

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Serum M30 ve M65 Biyobelirteç Düzeylerinin Metastatik Kanser Hastalarında Kemoterapi Yanıtını Önceden Tahmin Etmedeki Öneminin Araştırılması

ABDUL KADIR SLOCUM

DANIŞMAN
PROF. DR. ENGİN ULUKAYA

KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2021

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum,“ Serum M30 ve M65 biyobelirteç düzeylerinin metastatik kanser hastalarında kemoterapi yanıtını önceden tahmin etmedeki öneminin araştırılması” adlı çalışmanın, 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 aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Abdul Kadir Slocum

İTHAF

Başta ailem olmak üzere üzerimde emeği olan herkese ithaf ediyorum



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitim öğrenim hayatım boyunca bilgi ve tecrübesini her zaman paylaşan, yardım ve desteğini esirgmeden yanımda yer alan danışmanım ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya, çok verimli bir eğitim öğrenim dönemi olmasını sağlayan ve bunun için üstün gayret gösteren İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kanseri Biyolojisi ve Farmakolojisi Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine, hem tez çalışması sürecimde hemde mevcut klinik hayatımda yadsınamaz emek ve destekleri olan, ufkumu ve önümü açan beraber çalıştığım Yrd. Doç. Dr. Mehmet Salih İYİKESÇİ'ye ve onkolojiye olan bakışımı değiştiren, şekillendiren ve üzerimde büyük emekleri olan Prof. Dr. Bülent BERKARDA'ya, tez çalışması sürecinde önemli emek gösteren Şirin TAFLAN ve Seren ŞAHİN ile tüm Kemoterapi Onkoloji Merkezi ekibine, Ahmet Eren SAYIN ve Hülya AZAKLI nezdinde tüm Genetik Laboratuvarı ekibine, bugünlere gelmem için maddi - manevi desteğini esirgemeyen babam Douglas Bradley SLOCUM ve annem Susan Gail SLOCUM ile tüm kardeşlerim ve aile üyelerime, aynı zamanda bu süreçte manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim en büyük destekçim değerli eşim yüksek mimar Mina SLOCUM ve biricik kızım Feyza'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	II
ETİK BEYANI	III
İTHAF	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	X
ÖZET	XI
ABSTRACT	XII
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	4
1.1. Hücre ölümü süreçleri	4
1.1.1. Hücre ölümü tipleri	5
1.1.1.1. Apoptoz	7
1.1.1.2. Nekroz	9
1.1.1.3. Nekroptoz	10
1.2. Hücre ölümü belirteçleri	10
1.2.1. Sirküle apoptoz belirteçleri	11
1.2.1.1. Kaspaz 3	12
1.2.1.1.1. Kaspaz aktivitesiyle bölünen sitokeratin-18	13
1.2.1.1.2. Kaspaz aktivitesiyle bölünen sitokeratin-18 (M30) ve bölünmemiş sitokeratin-18 (M65)	16
1.2.1.1.3. Nükleozom ve sirküle DNA	20
1.2.1.1.4. Ekstraselüler veziküller	22
1.2.2. Sirküle nekroz belirteçleri	25
1.2.3. Sirküle nekroptoz belirteçleri	28
2. MATERYAL VE METOD	31
2.1. Hastalar	31

2.2. Kemoterapi protokolü	31
2.3. M30 ve M65 antijen düzeyi ölçümleri	32
2.3.1. M30 ölçümleri	32
2.3.2. M65 ölçümleri	33
2.4. Yanıt değerlendirilmesi	33
2.5. İstatistiksel analiz	34
3. BULGULAR	35
3.1. Demografik ve klinik özellikler	35
3.2. M30 ve M65 belirteçlerinin değişimi	45
3.3. Birleştirilmiş verilerin değerlendirilmesi	51
4. TARTIŞMA	52
5. SONUÇ	59
KAYNAKÇA	60
EKLER	72
ETİK KURUL ONAYI	77
İNTİHAL RAPORU	78
ÖZGEÇMİŞ	79

TABLÖLAR LİSTESİ

- Tablo 1.** Ekstrinsik apoptoz yolağındaki bazı ölüm reseptörleri ve bu reseptörlere spesifik ölüm ligandları
- Tablo 2.** Hastaların demografik özelliklerine göre dağılımı
- Tablo 3.** Hastaların her bir kemoterapi seansı öncesi ve sonrası M30 değerleri
- Tablo 4.** Hastaların her bir kemoterapi seansı öncesi ve sonrası M65 değerleri
- Tablo 5.** Hastaların kanser tipine göre dağılımı ve başlangıç M30 ve M65 değerleri
- Tablo 6.** Çalışmamızda sık olan kanser tiplerinde başlangıç M30 ve M65 değerleri
- Tablo 7.** Hastaların aldıkları kemoterapi seansı sayısına göre dağılımı
- Tablo 8.** Yanıtı göre hasta gruplarının yanıt alt tipine göre dağılımı
- Tablo 9.** Hastaların aldığı kemoterapi sayısına göre M30 değerinde kemoterapi öncesi ve sonrası gözlenen değişim açısından grupların karşılaştırılması
- Tablo 10.** Hastaların aldığı kemoterapi sayısına göre M65 değerinde kemoterapi öncesi ve sonrası gözlenen değişim açısından grupların karşılaştırılması
- Tablo 11.** Kemoterapi seanslarının esas alındığı birleştirilmiş verilere göre M30 ve M65 değerlerindeki değişim açısından grupların karşılaştırılması

