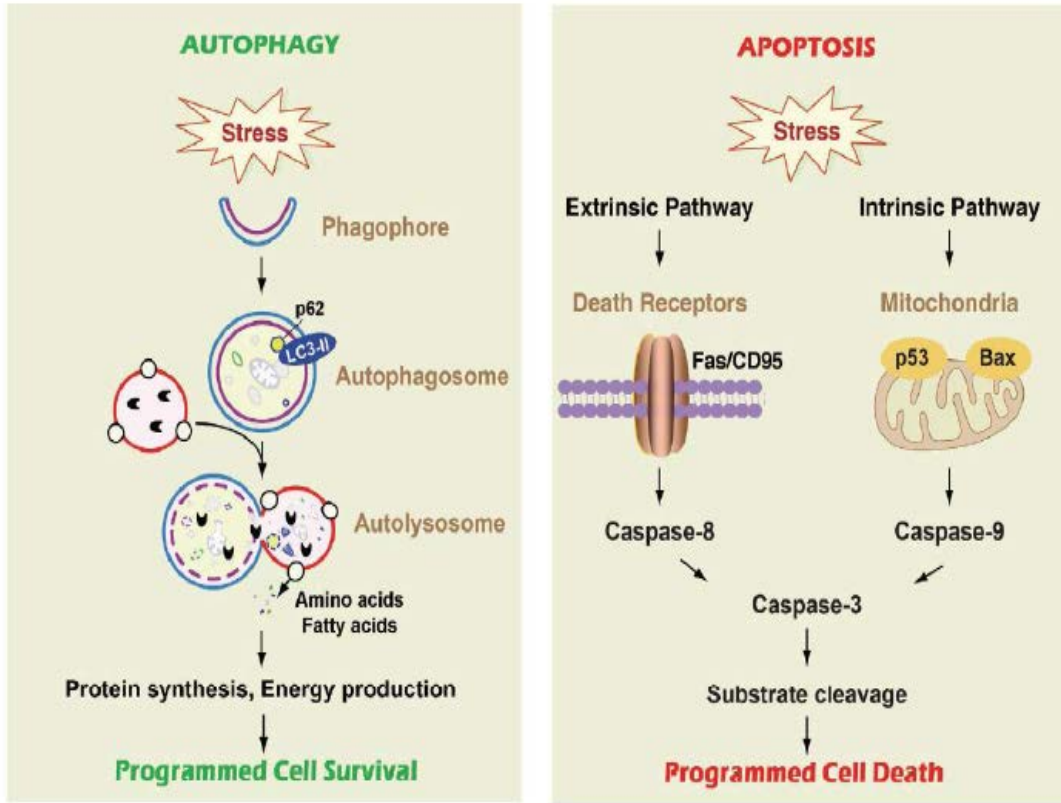
2.5.1. Apoptozis:

Programlı hücre ölümü mekanizması olarak en iyi bilinen model olan apoptozisde hücre büzüşmesi ve kromatin yoğunlaşması oluştuktan sonra Kaspaz adı verilen proteazlar aracılığı ile hücre DNA'sı ve diğer proteinler parçalanarak apoptotik cisimler oluşturulur. Bu apoptotik cisimler diğer hücreler tarafından fagosite edilerek ortamdan uzaklaştırılır (48).

2.5.2. Otofaji:

Otofaji kendi kendini yeme anlamına gelir ve hücrelerin fizyolojik koşullarda açlık durumunda besin elde etmek için hücre içindeki yapıları parçalaması anlamında kullanılmaktadır. Böylece hücre içi moleküllerin geri dönüşümü sağlanmakta ve homeostazis korunmaktadır (49).

Apoptozis ile Otofaji arasında temel bazı farklar Şekil 1 de gösterilmiştir.



Şekil 1. Apoptozis ve Otofaji arasında farklar. (50)

Programlı hücre sürviyi olarak da adlandırılan otofaji, hücresel homeostasis, enerji dengesi, gelişme ve hücresel defans gibi normal insan fizyolojisinin devamı için kritik öneme sahiptir (51,52). Aynı zamanda otofaji iki tarafı keskin kılıç gibidir. Kanseri, nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma, kas hastalıkları, enfeksiyon hastalıkları ve immün sistem hastalıklarının patogeneğinde de rol oynayabilir (53,54).

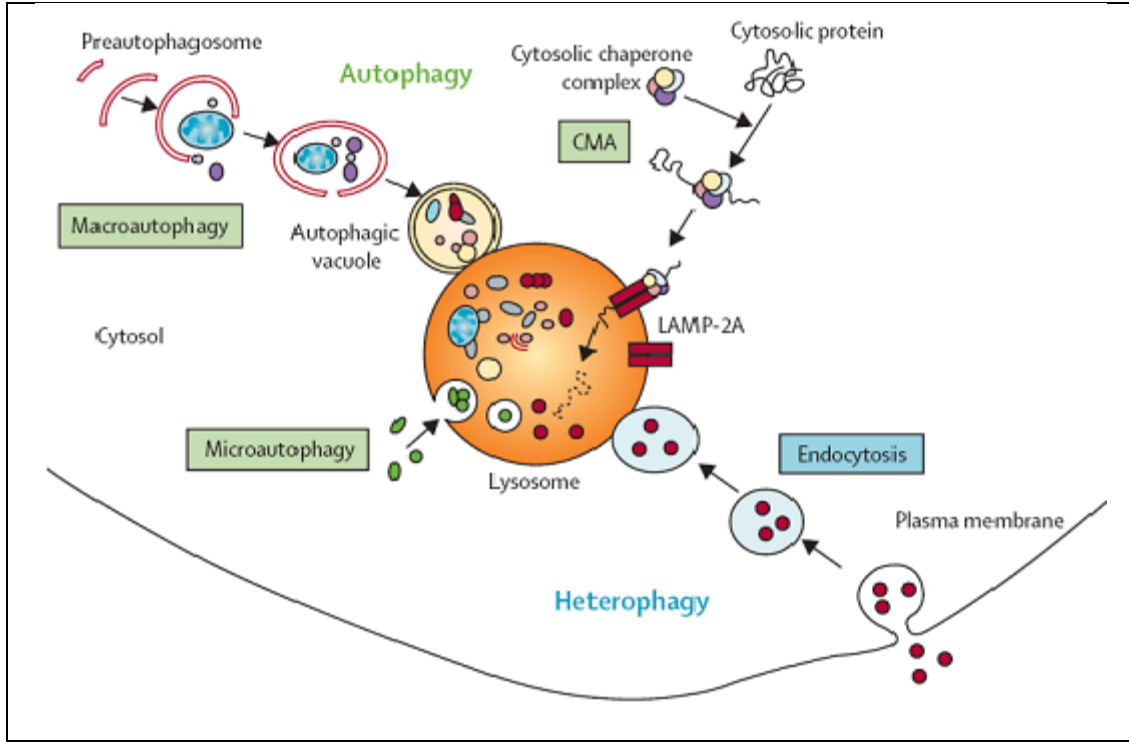
Hücre içinde oluşan atıklar ve biriken maddeler asit hidrolaz enzimi içeren lizozomlar aracılığı ile parçalanırlar. Otofaji, hasarlanmış organeller ve uzun ömürlü sitoplazmik proteinlerin lizozomlar aracılığı ile ortamdan uzaklaştırılmasını sağlar (55). Hücre içerisinde bazal düzeyde otofaji, protein ve organellerin döngüsü ile homeostazise katkıda bulunurken, artan hücresel stres durumunda hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bir mekanizmadır (53). Kanser ile otofaji ilişkisi hala oldukça tartışmalıdır. Otofaji, kanser gelişimi esnasında tümör supresör etki gösterirken, kanserin progresyonu esnasında kanser hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunmaktadır (56).

Kanser tedavisindeki yeni gelişmelere rağmen, bir çok kanser türünde kemoterapi ve radyoterapiye yeterli yanıt alınamamakta ve tedaviye rağmen progresyon gelişmektedir (57). Kanser tedavisi esnasında hem normal hücrelerde hem de kanser hücrelerinde otofaji artmaktadır. Fakat normal hücrelerden ziyade kanser hücreleri hayatta kalmak için otofajiyi daha fazla kullandıkları için bu durum yeni tedavi fırsatları oluşturabilir (58).

En az üç ayrı otofaji mekanizması tanımlanmıştır (59). Bunlar:

1. Makrootofaji: Protein ve hasarlanmış hücre organellerinin parçalanmasını sağlar. Otofagozom oluşumu ile gerçekleşir.
2. Şaperon aracılı otofaji: Sitoplazmada işaretlenen proteinler lizozoma taşınır.
3. Mikrootofaji: Lizozom membranının invaginasyon, protrüzyon ve septasyonu ile gerçekleşir.

Şekil 2'de otofaji mekanizmaları gösterilmiştir.



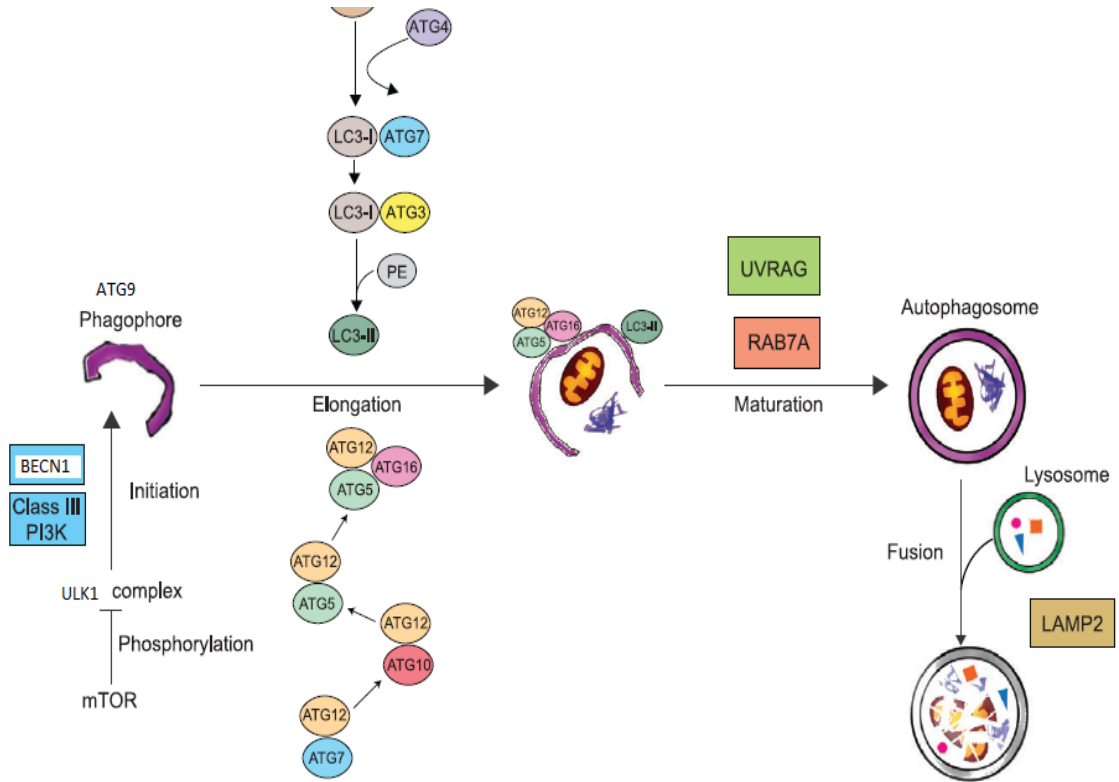
Şekil 2. Otofaji Mekanizmaları (59).

Otofaji dendiğinde genel olarak makrotofaji kastedilmektedir. Otofaji ile bağlantılı proteinler (autophagy related proteins; Atg proteinleri) ilk olarak mayalarda yapılan araştırmalarda saptanmıştır. Günümüzde 30'dan fazla Atg geni tanımlanmıştır (60).

Otofajik yıkım işlemi 4 fazda gerçekleşir (şekil 3).