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Hücre ölümü tiplerinin şematik gösterimi

Şekil 2. Apoptozun şematik gösterimi

Şekil 3. Nekrozun şematik gösterimi

Şekil 4. Kaspaz aktivitesi ile bölünen sitokeratin-18 (M30) ve bölünmemiş sitokeratin-18 (M65)'in oluşumu

Şekil 5. Sadece 3 kemoterapi alan hastalarda kemoterapi öncesi ve sonrası M30 değerlerinin dağılımı

Şekil 6. Sadece 3 kemoterapi alan hastalarda kemoterapi öncesi ve sonrası M65 değerlerinin dağılımı



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

M30	: Kaspaz aktivitesiyle bölünen sitokeratin-18
M65	: Bölünmemiş sitokeratin-18
TNM	: Tümör Nod Metastaz evreleme sistemi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
ELISA	: Enzime bağlı immünoabsorban test
SLE	: Sistemik lupus eritromatozis
LDH	: Laktat dehidrojenaz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ICAM1	: Hücre içi adhezyon molekülü-1
ECM	: Ekstraselüler matriks
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TGF	: Dönüştürücü büyüme faktörü
MLKL	: Karışık kökenli kinaz domain benzeri protein
RIPK	: Reseptörle etkileşime giren protein kinaz
ALS	: Amiyotrofik lateral skleroz
HRP	: Horseradish peroksidaz
TMB	: Tetrametil benzidine
PET-CT	: Pozitron emisyon tomografisi – bilgisayarlı tomografi
ANOVA	: Varyans analizi
β- hCG	: Beta insan koryonik gonototropini
IFN	: İnterferon

ÖZET

Slocum, A. K. (2021). Serum M30 ve M65 Biyobelirteç Düzeylerinin Metastatik Kanser Hastalarında Kemoterapi Yanıtını Önceden Tahmin Etmedeki Öneminin Araştırılması. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Giriş/Amaç: Dolaşımdaki hücre ölümü biyobelirteçleri olan M30 ve M65'in malign hastalıkları erken bir aşamada tespit etmeye, hastanın tedaviye verdiği yanıtı izlemeye ve hastalarda prognozu tahmin etmeye yardımcı olabileceğini düşündüren veriler mevcuttur. Bu çalışmanın amacı değişik tür tümörleri bulunan metastatik kanser hastalarında kemoterapi öncesi ve sonrası M30 ve M65 değerlerindeki değişim ile radyolojik tedavi yanıtı arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmaktır.

Yöntem: Çalışmamıza değişik kanserler nedeniyle tedavi almakta olan 120 evre IV hasta dahil edilmiştir. Hastalardan aldıkları her kemoterapi öncesinde ve 24-48 saat sonrasında M30 ve M65 antijen düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca hastaların kemoterapi seansları bittikten sonra radyolojik yanıt değerlendirmesi yapılmıştır.

Bulgular: Tedaviye radyolojik olarak yanıt veren hastalar (tam ya da kısmi yanıt) ile yanıt vermeyen hastalar (stabil ya da progresif hastalık) arasında kemoterapiye yanıt olarak M30 değişiminin zaman içerisindeki seyri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.342$). Aynı şekilde, yanıt veren hastalar ile yanıt vermeyen hastalar arasında kemoterapiye yanıt olarak M65 değişiminin zaman içerisindeki seyri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.169$). Başlangıçtaki (ilk kemoterapi öncesi) M30 ve M65 değerleri açısından da yanıt verenler ve vermeyenler arasında istatistiksel fark yoktur ($p>0.05$).

Sonuç: Bulgularımız evre IV kanser hastalarında, kemoterapi sonrası erken dönemde M30 ve M65 değişimleri ile kemoterapiye radyolojik tedavi yanıtı arasında bir ilişki olmadığını düşündürmektedir. Her bir kanser türünden değişik evrelerde daha fazla hasta sayısı olan geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: M30, M65, Apoptoz, Metastatik kanser, Kemoterapiye yanıt

ABSTRACT

Slocum, A. K. (2021). The role of M30 and M65 biomarker levels in predicting response to chemotherapy in metastatic cancer patients. Istinye University. Institute of Health Sciences, Department of Cancer Biology and Pharmacology. Master Thesis. Istanbul.