1. İndüksiyon fazı: Besin, oksijen, hormonlar, büyüme faktörleri ve enerji azlığı durumlarında, kemoterapi ve radyoterapi tedavilerinin uygulanması nedeniyle oluşan hücrel stres algılanmasında işe karışan sinyal kaskadları aracılığıyla başlar.
2. Elongasyon fazı: Otofagofor olarak bilinen izolasyon membranı sitoplazma veya organellerin bir kısmını çevreler ve böylece otofagozom denen çift membranlı yapıyı oluşturur.

3. Maturasyon ve füzyon fazı: Dış membran endozom ya da lizozom ile birleşir ve otolizozom oluşumu ile sonuçlanır.
4. Degradasyon fazı: İç membran, protein ve organel içeriği (otofajik cisim) lizozom enzimleriyle yıkılır ve yeniden sıklusa girer (61).



Şekil 3. Otofaji basamakları: Otofajik kese oluştuktan sonra uzamaya başlar. Uzama sonrasında ise geç endozom veya lizozom ile birleşerek taşıdığı yapıların parçalanmasını sağlar, yıkım sonrası açığa çıkan aminoasit ve yağ asitleri gibi yapıtaşları tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılmış olur (61).

2.5.3. Otofajinin düzenlenmesi:

Otofaji regülasyonunda en önemli uyaranlar açlık, hipoksi ve stres durumlarıdır. Memelilerde rapamycin hedefi (mTOR) bir serin tirozin kinazdır. Hücrelerde bol miktarda eksprese olur ve hücrenin büyümesinde, proliferasyonunda ve hayatta kalmasında rol almaktadır. Bunların yanı sıra kanser hücrelerinin kontrolsüz şekilde büyümesinde de rol aldığı düşünülmektedir. TOR protein kompleksi otofajinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. TOR, hücrelerde büyüme ve protein sentezini

kontrol eden bir kinazdır. TOR'un baskılanması otofajinin aktive olmasına neden olur. Açlık durumunda TOR aktivitesi düşer, Atg13 defosforile olur, Atg1 ile bağlanarak otofajiyi indükler (62).

PI3K kompleksi de hücre büyümesinde etkili sinyal yollarındandır ve Akt/PKB yolağını aktive eder. Akt'nin aktivasyonu TOR'u aktive ederek otofajiyi inhibe eder (63,64). PTEN ise PI3K/Akt yolağı ile tam tersi bir işleve sahiptir ve otofajiyi indükler. PTEN'de oluşan mutasyonlar otofajiyi baskılamaktadır (65). PI3K kompleksi Atg6 (beclin-1), Atg14, Vp15 ve Vps34 proteinlerinden oluşmaktadır, bu kompleks PI3K bağlayıcı protein ile otofajik keseciğin oluşumunu başlatmaktadır. 3-metil adenin (3-MA) PI3K'nın inhibitörüdür ve otofajiyi inhibe etmek üzere yaygın olarak kullanılır (66).

2.5.4. Otofaji üzerinde etkili olan moleküller:

Akt/PKB ve TOR yolağı: Otofajinin regülasyonunda en önemli yolağıdır. TOR yolağının aktivasyonu hücre büyümesi ve sağ kalımını sağlarken inaktive olması otofajiye yol açar. mTOR yolağı Akt/PKB yolağı ile kontrol edilir. Akt/PKB'nin aktivasyonu otofajinin inhibisyonuna yol açar (67,68). Akt/PKB aktivasyonu aynı zamanda NF-kB yolağı üzerinden apoptozisi de bloke eder (69,70).

Bcl-2 ve Bcl-XL: Anti-apoptotik proteinlerdir, hem apoptozisi hem de otofajiyi inhibe ederler. Beclin-1 üzerindeki BH3 bölgesine bağlanarak otofaji keseciği oluşumunu engellerler (71,72).

Atg4D, Atg5 ve Beclin: Bu proteinlerin proteolize uğraması apoptozisi indüklemektedir. Bu şekilde bazı otofaji proteinlerinin apoptoz yolları tarafından da kullanıldığı saptanmıştır (73,74).

p53: Apoptozisi uyarıcı etkisi olan p53; Bax, PUMA ve NOXA gibi pro-apoptotik genlerin transkripsiyonunu artırır ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinleri ise azaltır (75). p53'ün aktivasyonu mTOR yolağının inhibisyonuna ve sonuçta otofajinin aktivasyonuna yol açar (76). Çekirdekteki p53'ün otofajiyi arttırdığı, sitoplazmik p53'ün ise azalttığı gösterilmiştir (77).

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve Atg4: Hücre içinde ROS yüksekliği apoptozisi uyarırken düşüklüğünde hücre büyümesi ve sağkalımı artırır. ROS, Atg4'ü

okside ederek otofaji üzerindeki etkilerini gösterir. Okside Atg4 inaktive olur ve otofagozom oluşumu baskılanır (78).

2.5.5. Tümörögenizde otofajinin rolü:

Beclin-1 otofajinin başlangıç aşaması olan çift zarlı otofagozom oluşumu için temel otofaji proteindir ve BECN 1 geni tarafından kodlanmaktadır. Diğer otofaji proteinleri Vps34, p150, UVRAG, Bif1, Atg14L, Rubicon'un oluşturduğu büyük protein kompleksi Beclin-1 ile etkileşerek otofagozom oluşumunu sağlarlar (79,80).

BECN 1 mutant farelerde neoplastik lezyonlar, hepatosellüler karsinom, akciğer adenokarsinomu, B hücreli lenfoma gibi malignitelerin oranında artış gösterilmiştir (66,81).

Ayrıca meme, over ve prostat kanserlerinde otofaji regülasyonu için gerekli olan beclin1'in monoallelilik delesyonu ve bazı meme kanserlerinde beclin 1 düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (82,83).

Anjiyogenezisin yetersiz olduğu zamanlarda hipoksik tümör bölgelerinde otofaji aktive olur ve tümör hücresinin canlılığının devam etmesini sağlar. Besin yetersizliği durumunda otofajinin bu rolü hücrenin besin, oksijen ve büyüme faktörleri tekrar uygun hale gelene kadar zaman kazanmasını sağlar. Dolayısıyla otofaji tümör devamlılığı için gerekli bir mekanizma olarak görülmektedir (84).

Otofaji sadece açlık döneminde enerji kaynağı üreten bir mekanizma değildir, aynı zamanda hasarlanmış hücre içi organel ve proteinlerin de kontrolünü sağlar. Otofaji sayesinde hasarlanmış, toksik olabilecek protein ve organellerin hücre içinde birikmesi ve hücreye zarar vermesi engellenmiş olur. Bu durum özellikle tümör hücreleri gibi etkin olmayan aerobik glikoliz yapan ve hızlı tümör büyümesi ve metastaz nedeniyle kan akımı desteği her zaman uygun olmayan hücreler için kritik öneme sahiptir. Dokular ve tümördeki otofaji bozuklukları hücresel sağlamlılığı bozar ve hücrelerde DNA hasarı, mutasyon ve genomik instabiliteye olanak sağlar, sonuçta tümör oluşumu ve progresyonuna katkıda bulunur (58,85,86). Bu gözlemler otofaji uyarılmasının kanser oluşumunu önleyebileceğini, otofaji aracılı sağkalımın inhibisyonunun ise agresif kanserlerin tedavisinde yeni bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir.

2.5.6. Otofaji ve apoptozis arasındaki hücresel düzeyde ilişki.

Atg3, Atg5, Atg7 ve Atg9 gibi otofaji genlerinde mutasyon ya da delesyon olan farelerde yapılan deneyler otofajinin besin yokluğunda hücresel yaşam için önemini ortaya koymuştur. Bu farelerde besin yokluğunda otofajinin uyarılmadığı ve doğumdan kısa süre sonra öldükleri görülmüştür. Otofajinin açlık durumunda hücre içindeki proteinleri yıkarak enerji geri dönüşünü sağladığı ve apoptozisi engellediği bir çok çalışmada gösterilmiştir (87). Otofaji; apoptozise paralel olarak hücre ölümüne yol açabildiği gibi, apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir ya da apoptoz için bir ön koşul olabilir (88).

Bazı durumlarda otofaji ve apoptozis hücrede birbirine zıt etkiler yapabilmektedir. Bu durumda, otofaji hücre ölümüne karşı bir hayatta kalma mekanizması olarak çalışarak, apoptozisin durdurulmasına ve ölümün engellenmesine yol açmaktadır. Otofaji, metabolik stres, ilaç ya da radyasyon hasarıyla karşı karşıya kalan hücrede anormal ve hasarlı proteinlerin yok edilmesinde ve DNA'nın hasardan korunmasında önemlidir. Otofaji yokluğunda tümör hücrelerinde DNA hasarı, gen amplifikasyonu ve kromozomal anormallikler artmaktadır (89).

Otofajinin hem karsinogenezisde hem de kanser hücresinin sağ kalımında önemli rol oynadığı anlaşılmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik ilaçlar ve hedefe yönelik ilaçların otofajiyi indüklediği bilinmektedir. Bu nedenle otofajiyi bloke etmek veya indüklemek kanser tedavisinde önemli avantajlar sağlayabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmaya Ocak2015- Mart 2015 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında kolorektal kanser nedeniyle opere edilen 45 hasta dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların 30'u erkek 15'i kadın idi. Çalışma öncesinde Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulundan onay alındı. Çalışmaya katılan tüm hastalardan yazılı onam alındı.

Çalışmaya alınan hastaların demografik (yaş, cinsiyet), patolojik özellikleri (tümör lokalizasyonu, histolojik tip, diferansiyasyon, vasküler ve perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu), klinik evre ve laboratuvar sonuçları kaydedildi.

3.2. Yöntem:

3.2.1. Gen ekspresyonu:

Kullanılan Kimyasallar: TRIZOL (Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform ekstraksiyon ayırıcı)

Kloroform, %75'lik etanol, İzopropanol, DEPC-su

TRIZOL(Sigma T9424) ile RNA İzolasyonu

1. Sıvı azottan alınan doku örnekleri yine sıvı azot bulunan strafor içindeki havanda dövülerek toz haline getirilir
2. Tüp içindeki toz halini almış dokuların üzerine 1000ul trizol ayırıcı eklenir ve iyice vortekslenir
3. Vortekslendikten sonra buz üzerine alınıp 200 ul kloroform eklenir, 15 saniye vortekslenip 2-3 dk. Oda sıcaklığında bekletilir. Daha sonra 15 dk +4°C de 12000 RPM de santrifüj edilir
4. Üst faz yeni tüpe alınarak üzerine 500 ul izopropanol eklenip vortekslenir, daha sonra oda sıcaklığında 10 dk bekletilip 12000 RPM +4 °C de 10 dk. santrifüj edilir, daha sonra santrifüjden alınan üst faz pipetle alınıp atılır, dipte kalan pelletin üzerine %75'lik 750 ul soğuk etanol eklenir ve hafifçe vortekslenip 7500 RPM'de 8 dk. +4°C de santrifüj edilir.

5. Santrifüjden alınan tüplerin buz üzerine alınır ve üzerindeki alkol pipetle alınıp atılır, Pellet üzerinde kalan alkolün buharlaşması için 5 dk. Tüplerin kapağı açılır ve bekletilir, sonra üzerine 25 ul DEPC’li su ilave edilip RT-PCR yapılana kadar -80 °C de bekletilir

PCR ile cDNA Sentezi

cDNA analizine başlamadan önce her bir örnekteki total RNA miktarı örneklerin eşit reaksiyon şartlarını sağlamak için nanodrop kullanılarak tayin edildi. Buna göre her bir tüpten alınacak total RNA miktarının 1000 ng/ul olacak şekilde tüplerden belirlenen hacimlerde alınarak cDNA analizine başlanılır.

cDNA reaksiyon protokolü aşağıda verilmiştir.

Total RNA (1000ng)	x ul
DNAse Buffer (10X)	1 ul
DNAse (1u/ul)	1 ul
DEPC-water(%0.1)	~7ul

Total reaksiyon hacmi 9 ul olacak şekilde DEPC’li su ile tamamlanır ve 37 °C de 30 dk. DNAse aktivasyonu için bekletilir. Daha sonra her bir tüpe 25mM EDTA çözeltisinden 1 ul eklenerek 75 °C de 10 dk. DNAse inaktive edilir.

Toplam hacim 10 ul olan RNA miksi elde edilerek üzerine aşağıdaki miktarlarda reaktifler eklenerek PCR cihazında cDNA sentezi yapılır.

RNA miksi	10 ul
5X RN Buffer	4 ul
RT enzim (200u/ul)	0.1 ul
Ri Bolock enzim (40u/ul)	0.2 ul
dNTP miksi (10mM)	0.5 ul
DEPC-water	~5.2ul

Total hacim 20 ul olan mix aşağıdaki protokole göre çalışan PCR cihazına konularak cDNA elde edilir

cDNA sentez programı:

10 dk. 25 °C

60 dk. 37 °C

10 dk. 70 °C

Sonsuz 4 °C

Elde edilen cDNA kantitatif RT-PCR'ı yapılana kadar -20 °C'de saklanır.

QPCR ile ATG5, ATG12 ve BECLIN Genlerinin Kantitasyonu

Kullanılan Kimyasallar: cDNA, ATG5, ATG12, BECLIN ve GAPDH genlerinin primerleri, SYBR Green Master Mix

ATG5 Forward Primer: TCA GCC ACT GCA GAG GTG TTT

ATG5 Reverse Primer: AGC CAC ATC GCT CAG ACA C

ATG12 Forward Primer: CAG TTT ACC ATC ACT GCC AAA A

ATG12 Reverse Primer: ACA AAG AAG TGG GCA GTA GAG C

BECLIN Forward Primer: AGG TTG AGA AAG GCG AGA CA

BECLIN Reverse Primer: GCT TTT GTC CAC TGC TCC TC

GAPDH Forward Primer: AGC CAC ATC GCT CAG ACA C

GAPDH Reverse Primer: GCC CAA TAC GAC CAA ATC C

GAPDH geni referans gendir.

Elde edilen cDNA'lar Hyclone su ile 1:5 oranında seyreltilir.

Her bir gen için ayrı ayrı miks hazırlanır. Mikste kullanılan reaktiflerin miktarları aşağıda verilmiştir.

Forward Primer (10uM): 0.5 ul

Reverse Primer (10 uM): 0.5 ul

Hyclone su 6.5 ul

cDNA 5 ul

SYBR Green mix 12.5 ul

Total hacim 25 ul olur ve qPCR cihazına (LC480 ROCHE) yüklenir. qPCR protokolü aşağıda verilmiştir

Pre inkübasyon	95 °C	10dk.
Amplifikasyon (40 cycle-döngü)	95 °C	15 san.
	60 °C	1 dk.
Denatürasyon	95 °C	1 dk.
	55 °C	1 dk.
	55 °C	10 san. (80 cycle-döngü)
Soğutma	40 °C	30 dk.

Referans ve hedef genlerin cihazdan elde edilen cycle threshold (Ct) değerleri ile birbirine göre kaç kat arttığı hesaplaması yapılarak kantitasyon değerlendirilmesi yapılır. Örnek hesaplama aşağıda verilmiştir:

Referans gen	Hedef gen	
1.örnek Ct: 20	Ct:32	Delta(Ct): 20-32: 12
2.örnek Ct: 18	Ct:33	Delta(Ct): 18-33: 15
3.örnek Ct: 16	Ct: 35	Delta(Ct): 16-35: 19*

Büyük olan delta(Ct) değeri kalibratör seçilerek hesaplama yapılır. Formülleri aşağıda verilmiştir.

$$\Delta Ct1 = Ct (\text{Hedef gen-tümör}) - Ct (\text{Referans gen -tümör})$$

$$\Delta Ct2 = Ct (\text{Hedef gen-nontümör}) - Ct (\text{Referans gen-nontümör})$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct1 (\text{tümör}) - \Delta Ct2 (\text{nontümör})$$

$$\text{Normalize edilen hedef gen ekspresyonu: } 2^{\Delta \Delta Ct}$$

ATG5, ATG12 ve BECLIN Genlerinin Protein Analizi

Kullanılan Kimyasallar:

RIPA solüsyonu ((50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 0.25 % Na-deoxycholate)

PMSF solüsyonu: 1 mM phenylmethysulfonyl flüoride

BSA: Bovine Serum Albumin

Bradford çözeltisi; 25 mg Coomasie brilliant blue G-250, 12.5 ml %95 etanolde çözündürülüp, 25 ml %85 fosforik asit (H₃PO₄) eklenir. Bu boya çözeltisi 250 ml'ye tamamlanır. Kullanılacağı zaman 5 kere sulandırılır. Whatman no.1 filtreden geçirilir ve bir cam şişede, oda sıcaklığında saklanır. Kullanılmadan kalan Bradford stok çözeltisi ortalama 1 yıl 4°C'de saklanabilir.

Jel yükleme loading dye: 2,4 ml 1M Tris-HCL(pH:6.8), 3 ml %20 SDS, 3 ml Gliserol(%100), 1,6 ml Beta-merkaptoetanol, Bromfenol Blue (%1) (koyu mavi olana kadar Blue boyasından eklenir, yaklaşık 100 ul)

Western Blott Transfer Buffer: 400 ml 10X Tris-Glisin(pH:8.3), 800 ml metanol, 7,5 ml %20 SDS, bu karışım su ile 4 litreye tamamlanır.

1X PBT Solüsyonu: 400 ml 10X PBS, 2 ml Tween-20, distile su ile 4 litreye tamamlanır.

10X PBS (pH:7,4): 320 g NaCL, 8 g KCL, 56,8 g Na₂HPO₄, 10,9 g KH₂PO₄, pH'ı ölçülerek 4 litreye distile su ile tamamlanır.

Western Blott Running Buffer: 400 ml 10X Tris-Glisin (pH:8.3), 20 ml %20 SDS, distile su ile 4 litreye tamamlanır.

Antikor Bağlama için RED Solüsyon: %0,05 PBS-Tween, %5 BSA, %0,02 Na-Azide, 20mg fenol-red

ECL Buffer: 2 membran için; 700 ul Tris-HCL 1M pH:8.8 su ile 10 ml'ye tamamla. Karanlık odada bunun üzerine 50 ul luminol, 25 ul coumarik asit ve 3 ul distile su ilave edilerek 5 dk. beklenir. Sonra develop, fix ve su ile yıkanır.

3.2.2 Protein İzolasyonu:

Tüpteki miktarlara göre RIPA solüsyonu konularak homojenizasyon çubukları ile buz üzerinde ezilir. İyice çözündükten sonra maksimum hızda(14000 rpm) 15 dk. Santrifüj edilir. Üstteki yağ tabakası ve en alttaki pelet kısım arasındaki süpernatant alınır.

Proteinler bu süpernatant içindedir. Total protein miktarının spektroda belirlenmesi için yeni tüp içerisine bu süpernatanttan 1 ul alınarak üzerine 29 ul distile

su ilave edilir. Bu yeni heterojen karışımdan 10 ul alınarak üzerine 190 ul Bradford çözeltilisi ilave edilerek spektrometrede 595 nm dalga boyunda ölçüm yapılır.

Ölçüm öncesi standart bir eğri çizmek için derişimi bilinen BSA'nın (1ug/ul) farklı konsantrasyondaki miktarları hazırlanarak (örneğin 0,1 ug/ul, 0,2 ug/ul, 0,3 ug/ul, 0,4 ug/ul ve kör örnek olarak saf su kullanılır) 595 nm'de örneklerle birlikte protein ölçümü yapılır.

Her bir örneğin total protein miktarı spektrofotometrede ölçüldükten sonra SDS-PAGE jele eşit yüklenecek olan her bir örneğin ul'de 50 ug olacak şekilde alınacak örnek hesaplaması yapılır. Alınacak örnek hesabı yapıldıktan sonra jel dökümüne geçilir.

%5'lik üst ve %15'lik alt jel western blottaki jel haznesine dökülerek her bir örneğe yükleme öncesi Beta-merkaptotanol içeren loading dye yükleme boyasından 7,5 ul eklenerek hafif vortekslenip 95 °C de 10 dk. Protein denatürasyonu için işlem yapılarak örnekler jele yüklenir. Örnekler marker'ın açılması için yaklaşık 3 saat 85 Voltaj altında yürütülür.

Daha sonra transfer bufferda bekleyen 2 adet whatman kağıdı ıslak süngerin üzerine alınır ve bunun üzerine jeldeki marker sağda olacak şekilde jel whatman kağıdının üzerine konur. Jelin üzerine ise transfer buffer ile ıslatılmış transfer membran konulup üzerine transfer buffer ile ıslatılmış sünger konularak sabit akımda 250 mA (Voltaj 200-250) western blotta 70 dk transfer için yürütülür.

Transfer sonunda transfer membran %5'lik sütlü PBT buffer içinde 1 saat shaker'da bekletilir. Sütlü buffer dökülerek 3 defa 5'er dk 1X PBT buffer(sütsüz) ile yıkanır. Transfer membrana 1.cil antikor bağlamak için; 1ul 1.cil antikordan 2000 ul kırmızı solüsyona ilave edilerek transfer membranın üzerine dökülür ve 1 gece +4 °C de shaker üzerinde muamele edilir.

Ertesi gün 1.cil antikor dökülür ve 3 defa 5, 10, 5 dk lık süreler ile 1X PBT ile yıkanır. Sonra %5 lik yağsız süt olan PBT bufferdan 10 ml'ye 2.cil antikordan 1 ul konularak 1 saat shaker'da muamele edilir. Sonra 3 defa 5'er dk. PBT ile 4. Defa 10 dk. PBS ile yıkanır.

Daha sonra karanlık odada transfer membranın filmi çekilir. Bunun için membran film kasetine yerleştirilip üzerine ECL buffer eklenir, 5 dk sonra develop

solüsyonu, fix solüsyonu ve sudan geçirilerek film kasetinde bantlar gözlenir. Filmdeki bantlar yorumlanır.

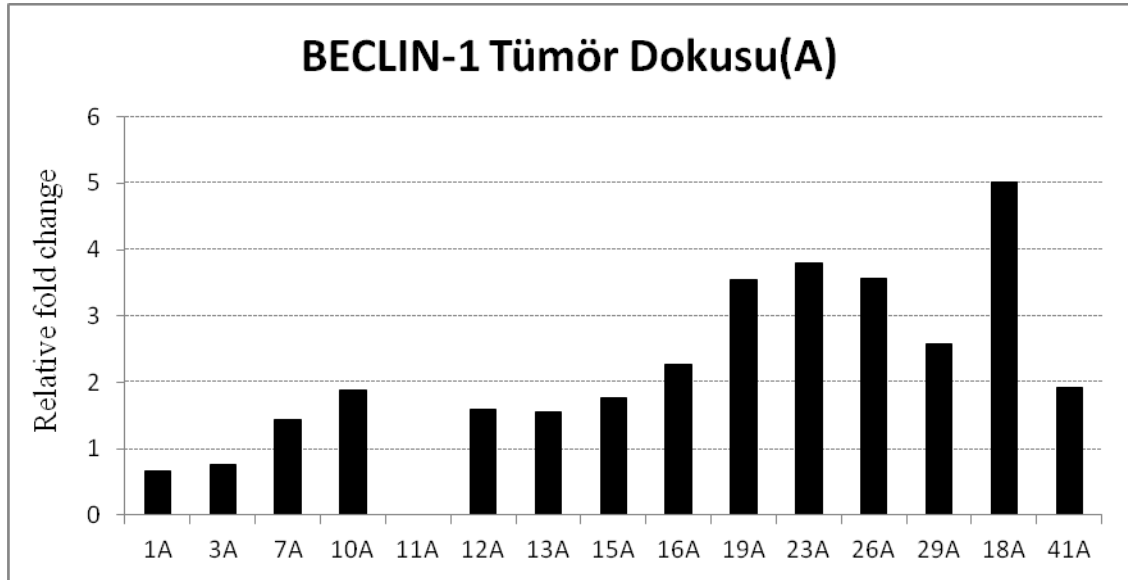
İstatiksel Analiz: Verilerin istatiksel analizinde Microsoft Windows ile uyumlu SPSS paket programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler, kategorik ölçümler için sayı ve yüzde (%) olarak, sürekli ölçümler için ise ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Gruplar arasında sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında dağılımlar kontrol edilerek, değişken sayısına göre normal dağılım gösteren parametreler için one-way Anova testi kullandı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki Kare test istatistiği kullanıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya Ocak2015- Mart 2015 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında kolorektal kanser nedeniyle opere edilen 45 hasta dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların 30'u erkek 15'i kadın idi. Çalışma öncesinde Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulundan onay alındı. Çalışmaya katılan tüm hastalardan yazılı onam alındı.