Background/Objective: Current evidence suggests that circulatory cell death biomarkers M30 and M65 may have role in the early diagnosis of malignant diseases, as well as monitoring treatment response and predicting prognosis. The aim of this study was to investigate whether changes in M30 and M65 levels following chemotherapy predicts radiological response to treatment.

Methods: The study included 120 patients with various types of metastatic cancer who received chemotherapy. M30 and M65 levels were measured before and 24 to 48 hours after each chemotherapy session. In addition, patients were evaluated for radiological tumor response following the completion of chemotherapy cycles.

Findings: The difference in response to chemotherapy in M30 levels over time did not significantly differ across patients who responded (complete/partial response) and who did not respond (stable disease/progression) to chemotherapy ($p=0.342$). Similarly, the difference over time in response to chemotherapy in M65 levels did not significantly differ across the two groups ($p=0.169$). The two groups did not also differ regarding baseline (before chemotherapy) M30 and M65 levels ($p>0.05$).

Conclusion: Our findings suggest that early changes in M30 and M65 levels in response to chemotherapy do not seem to predict radiological treatment response in patients with stage IV cancer. Further studies with higher number of patients with each malignancy type and disease stage are warranted.

Keywords: M30, M65, Apoptosis, Metastatic cancer, response to chemotherapy

GİRİŞ

Tanı yöntemleri ve tedavi yönetimindeki ilerlemelere rağmen metastatik kanser hastalarında prognoz hala kötüdür [1]. Uygun tedavi protokollerinin seçimi için kötü prognostik ve/veya prediktif faktörlerin bilinmesi çok önemli olup, şu anda mevcut olan prognostik faktörler arasında en önemlisi TNM evreleme sistemidir. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, onkojenler, hücre döngüsü düzenleyicileri, DNA onarım genleri, p53, c-erbB-2, bcl-2 ve epidermal-büyüme faktörü reseptörü gibi bazı biyolojik ve moleküler belirteçlerin birçok kanser türünde prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

Sitokeratin 18 (CK-18), apoptotik ve nekrotik hücrelerden dolaşıma salınan bir proteindir ve epitelyal tümörler için hücre ölümünün yararlı bir serum biyobelirteçidir [2, 3]. Kaspazla kırılmış CK-18 (ccCK18, M30 antigen) ve total CK-18 (M65), enzime bağlı immünoabsorban testlerle (ELISA) sirkülasyonda saptanır [4]. Bu belirteçlerin çeşitli malignitelere prognostik ve prediktif yarara sahip olduğu gösterilmiştir [5-10].

Apoptoz sırasında efektör kaspazlar, sitokeratin 18 proteinini parçalar. Başka bir deyişle, kaspaz ile bölünmüş sitokeratin 18 apoptotik hücrelerden dolaşıma salınır. Bu proteininin çeşitli dokularda ve epitelyal kökenli birçok katı tümörde fazlaca bulunduğu bilinmektedir [11]. Sitokeratin 18 proteininin parçalanması sonucu M30 neo-epitopu açığa çıkar. Bu sebeple, anti-M30 antikoru kaspazla bölünmüş sitokeratin 18'i tespit edebilmek için kullanılmaktadır [6]. Anti-M30 antikorunun apoptotik hücreleri tespit etme özelliği bağırsak epitelinde [12], meme karsinomunda [6], malign akciğer kanserinde [7], metastatik olmayan ve metastatik malign meme kanserinde [13], kanser kök hücrelerinde [14], kolorektal kanserde [4] gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, farklı kanser dokularında kemoterapiden sonra M30 antijen seviyelerinde, dolayısıyla apoptozda farklılıklar tespit edilmiştir. Bu sayede, kemoterapinin etkinliğinin daha erken tahmin edilmesine katkıda bulunması amaçlanmıştır. Bu bakımdan, dolaşımdaki M30 seviyesinin tespit edilmesi terapötik kazanımlarının yanı sıra, bu alanda yapılacak çalışmalar için yol gösterici niteliktedir. Hücre ölümü sırasında proteolitik bileşenlerine bölünen sitokeratin 18 proteini sadece M30 antijeni değil, aynı zamanda M65 antijeni de dolaşıma verir. M30 antijeni sitokeratin 18'in kaspazla bölünmüş türevidir iken, M65 antijeni sitokeratin 18'in bozulmamış formudur [15]. Dahası, M30 antijeni apoptoz

sırasında salınır M65 antijeni hem apoptoz hem de nekroz sırasında salınır. Dolayısıyla, dolaşımdaki M65 antijen miktarı da başta kanser olmak üzere birçok hastalıkta tedavi sonrası gözlenen hücre ölümü hakkında hayati bilgiler veren bir biyobelirteçtir. Kemoterapi sonrası değişen M65 seviyeleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Transizyonel hücreli mesane karsinomunda [16], yaygın testiküler germ hücre kanserinde [17], safra yolu kanserinde [18], küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde [19], ilerlemiş mide kanserinde [20], akciğer kanserinde [21], epitelyal kanserli hastalarda [22] ve endometrial kanserli hastalarda [23] M65 antijen seviyelerinde değişim gözlenmiştir. Bu bulgular hücre ölümü sonrası dolaşıma salınan M30 ve M65 antijenlerinin tespit edilmesinin, kemoterapinin etkinliğinin daha erken tahmin edilmesinde etkili olduğunu ve kritik terapötik kazanımları da beraberinde getirdiğini göstermektedir.

Ayrıca, bu belirteçlerin gastrointestinal tümörlerde kemoterapiye tümör yanıtının potansiyel belirteçleri olabileceği gösterilmiştir [24] ve erken yanıt tahmini, özellikle metastatik kanser hastalarının tedavisinde büyük önem arz eder. Sitotoksik ilaçların çoğu, özellikle de kemoterapiden 24 saat sonra apoptozu veya bazen nekrozu indükler [25]. Bu nedenle, apoptoz, sitotoksik kemoterapinin etkinliğinin tespit edilebildiği çeşitli biyobelirteçler kullanılarak serumda ölçülebilir [6, 13]. Kemoterapi seansını takiben 24 veya 48 saat gibi erken bir zamanda apoptozun saptanması, kemoterapinin apoptozu indükleyen etkisine bir direnç tespit edilirse, klinisyene tedavi rejimine olan yanıtı erken zamanda değerlendirme ve buna göre değiştirme şansı verebilir.

De Haas ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada [17], kemoterapi sonrası hem serum M30 antijen hem de M65 düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir. Bu tahliller, testis kanseri hastalarında kemoterapiye bağlı hücre ölümünü de yansıtabilir [17]. Ayrıca, diğer çalışmalar, sırasıyla prostat, akciğer ve meme kanserlerinde kemoterapi sonrası M30 antijen [7, 26] ve M65 seviyelerinin [8] arttığını bildirmiştir. Yapılan çalışmalar dolaşımdaki hücre ölümü biyobelirteçlerinin hastalıkları erken bir aşamada tespit etmeye, hastanın tedaviye verdiği yanıtı izlemeye ve hastalarda prognozu tahmin etmeye yardımcı olabileceğini göstermektedir. Ancak, kemoterapi sonrası erken dönemde bu belirteçlerin değerlerindeki değişimin kemoterapiye tümör yanıtını ve prognozu ne düzeyde yansıttığı

ile ilgili çalışmaların sonuçları çelişkilidir [6, 17, 19-21, 27-31]. Metastatik kanserli hastalarda ise kemoterapi sonrası serum M30 antijen ve M65 seviyelerindeki değişiklikleri ve bu değişiklikler ile tedavi yanıtı arasındaki ilişkiyi araştıran literatürde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı değişik tür tümörleri bulunan metastatik kanser hastalarında kemoterapi öncesi ve sonrası M30 ve M65 değerlerindeki değişim ile radyolojik tedavi yanıtı arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmaktır.



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Hücre ölümü süreçleri

Hücre ölümü, kanser veya nörodejeneratif hastalıklar gibi farklı patolojik durumlar ile ilintili ve hücresele seviyeden başlayarak, çok kapsamlı fizyolojik bir homeostatik regülasyondan sorumlu oldukça kritik bir süreçtir [32]. Hücre ölümü süreçlerinin çok çeşitli olması ve farklı kritik hastalıklar ile ilişkilendirilmesi, bu alanda yapılan çalışmaların önemini arttırmaktadır.

Mevcut literatürde, düzenlenmiş hücre ölümü, kaza sonucu hücre ölümü [33], yaşlanma, nekroz, düzenlenmiş nekroz [34, 35], tip I hücre ölümü, tip II hücre ölümü, tip III hücre ölümü [33, 36, 37], kanibalistik hücre ölümü [38], programlanmış nekroz [39], aponekroz [40], netoz [41], nekroptoz [41, 42], apoptoz, mitokondriyal apoptoz [43], intrinsik apoptoz, ekstrinsik apoptoz [44], apoptotik olmayan hücre ölümü [34], apoptotik olmayan düzenlenmiş hücre ölümü [45], dejenerasyon [46, 47], partanatoz [48], entoz [38, 49], kornifikasyon [50], onkoz [51], paraptoz [52], anoikiz [53], piroptoz [54], ferroptoz [55], fagoptoz [56], kaspaz-bağımsız apoptoz [57, 58], kaspazlardan bağımsız hücre ölümü [59] ve eksitotoksisite [60, 61] gibi çok farklı hücre ölüm süreçleri bulunmaktadır. Bu denli çok sayıda hücre ölüm mekanizmasının varlığından dolayı, hücrelerde ve dokularda hücre ölümü ile ilgili olayların kesin olarak tanımlanması ve karakterize edilmesi; hastalık patojenezini anlamak ve etkili terapötik stratejiler tasarlamak için kritik önem taşımaktadır. Bu sebeple, hücresele ölüm süreci başlamış veya tamamlanmış olan hücrelere yönelik prosedürlerin öncelikle spesifik olması beklenmektedir. Başka bir deyişle, 'genel' ve 'hücre ölümü tipine özgü' teknikler arasında net bir ayrım yapılmalıdır. Bunun yanı sıra bu süreçlerin hassasiyeti ve kesinliği, yani hücre ölümü ile ilgili parametrelerin kalitatif, yarı-kantitatif veya kantitatif yöntemlerle tespit edilmesi son derece kritiktir. Hücre ölüm sürecinin hangi aşamada olduğunun belirlenmesi gerekmektedir. Hücre ölüm kaskadının indüksiyon-başlatma, entegrasyon- karar verme veya ilerleme-bozunma aşamalarından hangisinde olduğu, spesifik bir şekilde biyokimyasal olarak tespit edilmelidir. Son olarak, morfolojik veya biyokimyasal olarak hücre ölüm parametreleri belirlenmelidir [32].