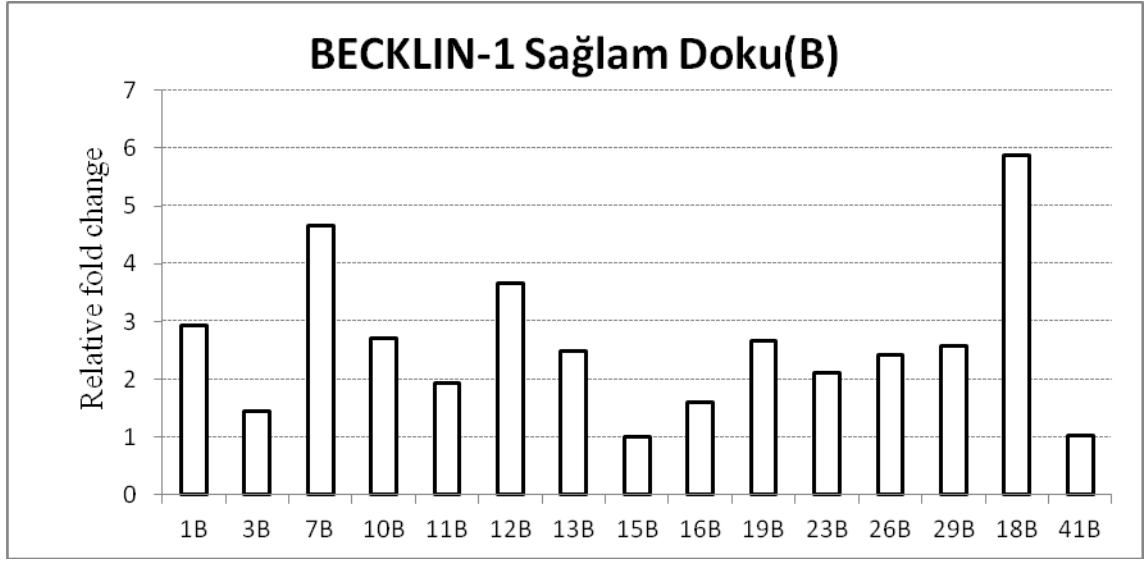
Çalışma için 20 hasta seçildi. 15 (%75) tanesinin histolojik grade' i düşük 5(%25) tanesinin ise histolojik grade'i yüksekti. Bu hastaların hem tümör dokularında hem de sağlam dokularında SYBR Green qPCR ile ATG5 , ATG12 ve Becklin-1 ekspresyonları analiz edildi. Referans ve hedef genlerin cihazdan elde edilen cycle threshold (Ct) değerleri ile birbirine göre kaç kat arttığı hesaplaması yapılarak kantitasyon değerlendirilmesi yapıldı. GAPDH geni referans alındı ve sonuçlar 15 numaralı hastanın sağlam dokusuna göre normalize edildi.

Gen ekspresyonunun cDNA sentez evresi öncesinde 1 tane (%5) düşük histolojik grade, 1 tane de (%5) yüksek histolojik grade dokunun nanodropla yapılan ölçümünde yetersiz RNA miktarı saptanması üzerine bu hastalar çalışma dışı bırakıldı.



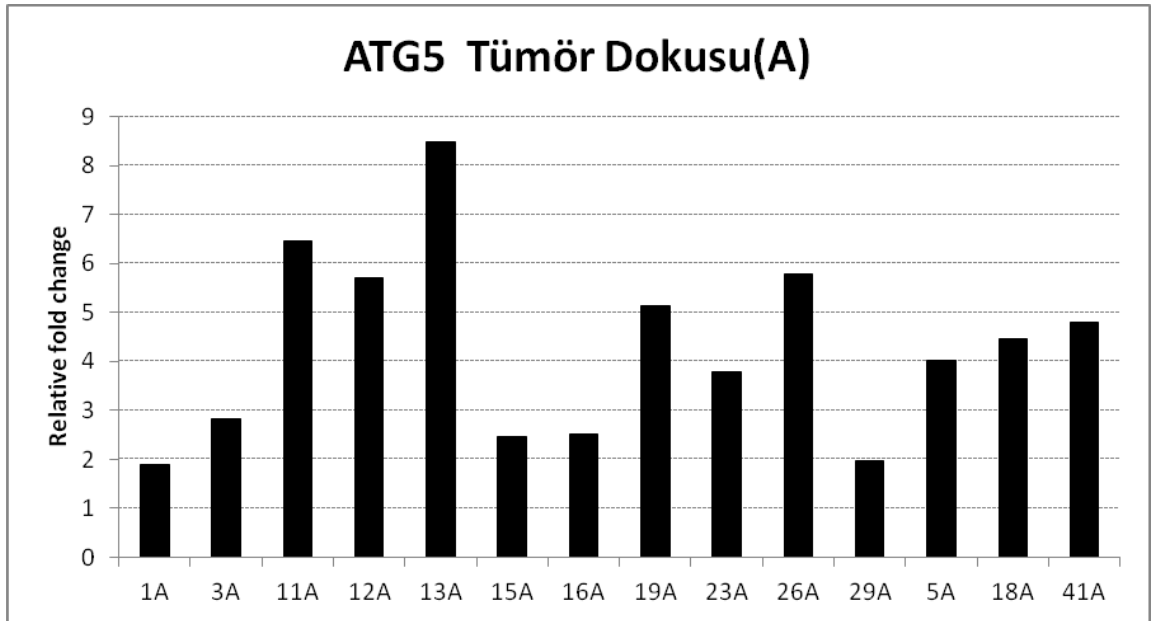
Şekil 4. Tümör dokusunda Becklin1 gen ekspresyonu

4 hastanın (%20) tümör dokusunda Beclin-1 ekspresyonu saptanmadı (Şekil 4). Bu hastaların 1 tanesi(%5) yüksek histolojik grade, 3 tanesi(%15) düşük histolojik grade'e sahipti.

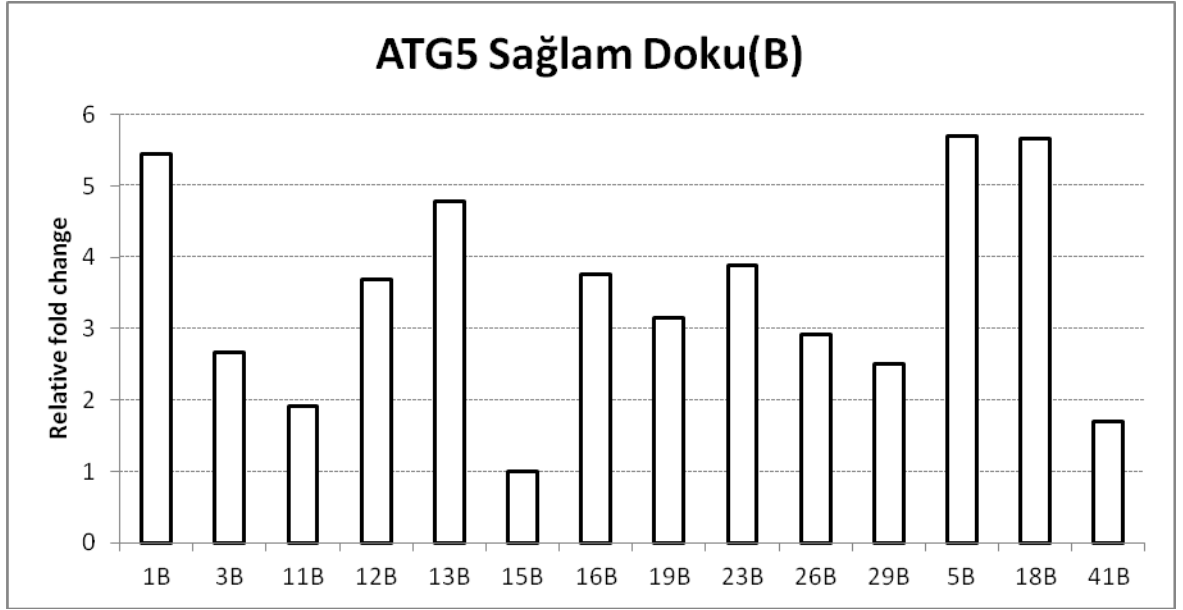


Şekil 5. Sağlam dokuda Becklin-1 gen ekspresyonu

3 hastanın ise sağlam kolon dokusunda Beclin-1 gen ekspresyonu saptanmadı (Şekil 5). Bunların 1 tanesi (%5) yüksek histolojik grade'e sahipken , 2 tanesi(%10) düşük histolojik grade'e sahipti.

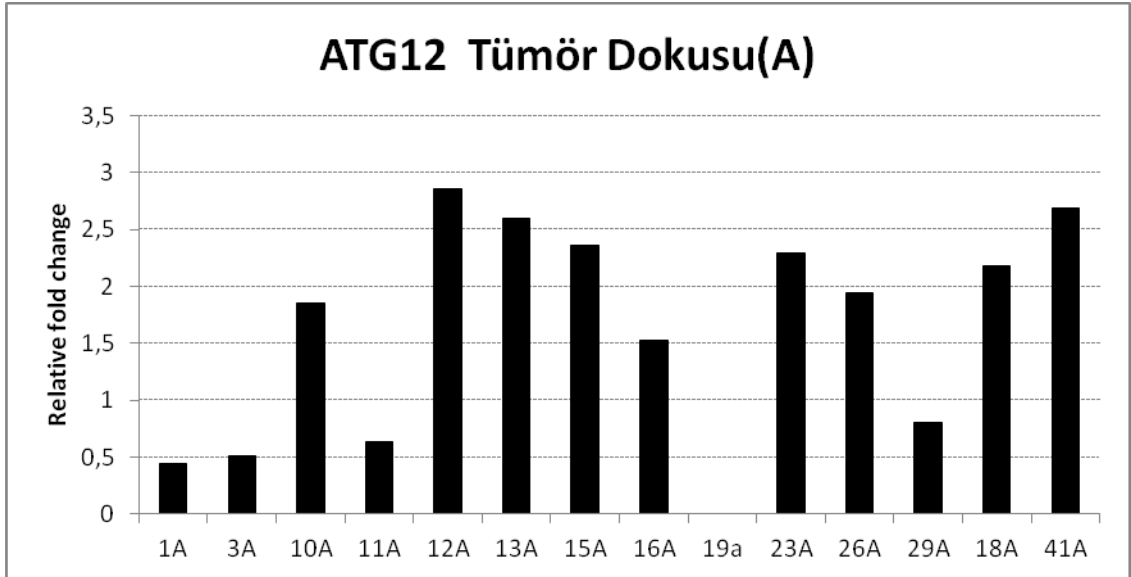


Şekil 6. Tümör dokusunda ATG5 gen ekspresyonu



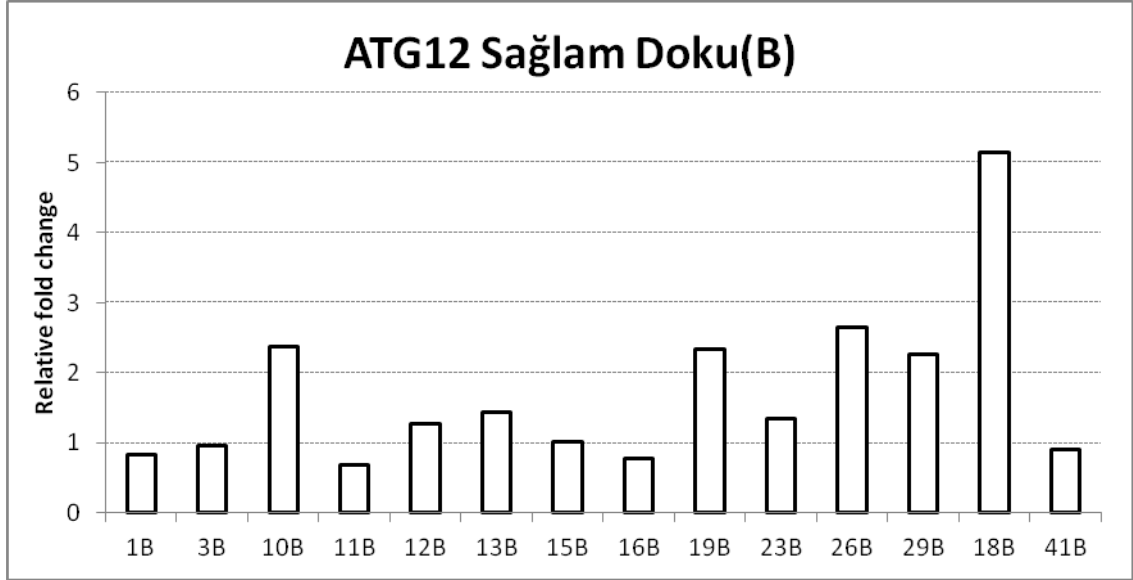
Şekil 7. Sağlam Dokuda ATG5 gen ekspresyonu

Dokular içerisinde 4 tane(%20) düşük histolojik gradeli örnekte ATG5 gen ekspresyonu saptanmadı.(Şekil 6-7)



Şekil 8. Tümör dokusunda ATG12 gen ekspresyonu

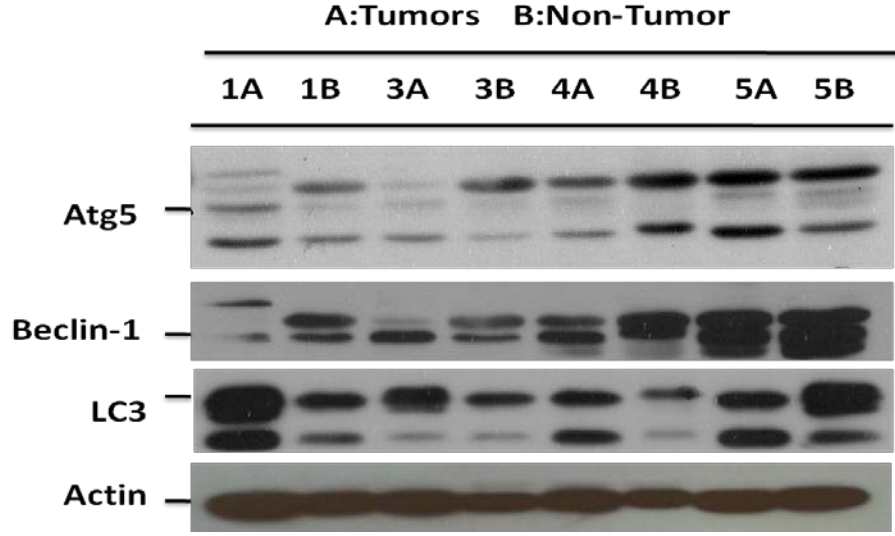
5 hastanın(%25) tümör dokusunda ATG12 gen ekspresyonu saptanmadı(Şekil 8). Bunların 4 tanesi (%20) düşük histolojik grade iken 1 tanesi(%5) yüksek histolojik grade'e sahipti.



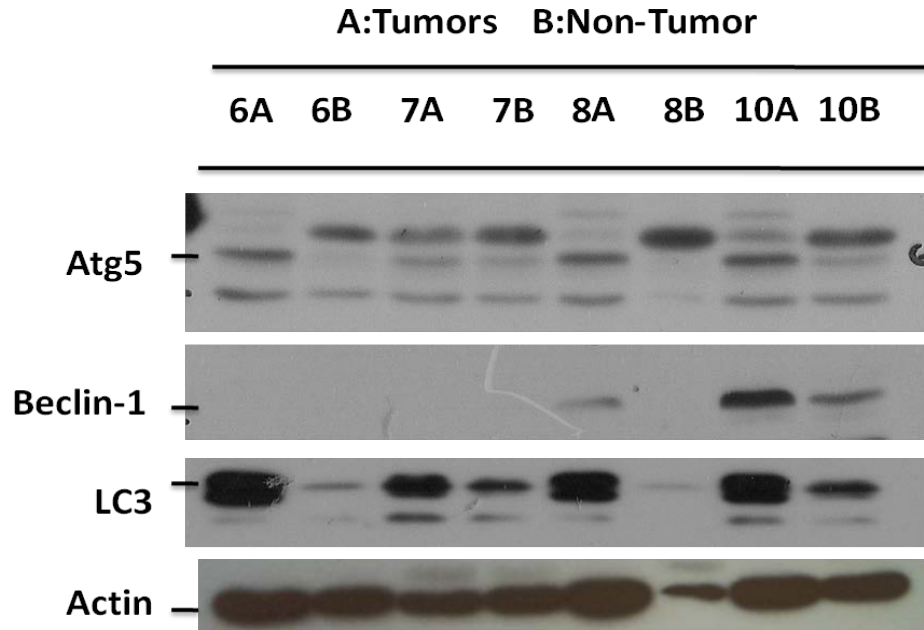
Şekil 9. Sağlam Dokuda ATG12 gen ekspresyonu

4 hastanın(%20) tümör dokusunda ATG12 gen ekspresyonu saptanmadı(Şekil 9). Bunların 3 tanesi (%15) düşük histolojik grade iken 1 tanesi (%5) yüksek histolojik grade'e sahipti.

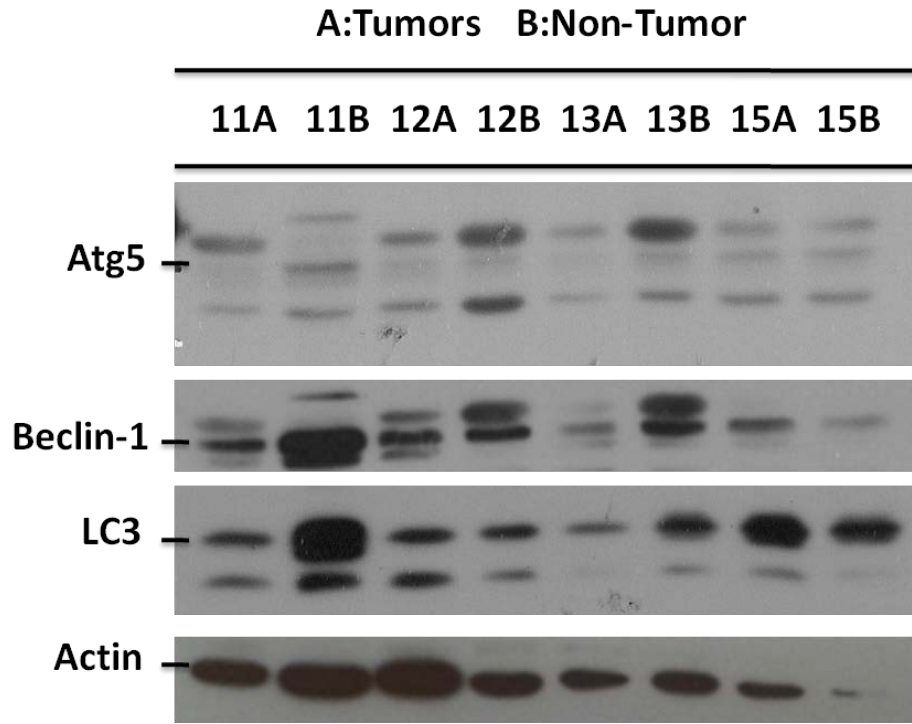
Western Blot yöntemiyle de ATG5 ve Beclin-1 protein ekspresyonları analiz edildi(Şekil 11-12-13-14)



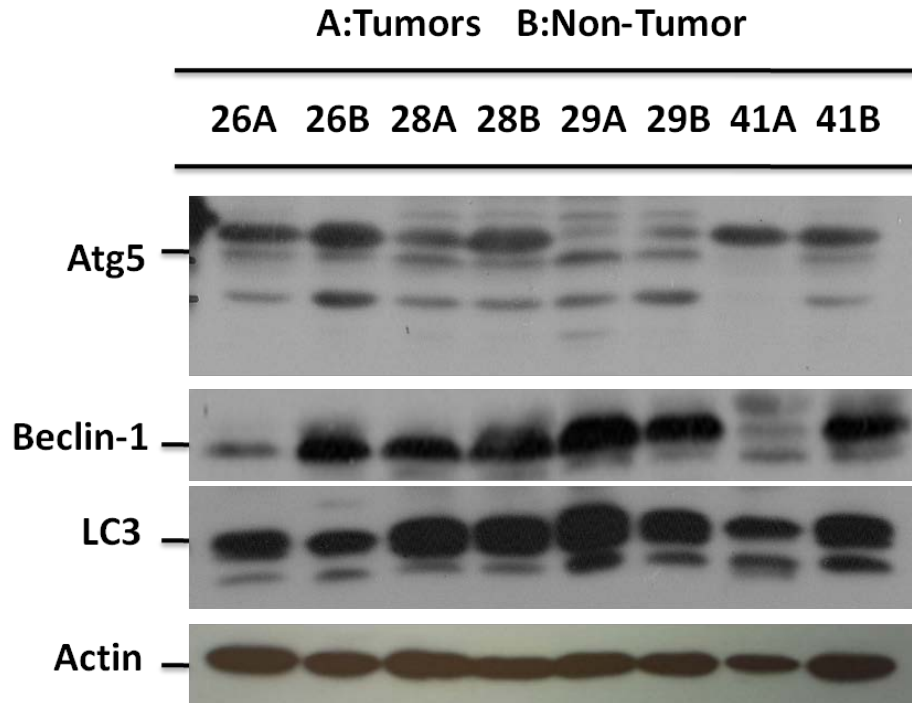
Şekil 10. Protein ekspresyonu -1 (Bant Görüntüsü)



Şekil 11. Protein ekspresyonu -2 (Bant Görüntüsü)



Şekil 12. Protein ekspresyonu -3 (Bant Görüntüsü)



Şekil 13. Protein ekspresyonu -4 (Bant Görüntüsü)

Çalışmaya alınan hastaların demografik, patolojik ve laboratuvar verileri Tablo 3-4 'de verilmiştir.

Tablo 3. Demografik , klinik ve patolojik veriler -1

		n	%
<u>Cinsiyet</u>			
	Kadın	15	%33.33
	Erkek	30	%66.66
<u>Lokalizasyon</u>			
REKTUM		18	40,0
ÇEKUM		5	11,1
ÇIKAN		9	20,0
SİGMOİD		10	22,2
İNEN		1	2,2
TRANSVERS		2	4,4
<u>Histoloji</u>			
ADENOKARSİNOM		41	%91,1
MÜSİNÖZ ADENOKARSİNOM		1	%2,2
<u>Lenfovasküler İnvazyon</u>			
VAR		37	%82,2
YOK		5	%11,1
<u>Perinöral İnvazyon</u>			
VAR		20	%44,4
YOK		22	%48,8
<u>Histolojik Grade</u>			
YÜKSEK		5	%11,1
DÜŞÜK		36	%80

Tablo 4. Demografik , klinik ve patolojik veriler -2

<u>Laboratuvar</u>	Minimum	Maksimum	Mean	Standart Deviasyon
Hb(gr/dl)	7,80	16,20	11,7533	1,79654
Htc(%)	24	45	35,32	4,861
CRP(mg/dl)	0	28	4,62	7,424
CEA(ng/ml)	1	114	13,89	26,767
Ca125(U/ml)	3	658	37,39	103,927
Ca19-9(U/ml)	1	2240	67,33	333,103
Ca72-4(U/ml)	1	18	5,62	4,716

Hastaların cinsiyet ve histolojik grade arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 5).p değeri 0.317 olarak saptandı

Tablo 5. Cinsiyet ve Histolojik Grade arasındaki ilişki

	Histolojik Grade	
	Düşük	Yüksek
Cinsiyet		
Kadın	11(%78,6)	3(%21,4)
Erkek	25(%92,6)	2(%7,4)
		P:0,317

Lenfovasküler invazyon ile histolojik grade arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı(Tablo 6). p değeri 0,104'dü.