1.1.1. Hücre ölümü tipleri

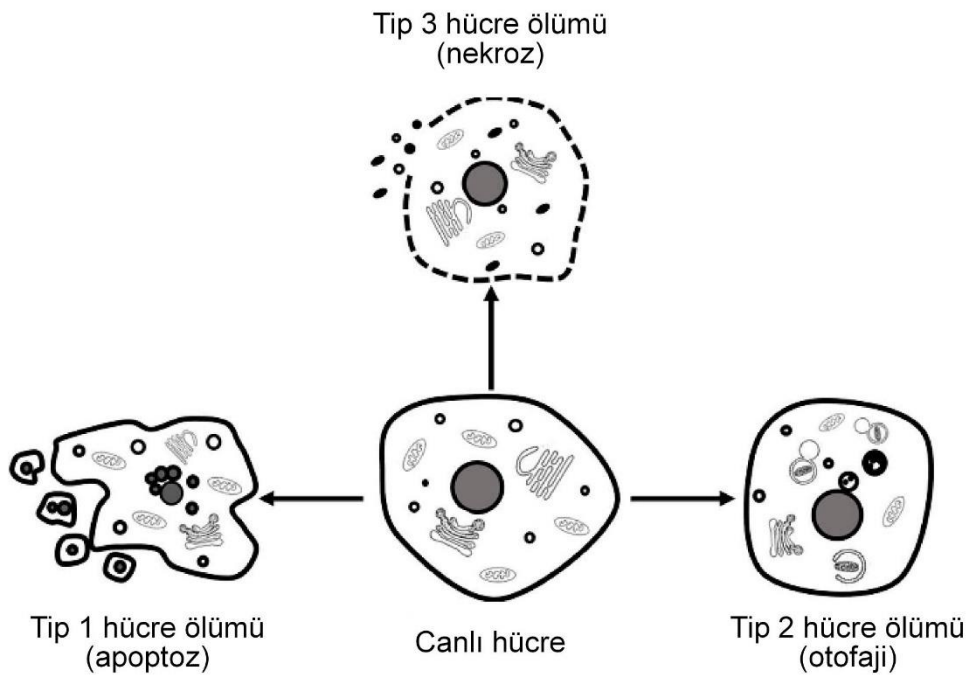
Hücre ölümü, makroskopik morfolojik değişikliklerle kendini gösterir. Ölü hücrelerin ve hücre ölümü sonrası ortaya çıkan parçaların bertaraf edildiği mekanizmalar birlikte ele alındığında, bu tür morfotiplerin üç farklı biçimde sınıflandırıldığını söylemek mümkündür. İlk olarak, tip I hücre ölümü veya apoptozda; sitoplazmik büzülme, kromatin yoğunlaşması (piknoz), nükleer parçalanma (karyorrheksis), hücre membranında çıkıntılar ve genellikle apoptotik cisimler olarak da bilinen küçük intakt veziküllerin oluşumu gözlenir. Genellikle proksimaldeki fagositik aktiviteye sahip hücreler tarafından alınır ve lizozomlar sayesinde parçalanır. Öte yandan, otofaji olarak da bilinen tip II hücre ölümü, sitoplazmada bulunan kofulların sayıca artması ve yaygınlaşmasıyla kendini gösterir ve benzer şekilde fagositik alım ve ardından lizozomal parçalanma ile sonuçlanır. Tip III hücre ölümü veya diğer bir adıyla nekroz, tip I veya II hücre ölümünün ayırt edici özelliklerini göstermez ve bariz fagositik aktivite ve lizozomal tutulum yokluğunda hücre artıklarının dağılmasıyla sona erer [37, 62].