Tablo 6. Lenfovasküler invazyon ve Histolojik Grade arasındaki ilişki

	Histolojik Grade	
	Düşük	Yüksek
Lenfovasküler İnvazyon		
Var	33(%91,7)	3(%8,3)
Yok	3(%60)	2(%40)
		P:0,104

Perinöral invazyon ile histolojik grade arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı(Tablo 7). p değeri 0,663'dü

Tablo 7. Perinöral invazyon ve Histolojik grade arasındaki ilişki

	Histolojik Grade	
	Düşük	Yüksek
Perinöral İnvazyon		
Var	17(%85)	3(%15)
Yok	19(%90,5)	2(9,5)
		P:0.663

Örnek alınan hastaların TNM evreleri Tablo-8'de gösterilmektedir.

Tablo 8.- Hastaların TNM evreleri

Evre	Sayısı	Yüzde
1	12	26,6
2	15	33,3
3	8	17,8
4	7	15,6
Total	42	93,3
Bilinmeyen	3	6,7
Total	45	100,0

Hastaların TNM evreleri ve perinöral invazyon arasındaki ilişki anlamlı olarak saptandı(Tablo 9). p değeri 0.014'dü.

Tablo 9. TNM evreleri ve perinöral invazyon arasındaki ilişki

		TNM Evre(AJCC)				
		1	2	3	4	Toplam
Perinöral İnvazyon	YOK	11(%26,2)	6(%14,3)	3(%7,1)	2(%4,8)	22(%52,4)
	VAR	1(%2,4)	9(%21,4)	5(%11,9)	5(%11,9)	20(%47,6)
Toplam		12(%28,6)	15(%35,7)	8(%19)	7(%16,7)	42(%100)
						P:0,014

Hastaların TNM evreleri ve lenfovasküler invazyon arasında anlamlı bir ilişki mevcuttu(Tablo 10). p değeri 0.003'dü.

Tablo 10. TNM evreleri ile lenfovasküler invazyon arasındaki ilişki

		TNM Evre(AJCC)				
		1	2	3	4	Toplam
Lenfovasküler İnvazyon	YOK	5(%11,9)	0	0	0	5(%11,9)
	VAR	7(%16,7)	15(%35,7)	8(%19)	7(%16,7)	37(%88,1)
Toplam		12(%28,6)	15(%35,7)	8(%19)	7(%16,7)	42(%100)
						P:0,003

SYBR Green qPCR yöntemiyle Tümör dokusunda ve sağlam dokuda saptanan Becklin-1 gen ekspresyonu ile hastaların TNM evreleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı(Tablo 11). p değeri 0.093'dü.

Tablo 11.- Becklin-1 gen ekspresyonu ile TNM evreleri arasındaki ilişki

		TNM Evre(AJCC)				
		1	2	3	4	Toplam
Beclin-1	Tümör Dokusunda Artış	2(%13,3)	1(%6,7)	2(%13,3)	1(%6,7)	6(%40)
	Non-Tümör Dokuda Artış	3(%20)	6(%40)	0	0	9(%60)
Toplam		5(%33,3)	7(%46,7)	2(%13,3)	1(%6,7)	15
						P:0.093

SYBR Green qPCR yöntemiyle Tümör dokusunda ve sağlam dokuda saptanan Becklin-1 gen ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon arasında anlamlı ilişki saptanmadı(Tablo 12). p değeri 0.756 idi .

Tablo 12. Becklin-1 gen ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon arasındaki ilişki

		Lenfovasküler İnvazyon		
		Var	Yok	TOPLAM
Beclin-1	Tümör Dokusunda Artış	5(%33,3)	1(%6,7)	6(%40)
	Non-Tümör Dokuda Artış	8(%53,3)	1(%6,7)	9(%60)
TOPLAM		13(%86,7)	2(%13,3)	15(%100)
				P:0.756

SYBR Green qPCR yöntemiyle Tümör dokusunda ve sağlam dokuda saptanan Beclin-1 gen ekspresyonu ile perinöral invazyon arasında anlamlı ilişki saptanmadı(Tablo 13). p değeri 0.329 idi .

Tablo 13. Becklin-1 gen ekspresyonu ile perinöral invazyon arasındaki ilişki

		Perinöral İnvazyon		
		Var	Yok	TOPLAM
Beclin-1	Tümör Dokusunda Artış	3(%20)	3(%20)	6(%40)
	Non-Tümör Dokuda Artış	2(%13,3)	7(%46,7)	9(%60)
TOPLAM		5(%33,3)	10(%66,7)	15(%100)
				P:0.329

SYBR Green qPCR yöntemiyle Tümör dokusunda ve sağlam dokuda saptanan ATG5 gen ekspresyonu ile hastaların TNM evreleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı(Tablo 14).p değeri 0.0552 idi.

Tablo 14. ATG5 gen ekspresyonu ile TNM evreler arasındaki ilişki

		TNM Evre(AJCC)				
		1	2	3	4	Toplam
ATG5	Tümör Dokusunda Artış	2(%14,3)	4(%28,6)	0	0	6(%42,9)
	Non-Tümör Dokuda Artış	3(%21,4)	3(%21,4)	1(%7,1)	1(%7,1)	8(%57,1)
Toplam		5(%35,7)	7(%50)	1(%7,1)	1(%7,1)	14(%100)
						P:0,552

SYBR Green qPCR yöntemiyle Tümör dokusunda ve sağlam dokuda saptanan Becklin-1 gen ekspresyonu ile perinöral invazyon arasında anlamlı ilişki saptanmadı(Tablo 15).p değeri 0.640 idi .

Tablo 15. ATG5 gen ekspresyonu ile perinöral invazyon arasındaki ilişki

		Perinöral İnvazyon		
		Var	Yok	TOPLAM
ATG5	Tümör Dokusunda Artış	3(%21,4)	3(%21,4)	6(%42,9)
	Non-Tümör Dokuda Artış	3(%21,4)	5(%35,7)	8(%57,1)
TOPLAM		6(%42,9)	8(%57,1)	14(%100)
				P:0.640

SYBR Green qPCR yöntemiyle Tümör dokusunda ve sağlam dokuda saptanan Beclin-1 gen ekspresyonu ile perinöral invazyon arasında anlamlı ilişki saptanmadı(Tablo 16). p değeri 0.825 idi .

Tablo 16. ATG5 gen ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon arasındaki ilişki

		Lenfovasküler İnvazyon		
		Var	Yok	TOPLAM
ATG5	Tümör Dokusunda Artış	5(%35,7)	1(%7,1)	6(%42,9)
	Non-Tümör Dokuda Artış	7(%50)	1(%7,1)	8(%57,1)
TOPLAM		12(%85,7)	2(%14,3)	14(%100)
				P:0.825

SYBR Green qPCR yöntemiyle Tümör dokusunda ve sağlam dokuda saptanan Beclin-1 gen ekspresyonu ile hastaların TNM evreleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı(Tablo 17).p değeri 0.292 idi.

Tablo 17. ATG12 gen ekspresyonu ile TNM evreler arasındaki ilişki

		TNM Evre(AJCC)				
		1	2	3	4	Toplam
ATG12	Tümör Dokusunda Artış	1(%7,1)	3(%21,4)	1(%7,1)	1(%7,1)	6(%42,9)
	Non-Tümör Dokuda Artış	4(%28,6)	4(%28,6)	0	0	8(%57,1)
Toplam		5(%33,3)	7(%50)	1(%7,1)	1(%7,1)	14(%100)
						P:0.292

SYBR Green qPCR yöntemiyle Tümör dokusunda ve sağlam dokuda saptanan ATG12 gen ekspresyonu ile perinöral invazyon arasında anlamlı ilişki saptanmadı(Tablo 18).p değeri 0.334 idi.

Tablo 18. ATG12 gen ekspresyonu ile perinöral invazyon arasındaki ilişki

		Perinöral İnvazyon		
		Var	Yok	TOPLAM
ATG12	Tümör Dokusunda Artış	3(%21,4)	3(%21,4)	6(%42,9)
	Non-Tümör Dokuda Artış	2(%14,3)	6(%42,9)	8(%57,1)
TOPLAM		5(%35,7)	9(%64,3)	14(%100)
				P:0.334

SYBR Green qPCR yöntemiyle Tümör dokusunda ve sağlam dokuda saptanan ATG12 gen ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon arasında anlamlı ilişki saptanmadı(Tablo 19).p değeri 0.186 idi.

Tablo 19. ATG12 gen ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon arasındaki ilişki

		Lenfovasküler İnvazyon		
		Var	Yok	TOPLAM
ATG12	Tümör Dokusunda Artış	6(%42,9)	0	6(%42,9)
	Non-Tümör Dokuda Artış	6(%42,9)	2(%14,3)	8(%57,1)
TOPLAM		12(%85,7)	2(%14,3)	14(%100)
				P:0.186

5. TARTIŞMA

Kolorektal kanser, adım adım meydana gelen genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi ile normal kolon mukozasının invaziv kansere dönüşümü sonucu oluşur. KRK'nın çoğu daha önce var olan ve malignitenin genetik özelliklerini içeren adenomlardan gelişir (90).

Kolorektal kanser karsinogenezinin farklı yollarının tanımlanması KRK' nın heterojen yapısını ortaya koymuştur. Fearon ve Vogelstein tarafından ileri sürülen ilk modelde 3 basamak tanımlanmıştır. Birinci basamakta onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tümör supresör genlerin inaktivasyonu oluşur. İkinci olarak karsinom gelişimi için en az 4-5 gende mutasyon oluşması gereklidir. Üçüncü olarak tümörün biyolojik davranışı bu genetik değişimlerin birikimi sonucu belirlenir (91,92). Fearon ve Vogelstein modelinden daha farklı yollarında keşfi ile KRK' nın moleküler yapısı daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Son 20 yılda 2 önemli moleküler yapı daha keşfedilmiştir. Bunlardan biri "Mismatch Repair" (MMR) gen defektinin neden olduğu Mikrosatellit İnsitabilite (MSI)'dir. Diğer de özellikle hipermetilasyon yolu ile gen fonksiyonlarının sessizleştirilmesi olan epigenetiğin anlaşılmasıdır (90).

KRK farklı fenotiplere neden olan farklı moleküler yollara bağlı olarak heterojen bir hastalıktır. Kolorektal karsinogenezin moleküler temelini anlaşılması ile tedavi ve prognozda önemli değişiklikler olmuştur. Tümörün patolojik ve moleküler özelliklerine dayanarak tarama ve takip protokollerinin optimizasyonu, hastalık evresinin daha doğru değerlendirilmesi ve tedavinin bireyselleştirilmesi ile sonuçlar daha iyi hale gelmiştir (90). Kolorektal karsinogenez ile ilişkili olan farklı gen mutasyonları vardır. Fakat bu genlerin bir çoğunun hastalığın başlangıcı ve progresyonundaki rolü henüz anlaşılabilmiştir. Bunlardan en önemlileri APC, K-ras ve p53 mutasyonları olup KRK' da değişen oranlarda bulunurlar ancak aynı vakada birlikte bulunmaları nadirdir (93).