Son yıllarda yapılan çalışmalar sayesinde, geri döndürülemez şekilde hasar görmüş ve / veya potansiyel olarak zararlı hücrelerin hedefli bir şekilde ortadan kaldırılması için genetik olarak kodlanmış bir dizi mekanizma ayrıntılı olarak ortaya çıkarıldı ve karakterize edildi [63]. Dahası, fizyolojik ve patolojik olarak organizmanın homeostazını regüle eden en önemli süreçlerden biri olan düzenlenmiş hücre ölümünün, farmakolojik veya genetik müdahalelerle modüle edilebileceği anlaşıldı. Temelinin moleküler mekanizmalara dayandığı bu hücre ölümünün aksine, kaza sonucu hücre ölümünde yoğun fiziksel aktivite, yüksek basınç, sıcaklık, ozmotik kuvvetler ve ani pH değişimleri gibi faktörlerin etkili olduğunu söylemek mümkündür [33].

Olası bir ekzojen faktörün yokluğunda, yerleşik fizyolojik mekanizmalar tarafından programlanan hücresel yıkım gerçekleşir. Bu mekanizma belirli faktörlerin kontrolünde ve bir devinim halindedir. Bahsi geçen türde gerçekleşen düzenlenmiş hücre ölümü, programlı hücre ölümü olarak da adlandırılmaktadır [64]. Bunun yanı

sıra, intraselüler veya ekstraselüler bozunumların çok olması durumunda hücresel stresin önüne geçmek ve hücresel homeostazı düzenleyebilmek adına düzenlenmiş hücre ölüm mekanizmaları devreye girer. Genellikle intraselüler veya ekstraselüler bozunumların çok uzun veya yoğun olduğu durumlarda kontrolü eline alan bu mekanizmalar, adaptif bir yanıt oluşturur. İntraselüler veya ekstraselüler stres kaynaklı düzenlenmiş hücre ölümü aynı zamanda biyolojik bir dengenin korunması için oldukça kritik bir strateji oluşturur ve dolayısıyla adaptif stres yanıtları ile yoğun benzerlik taşır [65]. Adaptif stres yanıtları, hücresel seviyede etki eder. Bu durum organizmal düzeyde homeostazın korunmasını desteklemektedir. Dolayısıyla, hücre ölümü sonrası sadece hücresel homeostaz tetiklenmez; organizmal düzeyde bir etki görülür. Bu homeostatik fonksiyon, yalnızca işlevsiz veya potansiyel olarak tehlikeli hücrelerin elimine edilmesinde rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda ölmekte olan hücrelerin açığa çıkardığı moleküllerin sebep olabileceği olası bir tehdit konusunda da organizmayı alarm durumuna geçirir. Bahsi geçen sinyaller, genellikle hasarla ilişkili moleküler modeller veya alarminler olarak adlandırılır [66, 67].

Şekil 1. Hücre ölümü tiplerinin şematik gösterimi



1.1.1.1. Apoptoz

Apoptoz, ilk olarak 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından yayınlanan bir makalede morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü türünü tanımlamak için kullanıldı [68]. En temel tabirle çevresel faktörler tarafından hasarlanmış DNA'ya sahip hücrelerin, organizmayı oluşabilecek daha fazla zarara karşı koruma amacıyla programlanmış hücre ölümüne sürüklenmesi durumudur. Hücreler ölümü, doku homeostazını koruma hedefiyle gerçekleştirir. Klasik hücre ölüm mekanizması olarak bilinen nekrozdan çok farklı bir hücre ölüm mekanizmasına işaret etmektedir [69]. Apoptozun başlaması, kaspaz olarak bilinen bir dizi sistein-aspartik proteazın aktivasyonuna bağlıdır. Kaspazlar, başlatıcı kaspazlar ve uygulayıcı kaspazlar olmak üzere iki temel kategoride incelenmektedir.

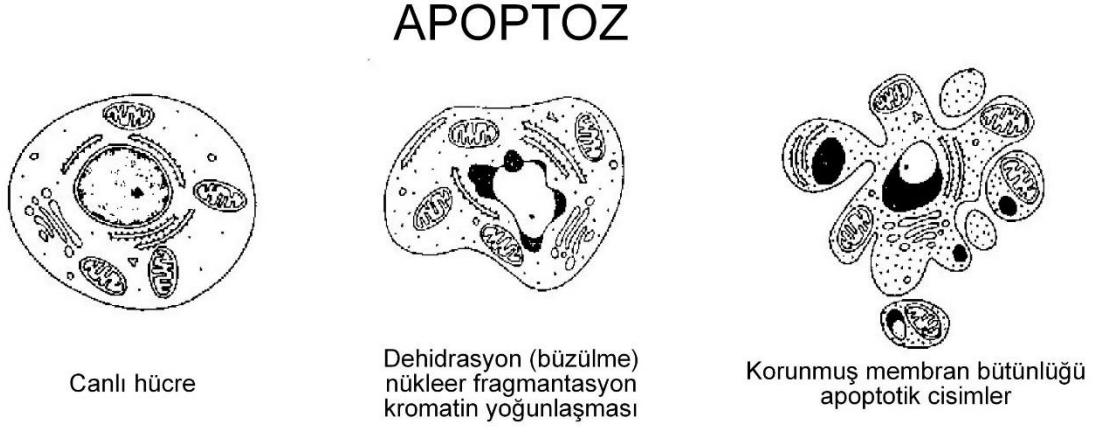
İntrinsik apoptoz, mitokondriyal apoptoz yolağı olarak da bilinir. Bu apoptoz şekli mitokondriden salınan faktörlere bağlıdır ve pozitif veya negatif bir yolak tarafından tetiklenir. Negatif sinyaller, hücrenin yakın çevresinde sitokinlerin, hormonların ve büyüme faktörlerinin bulunmamasından kaynaklanır. Hayatta kalmayı tetikleyen bu sinyaller olmadan, normalde inhibe edilmiş halde bulunan hücre içi pro-apoptotik moleküller aktif hale gelir ve apoptozu başlatır. Apoptozu başlatan diğer faktörler doğası gereği pozitifdir ve hipoksiye, toksinlere, radyasyona, reaktif oksijen türlerine, virüslere ve çeşitli toksik ajanlara maruz kalmayı gerektirir [70]. Başka bir deyişle intrinsik apoptoz, büyüme faktörlerinin azalması veya geri çekilmesi [71], DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi, reaktif oksijen türlerinin önlenemeyen artışı, replikasyon stresi, mikrotübüler değişiklikler veya mitotik kusurlar gibi birçok farklı mikro çevresel bozukluk ile karakterize bir düzenlenmiş hücre ölüm mekanizması çeşididir [72]. Apoptotik hücreler, süreç tamamlanırken bir dereceye kadar plazma membran bütünlüğünü ve metabolik aktivitelerini korumayı başarırlar. Bu durum, *in vivo* ortamda apoptotik hücrelerin makrofajlar veya fagositik aktiviteye sahip diğer hücreler tarafından hızlı bir şekilde ortadan kaldırılmasına olanak verir. *In vitro* ortamda ise durum daha farklıdır. Son aşama apoptotik bir hücrede, kültürlenmiş hücreler fagositik aktivite göstermediği takdirde, genellikle hücre membranının tamamen parçalanması ve ikincil nekroz olarak da bilinen nekrotik bir fenotipin gözlenmesi söz konusudur [73].

Ekstrinsik apoptoz ise ekstraselüler faktörlerin etkili olduğu, mikro çevrelerdeki bozulmalarla ilintili bir düzenlenmiş hücre ölüm mekanizmasıdır. Çoğunlukla iki tip hücre membran reseptörü tarafından regüle edilir. Bunlardan ilkin, ilgili ligandların bağlanması sonucu aktive olan ölüm reseptörleri, diğerini ise aktivasyonun bazı ligandların belirli eşik değeri altına düşmesiyle gerçekleştiği reseptörler oluşturmaktadır [74]. Bu sebeple ekstrinsik apoptoz, apoptozun ölüm reseptörü yolağı olarak da bilinir. Doğal öldürücü hücrelerin veya makrofajların, hedef hücre zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanmaları sonucu her reseptöre spesifik ölüm ligandları salgılanır [70, 75]. Tablo 1’de bazı ölüm reseptörlerine spesifik ölüm ligandları gösterilmektedir.

Tablo 1: Ekstrinsik apoptoz yolağındaki bazı ölüm reseptörleri ve bu reseptörlere spesifik ölüm ligandları

Ölüm reseptörü	Ölüm Ligandı
Tümör nekroz faktör (TNF) reseptörü 1	Tümör nekroz faktör (TNF)
CD95 (Fas veya APO-1)	CD95-L (Fas-L)
Ölüm reseptörü 3	TLIA
TNF ilgili apoptoz indükleyici ligand reseptörü 1 (TRAIL-R1)	TRAIL
TNF ilgili apoptoz indükleyici ligand reseptörü 2 (TRAIL-R2)	TRAIL