KRK' nın temelinde yer alan bu multifaktöryel ve karmaşık genetik yapı hem hastaların tedavi yanıtlarındaki farklılıkların hem de yapılan genetik çalışmaların sonuçlarındaki farklılıkların nedeni olabilir. Otofaji ölen hücrelerde gözlenmesine rağmen kanser hücresinde otofajinin hücreyi öldürdüğü ya da ölümden koruduğu net değildir. Muhtemelen otofaji hücrenin normal fonksiyonlarını restore edemediği zaman

hücre ölmektedir. Bu konu tartışmalıdır, çünkü farklı otofaji inhibitörleri farklı sonuçlar doğurmaktadır. Örneğin meme kanseri hücrelerinde tamoksifen otofaji'yi uyarmaktadır, otofaji inhibitörü olan 3-Metil Adenin (3-MA) bu hücrelerin ölümünü engellemektedir. Bu durum otofajinin bir ölüm mekanizması olduğunu düşündürmektedir (94). Bunun tersine radyasyonun uyardığı otofajide bir otofaji inhibitörü olan Bafilomisin A1 kullanıldığında kanser hücrelerinde apoptozisi arttırmaktadır. Bu durumda otofaji hücrelerin apoptozisten kaçmasını sağlayan koruyucu bir mekanizma gibi görülmektedir (23).

Başka bir hipoteze göre otofajinin farklı evrelerinde yapılan inhibisyon farklı sonuçlara neden olmaktadır. Örneğin temozolamid ile tedavi edilen glioma hücrelerinde otofajinin erken evresinde 3-MA ile inhibisyon hücreleri ölümden korurken, geç evrede Bafilomisin A ile yapılan inhibisyon apoptozisi uyararak hücre ölümünü arttırmaktadır (95). 3-MA ve Bafilomisin-A bir çok çalışmada otofaji inhibitörü olarak kullanılmasına rağmen bunlar otofajinin spesifik inhibitörleri değildir. 3-MA fosfoinozitol 3-kinaz (PI3K) inhibitörüdür, Bafilomisin-A Hidrojen-ATPaz inhibitörüdür. Kanser tedavisinde otofajinin rolünün daha net tanımlanabilmesi için otofaji genleri üzerinde daha spesifik inhibisyon yapılmalıdır (96).

Otofajik bazı genler, kanser gelişimi esnasında tümör supresör etki gösterirken, kanserin progresyonu esnasında kanser hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunmaktadır (56). Bu bilgilerden de anlaşıldığı gibi otofaji ve kanser ilişkisi oldukça kompleksdir. Otofajinin kanserdeki rolü, kanserin evresine, hücrelerin metabolik durumuna ve stres varlığına göre değişmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda otofaji ile ilişkili bazı moleküllerin farklı kanser türlerinde ekspresyonlarının farklılık gösterdiğini bildiren sonuçlar bildirilmiştir. Literatürde otofaji ilişkili genlerle yapılan çalışmalarda bir çok farklı yöntem (hayvan modelleri, hücre serileri, insan normal ve tümör dokuları gibi) ve değerlendirme tekniği (İmmün histo-kimya boyama, gen ekspresyon düzeyi, allelik delesyon gibi) kullanıldığı görülmektedir. Biz bu çalışmamızda Real Time PCR yöntemini kullanarak otofaji yolağı ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerini saptadık. Western blot yöntemiyle de bu genlerin protein ekspresyonlarını ölçtük.

Ökaryotik hücrelerde, "mammalian target of rapamycin complex 1" (mTORC1) yeterli besin varlığının en önemli sensörüdür ve majör otofaji regülatörüdür. Yeterli besin varlığında mTORC1 aktive olur, ULK1 ve ATG13' ü fosforile ederek inhibe eder.

ULK1 ve ATG13 kompleksi otofagozom çekirdeklenmeyi oluşturan yapıdır. Büyüme faktörleri eksikliği veya farmakolojik olarak mTORC1 inhibisyonu yapıldığında otofaji aktive olur (97).

Beclin-1 otofajinin başlangıç aşaması olan çift zarlı otofagozom oluşumu için temel otofaji proteini ve BECN 1 geni tarafından kodlanmaktadır. BECN 1 düzeyinin Meme, Over ve Beyin tümörlerinde ekspresyonunun azaldığını bildiren çalışmalara (98,99) karşın kolon kanserinde ekspresyonunun arttığını bildiren çalışmalar da (100) mevcuttur. Bununla birlikte Guo ve arkadaşlarının 85 kolorektal kanserli hasta ile yaptıkları çalışmada hastaların bir kısmında BECN 1 ekspresyonunun azaldığı ve bu hastaların kemoterapi yanıtının daha iyi olduğu bildirilmiştir (101). Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 175 hastanın tümör dokusu ile normal kolon dokusu İHK yöntemi ile BECN 1 ekspresyonu açısından değerlendirilmiştir. Hastaların yaklaşık %90' ında BECN 1 ekspresyonunun arttığı görülmüştür (100). Bizim çalışmamızda ise BECN 1 gen ekspresyonu bazı hastaların normal dokusunda , bazılarının ise tümör dokusunda yüksek saptandı.

Beclin 1 'in major fonksiyonunun hüce ölümünü uyarması nedeniyle ilk olarak kanser dokusunda Beclin 1 protein ekspresyonunu azalmış olarak beklenebilir. Buna karşın Ahn ve ark.larının yaptığı çalışmada eşlenik normal mukoza hücrelerine göre malign kolorektal ve gastrik kanserler dokusunda artan beclin-1 ekspresyonu beclin-1'in yeniden ekspresyonun işaret ederek beclin 1'in hem kolorektal hem de gastrik tümörogeneze rol alabileceğini önermektedir (103). Bizim örneklerimizde beclin 1 ekspresyonunun hem tümörlü hem de eşlenik normal doku örneklerinde beraber saptanması da otofajinin kolorektal kanser tümörogenezinde işe karıştığını destekler niteliktedir. Kanser hücreleri kanserlerin gelişim ve ilerlemesinde hücre ölüm sinyallerine karşı hücre ölümünden kaçma kapasitesi kazanarak kendilerini hücre ölümünden korumaktadır. Kanser hücreleri bu özelliğe sahip olmazsa sonunda ölürlür.

Kolorektal ve gastrik kanserlerde beclin 1 ekspresyonu otofajik hücre ölümünün indüksiyonuna katkıda bulunmakta ve böylece kanserlerin gelişimi sırasında hücre ölümünü aşan seçici bir zorlama oluşturabilir. Bu seçilmiş hücreler beclin 1 bağımlı hücre ölümüne karşı direnç mekanizmalarına sahip olabilir. Bununla birlikte çoğu gastrik ve kolorektal karsinomada artan beclin 1 ekspresyonu büyümeyi uyarıcı faktörlerin etkisini yenmeye çalışan intakt mekanizma olabilir. Bu açıdan

karsinogenezin kendisine beclin 1'in aşırı ekspresyonunun katkısının olması gerekli değildir. Ayrıca, bir çalışmada beclin 1 ekspresyonu beyin tümörlerinin agresifliği ile ilişkili bulunmuştur (99). Bu gözlemler, beclin 1 ekspresyonunun kanser tipine göre farklı roller alabileceğini önermektedir.

Kanserde hücre ölümü ile ilgili genlerdeki ve ürünlerindeki değişiklikler üzerine gastrik ve kolorektal kanser dokularındaki otofaji ilişkili genlerin (ATG) somatik mutasyonunun araştırıldığı bir çalışmada mikrosatellit instabilitesi yüksek olan kanserlerde insan 16 ATG geni arasında ATG2B, ATG5B ve ATG9B olmak üzere üç genin mutasyonu saptanmıştır (104). Bu mutasyonların otofajik işlemin regülasyonunu bozarak kanser gelişimine katkıda bulunabileceği önerilmektedir.

Microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3, otofaji sırasında otofagozom oluşumunda işe karışmaktadır. Kolorektal kanser ve otofaji ile ilgili yapılmış az sayıda çalışmadan birinde 19 kolorektal kanser dokusunun %63'ünde LC3 immunohistokimyasal ekspresyonu yüksek olarak saptanmıştır (105). Aynı çalışmada yine özefageal kanserlerin % 53'ünde ve gastrik kanserlerin % 58'inde LC3 ekspresyonu yüksek olarak saptanmıştır. Özefageal kanserlerde LC3 ekspresyonu survival dahil olmak üzere çeşitli klinikopatolojik faktörlerle korele olmadığı saptanmıştır. LC3'ün çeşitli gastrointestinal kanserlerde upregüle olması ve Ki-67 indeksi ile kısmi ilişkili olmasının özellikle karsinogenezin erken fazında kanser gelişimine avantaj sağladığını önermektedir (105).

Kolon kanserlerinde beclin-1 ekspresyonu ve klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi 115 evre IIIB hastada araştırılmıştır (106). Çalışmada tumor hücrelerinin % 85.2'unda beclin-1 dağılımı plazma membranı, sitoplazma ve nükleusda gözlenirken, normal komşu dokuda beclin-1 ekspresyonu yok ya da orta düzeyde belirlenmiştir. Yüksek beclin-1 ekspresyonu daha uzun survival ile güçlü bir ilişki göstermiştir. Beclin-1 ekspresyonu ve primer kitle derinliğinin (T evresi) bağımsız prognostik faktör olabileceği önerilmiştir. Yine bizim çalışmamızla benzer olarak beclin-1 ekspresyonu ile klinikopatolojik özellikler arasında bir ilişki saptanamamıştır (42) .

Hücre ölümü ve yaşamında otofajinin iki zıt rolü bulunmaktadır. Kanserde de otofaji rolleri hakkında tartışmalar devam etmektedir. Otofaji gelişimi kanser hücrelerinin tumorojenik aktivitesini baskılamakta ve Beclin1 ve UVRAG ile ilgili vakalarda olduğu gibi otofaji inaktivasyonu tümör gelişimini arttırmaktadır. Zıt olarak

otofaji blokasyonu dirençli hücreleri radyoterapiye hassas hale getirmektedir. Ayrıca, otofaji ilişkili proteinler olan Beclin1 ve LC3 protein ekspresyonu kolon ve gastrik kanserlerde upregüle olmasının ATG mutasyonlarına bağlı kompensatuar aşırı ekspresyonuna işaret etmektedir. Bu veriler otofaji genlerinin hücrenin içeriğine bağlı olarak hücre ölüm ve yaşamında farklı rolleri olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca, otofajinin kanser ilerlemesi ve kanserin tedavi aşamasında farklı rollere sahip olması muhtemeldir. ATG genlerindeki mutasyonların kanserin gelişim, ilerleme ve tedaviye katkısını inceleyen daha ileri fonksiyonel çalışmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Günümüzde özellikle metastatik kolorektal kanser tedavisi alan hastalarda 5 yıllık yaşam oranları ve tedavi yanıtları belli yüzdelerin üzerine çıkamamaktadır. Kolorektal kanserin etyolojisinin, etki mekanizmalarının ve tümörün ilerlemesinde otofajinin rolünün ortaya konması bu nedenle önem kazanmaktadır. Klinik kolorektal kanserli hastalara ait tümör örneklerinde otofajinin rolünün belirlenmeye çalışıldığı bu çalışmada otofajinin hem normal hem de kanserli dokuda devam ettiğini göstermiştir. Otofajinin hem normal hem de kanserli dokuda var olması kolorektal karsinogenezin her iki dokuda yaptığı değişikliklere bağlı olabilir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Otofaji kanserde hem tümör gelişimi hem de progresyonuna katkı sağlaması yanında tümör gelişimin önleyici zıt etkileri de bulunmaktadır. Çalışmamızda hem kanser oluşumunun erken evrelerinde hem de ileri evre kanserlerin progresyonunda önemli role sahip olduğu düşünülen Otofaji yolağı ile ilişkili ATG5 , ATG12 ve Beclin-1 gen ekspresyon düzeylerine SYBR Green RT PCR yöntemiyle , ATG5, ATG12 ve LC3 protein ekspresyon düzeylerine Western Blot yöntemiyle hem tümör dokusunda hem de eşlenik normal kolon dokusunda bakıldı. Normal dokuda ve tümöral dokudaki gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı.

Hem tümöral dokuda hem de normal dokuda gen ve protein ekspresyonları saptandı. Bu sonuçlar hastaların demografik ve histopatolojik özellikleri ile karşılaştırıldı ve aralarında anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı.

Günümüzde tüm kanserlerde olduğu gibi kolorektal kanserde de daha spesifik ve daha az toksik tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır. Kolorektal kanser ve otofaji arasındaki özelliklerin belirlenmesi ile özellikle dünyada üçüncü sırada yer alan kolorektal kanserde tümör gelişimi, prognoz, metastaz ve tedaviyi içine alan yeni belirteçlerin ve tedavi seçeneklerinin ortaya konması mümkün olabilecektir.

Çalışma teknikleri açısından optimal şartların sağlandığı çalışmamızda dokular peroperatif alınıp sıvı azot içinde protein ve RNA ekspresyon analizleri yapılacağı güne kadar bankalanmıştır. Ameliyathanede alınan dokular hiç zaman kaybedilmeden Cryo tüplere koyulup taşınabilir sıvı azot dewarlarıyla bankalanacağı sıvı azot tanklarına transfer edilmiştir.

Çalışmamızda bulduğumuz sonuçların daha geniş hasta serileri ile teyid edilmesi gerekmektedir. Ancak örnek sayısının arttırılarak alt gruplardan kaynaklanan örnek sayı azlığının getirdiği değerlendirme hatalarının giderildiği çalışmaların planlanması ile otofaji ve kolorektal kanser klinik özellikleri arasındaki ilişki daha iyi ortaya konabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300.
2. Miller BA, Chu KC, Hankey BF, Ries LA. Cancer incidence and mortality patterns among specific Asian and Pacific Islander populations in the U.S. *Cancer Causes Control*. 2008;19(3):227-56.
3. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(4):212-36.
4. Poston GJ, Figueras J, Giulianti F, Nuzzo G, Sobrero AF, Gigot JF, et al. Urgent need for a new staging system in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(29):4828-33.
5. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004;22(2):229-37.
6. Prenen H, Vecchione L, Van Cutsem E. Role of targeted agents in metastatic colorectal cancer. *Target Oncol*. 2013;8(2):83-96.
7. Melet A, Song K, Bucur O, Jagani Z, Grassian AR, Khosravi-Far R. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. *Adv Exp Med Biol*. 2008;615:47-79.
8. Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis*. 2009;14(4):376-91.
9. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS, et al. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol*. 2009;217(5):702-6.
10. Kim MS, Song SY, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Expressional and mutational analyses of ATG5 gene in prostate cancers. *APMIS*. 2011;119(11):802-7.
11. Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res*. 2007;17(10):839-49.
12. Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(6):505-10.
13. Hannigan AM, Gorski SM. Macroautophagy: the key ingredient to a healthy diet? *Autophagy*. 2009;5(2):140-51.
14. LoRusso PM. Mammalian target of rapamycin as a rational therapeutic target for breast cancer treatment. *Oncology*. 2013;84(1):43-56.
15. Knaevelsrud H, Ahlquist T, Merok MA, Nesbakken A, Stenmark H, Lothe RA, et al. UVRAG mutations associated with microsatellite unstable colon cancer do not affect autophagy. *Autophagy*. 2010;6(7):863-70.
16. Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S, Levine B. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy*. 2005;1(1):46-52.
17. Akar U, Chaves-Reyez A, Barria M, Tari A, Sanguino A, Kondo Y, et al. Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy*. 2008;4(5):669-79.

18. Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res.* 2006;66(19):9349-51.
19. Wei H, Guan JL. Pro-tumorigenic function of autophagy in mammary oncogenesis. *Autophagy.* 2012;8(1):129-31.
20. Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Delomenie C, Nicolas V, et al. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene.* 2013;32(18):2261-72, 72e 1-11.
21. Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(11):876-85.
22. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 2004;23(16):2891-906.
23. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.* 2001;61(2):439-44.
24. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(1):10-29.
25. Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Dairesi Başkanlığı 2006-2008 yılları Türkiye Kanseri İnsidansı, www.kanser.gov.tr.
26. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319(9):525-32.
27. Dahabreh IJ, Terasawa T, Castaldi PJ, Trikalinos TA. Systematic review: Anti-epidermal growth factor receptor treatment effect modification by KRAS mutations in advanced colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 2011;154(1):37-49.
28. Walker J, Quirke P. Prognosis and response to therapy in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2002;38(7):880-6.
29. Atkin WS, Edwards R, Kralj-Hans I, Wooldrage K, Hart AR, Northover JM, et al. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;375(9726):1624-33.
30. You YN. Risk factors for young-onset advanced colorectal cancer-reply. *Arch Intern Med.* 2012;172(12):971-2.
31. Chou CL, Chang SC, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Wang HS, et al. Differences in clinicopathological characteristics of colorectal cancer between younger and elderly patients: an analysis of 322 patients from a single institution. *Am J Surg.* 2011;202(5):574-82.
32. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1994;331(25):1669-74.
33. Pariente A, Milan C, Lafon J, Faivre J. Colonoscopic screening in first-degree relatives of patients with 'sporadic' colorectal cancer: a case-control study. The Association Nationale des Gastroenterologues des Hopitaux and Registre Bourguignon des Cancers Digestifs (INSERM CRI 9505). *Gastroenterology.* 1998;115(1):7-12.
34. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 1996;56(21):4862-4.

35. Butler LM, Millikan RC, Sinha R, Keku TO, Winkel S, Harlan B, et al. Modification by N-acetyltransferase 1 genotype on the association between dietary heterocyclic amines and colon cancer in a multiethnic study. *Mutat Res.* 2008;638(1-2):162-74.
36. Singh PN, Fraser GE. Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Am J Epidemiol.* 1998;148(8):761-74.
37. Probst-Hensch NM, Sinha R, Longnecker MP, Witte JS, Ingles SA, Frankl HD, et al. Meat preparation and colorectal adenomas in a large sigmoidoscopy-based case-control study in California (United States). *Cancer Causes Control.* 1997;8(2):175-83.
38. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(11):916-32.
39. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, et al. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med.* 1999;340(3):169-76.
40. Meyerhardt JA, Giovannucci EL, Holmes MD, Chan AT, Chan JA, Colditz GA, et al. Physical activity and survival after colorectal cancer diagnosis. *J Clin Oncol.* 2006;24(22):3527-34.
41. Smalley W, Ray WA, Daugherty J, Griffin MR. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: a population-based study. *Arch Intern Med.* 1999;159(2):161-6.
42. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, et al. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med.* 1993;329(27):1982-7.
43. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med.* 2003;138(7):560-70.
44. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology.* 2003;124(2):544-60.
45. American Joint Committee on Cancer. Colon and rectum. In: *AJCC Cancer Staging Handbook*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia; 2010. p. 173-207.
46. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart A. Revised tumor and node categorization for rectal cancer based on surveillance, epidemiology, and end results and rectal pooled analysis outcomes. *J Clin Oncol.* 2010;28(2):256-63.
47. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet.* 2010;375(9719):1030-47.
48. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl).* 1990;181(3):195-213.
49. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(3):211-6.
50. Kang R, Tang D. Autophagy in pancreatic cancer pathogenesis and treatment. *Am J Cancer Res.* 2012;2(4):383-96.
51. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol.* 2010;12(9):823-30.
52. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 2010;40(2):280-93.
53. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132(1):27-42.

54. Virgin HW, Levine B. Autophagy genes in immunity. *Nat Immunol.* 2009;10(5):461-70.
55. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 2000;290(5497):1717-21.
56. Rouschop KM, Wouters BG. Regulation of autophagy through multiple independent hypoxic signaling pathways. *Curr Mol Med.* 2009;9(4):417-24.
57. Chen S, Rehman SK, Zhang W, Wen A, Yao L, Zhang J. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Dec;1806(2):220-9.
58. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(17):5308-16.
59. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):931-7.
60. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007;9(10):1102-9.
61. Apel A, Zentgraf H, Buchler MW, Herr I. Autophagy-A double-edged sword in oncology. *Int J Cancer.* 2009;125(5):991-5.
62. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol.* 2000;150(6):1507-13.
63. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001;411(6835):355-65.
64. Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(12):2445-62.
65. Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, et al. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35243-6.
66. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999;402(6762):672-6.
67. Corradetti MN, Guan KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene.* 2006;25(48):6347-60.
68. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell.* 2007;12(1):9-22.
69. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 2005;9(1):59-71.
70. Ballif BA, Blenis J. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ.* 2001;12(8):397-408.
71. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy.* 2008;4(5):600-6.
72. Noble CG, Dong JM, Manser E, Song H. Bcl-xL and UVRAG cause a monomer-dimer switch in Beclin1. *J Biol Chem.* 2008;283(38):26274-82.

73. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2006;8(10):1124-32.
74. Cho DH, Jo YK, Hwang JJ, Lee YM, Roh SA, Kim JC. Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer Lett.* 2009;274(1):95-100.
75. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene.* 2003;22(56):9030-40.
76. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(23):8204-9.
77. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol.* 2008;10(6):676-87.
78. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 2007;26(7):1749-60.
79. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* 2009;23(7):798-803.
80. Yin X, Cao L, Peng Y, Tan Y, Xie M, Kang R, et al. A critical role for UVRAG in apoptosis. *Autophagy.* 2011;7(10):1242-4.
81. Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res.* 2006;66(6):2885-8.
82. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350(21):2129-39.
83. Noguchi M, Morikawa A, Kawasaki M, Matsuno Y, Yamada T, Hirohashi S, et al. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer.* 1995;75(12):2844-52.
84. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2006;10(1):51-64.
85. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* 2007;21(11):1367-81.
86. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell.* 2009;137(6):1062-75.
87. Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res.* 2001;22(1):43-61.
88. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* 2009;16(7):966-75.
89. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev.* 2007;21(13):1621-35.
90. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(9):1423-31.
91. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-67.
92. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87(2):159-70.

93. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(14):9433-8.
94. Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, et al. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*. 1996;17(8):1595-607.
95. Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ*. 2004;11(4):448-57.
96. Kondo Y, Kondo S. Autophagy and cancer therapy. *Autophagy*. 2006;2(2):85-90.
97. Neufeld TP. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):157-68.
98. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, et al. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol*. 2006;8(7):688-99.
99. Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzi P, Pacenti L, Monciatti I, et al. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int J Oncol*. 2007;30(2):429-36.
100. Chen Z, Li Y, Zhang C, Yi H, Wu C, Wang J, et al. Downregulation of Beclin1 and Impairment of Autophagy in a Small Population of Colorectal Cancer. *Dig Dis Sci*. 2013;Epub ahead of print doi:10.1007/s10620-013-2732-8.
101. Guo GF, Jiang WQ, Zhang B, Cai YC, Xu RH, Chen XX, et al. Autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 predict cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2011;17(43):4779-86.
102. Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroché G, Datchary J, et al. High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(6):1024-31.
103. Ahn CH, Jeong EG, Lee JW, Kim MS, et al. Expression of beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers. *APMIS* 2007;115: 1344-9.
104. Kang MR, Kim MS, Kim SS, Ahn CH, et al. NF-kappaB signalling proteins p50/p105,p52/p100, RelA, and IKKepsilon are over-expressed in oesophageal squamous cell carcinomas. *Pathology* 2009;41: 622-5.
105. Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, Yamasaki M, et al. LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers. *Int J Oncol* 2008;33: 461-8.
106. Li BX, Li CY, Peng RQ, Wu XJ, et al. The expression of beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers. *Autophagy*. 2009; 5: 303-6.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hilmi Erdem SÜMBÜL
Doğum Tarihi ve Yeri : 15.08.1986/ Kadirli
Medeni Durumu : Evli
Adres : Güzelyalı Mahallesi 81022 sokak. Atakan Apt
Kat:5 No:5
Telefon : 0 (532) 646 65 86
E-Mail : erdemsumbul@yahoo.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Çukurova Üniversitesi (2010)
Görev Yeri : Kadirli Toplum Sağlığı Merkezi
Kadirli Devlet Hastanesi
Çukurova Üniversitesi
Yabancı Dili : İngilizce