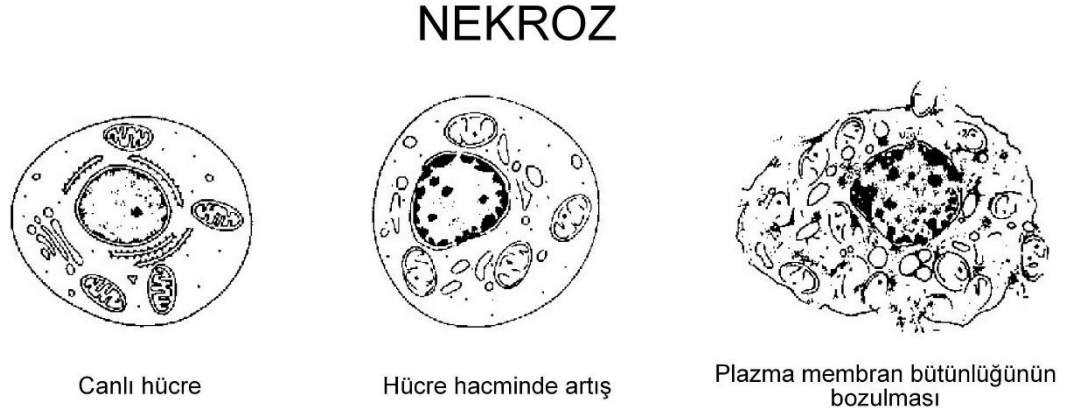
Şekil 2. Apoptozun şematik gösterimi



1.1.1.2. Nekroz

Nekroz, apoptozdan farklı olarak, hipoksi veya enflamasyon gibi harici hasarlar ile indüklenen alternatif bir kontrolsüz hücre ölümü biçimidir [75]. Bu süreç genellikle nükleer faktör- κ B gibi çeşitli pro-enflamatuar proteinlerin ve bileşiklerin artan biyolojik aktivitesi ile tanımlanır. Pro-enflamatuar moleküllerin artışı, hücre zarının yırtılmasına neden olarak hücre içeriğinin ekstraselüler matrise dağılmasına ve dolayısıyla bir dizi iltihaplanma ve doku hasarına sebebiyet verir. Apoptozun aksine nekroz, hücrenin radyasyon, ısı, kimyasallar veya hipoksi gibi ani bir şokla fonksiyonelliğini kaybedecek ve işlevini yerine getiremeyecek kadar şiddetli hasar gördüğü, enerjiden bağımsız bir hücre ölümü biçimidir. Hücre, çevresi ile homeostazını sürdürmede başarısız olduğu için, genellikle onkoz olarak bilinen bir sürece maruz kalır ve bunun sonucunda hücre hacminde artış gözlenir. Bu artış, apoptoz ile ilintili hücre sel büzülmenin tam aksi bir fenotip sergiler. Hücre hacmindeki artış, hücrenin infilak etmesi ve sitoplazmik organeller de dahil olmak üzere hücre sel artıklarının dağılmasıyla sonuçlanır [70, 75].

Şekil 3. Nekrozun şematik gösterimi



1.1.1.3. Nekroptoz

2005 yılında, nekroz özelliklerini gösteren, ancak katı bir şekilde düzenlenen yeni bir hücre ölüm mekanizması tanımlandı. Nekroptoz olarak adlandırılan bu yeni hücre ölüm mekanizmasının, oldukça düzenli bir nekroz çeşidi olduğu anlaşıldı [76]. Nekroptoz süreci, apoptoz eksikliği olan bir ortamda reseptörle etkileşen proteinler 1 (RIP1) ve 3 (RIP3) tarafından kontrol edilmektedir. Nekroptoz aktivasyonunu, başta tümör nekroz faktör reseptörü 1 (TNFR1) olmak üzere, ölüm reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Bunun yanı sıra TNF ilgili apoptoz indükleyici ligand reseptörü ve Fas reseptörü gibi birçok kritik reseptörün nekroptozu tetiklediği bilinmektedir [77, 78].

1.2. Hücre ölümü belirteçleri

Hücre ölüm süreçleri, bozulan homeostazın tekrar düzenlenmesi ve var olan homeostazın korunmasında kritik rol oynamaktadır. Yaşlanmış, enfekte olmuş, hasar görmüş veya hücre döngüsünde hatalara sebebiyet veren mutasyonlara sahip hücreleri ortadan kaldırır. Dolayısıyla, hücre ölüm süreçleri hücreler ve hatta organizma için hayati önem taşır. Hücre ölüm mekanizmalarında gözlenen artış veya azalışın çok çeşitli patojenezler ile korele olduğu bilinmektedir. Örnek olarak, artan apoptotik hücre

ölümü, nörodejeneratif bozukluklarda ve immün yetmezlikte rol oynar [79, 80]. Kanser konusunda ise, hücre ölüm süreçlerinin oldukça kritik ve hayati olduğunu söylemek mümkündür. Kemoterapötik ilaçlar, kanser hücrelerinde sitotoksik etkinlik göstererek tümör hücrelerini ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır. Dikkat çekici bir şekilde, kemoterapiye bağlı bazı hücre ölümü türleri antineoplastik etkinin de önüne geçmektedir. Yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan olan antrasiklinlerin, immünojenik bir hücre ölümünü indüklediği bilinmektedir. Antrasiklin ile tedavi edilen tümör hücreleri, antijen sunan hücreleri uyaran ve tümör hücrelerine karşı bir T-hücre yanıtını destekleyerek hasara bağlı moleküler modelleri serbest bırakır [81]. Hücre ölüm süreçlerinin farklı hastalıklardaki temel rolü göz önünde bulundurulduğunda; hastalığın gidişatını izlemek, tedaviye alınacak yanıtı öngörmek veya hastanın prognozunu tahmin etmek açısından hücre ölüm biyobelirteçlerinin önemi artmaktadır. Sirküle eden belirteçlerin tespit edilmesi ve gözlenmesi, var olan hastalıkların anlaşılması ve hücre ölüm mekanizmalarının belirlenmesi bakımından hayati önem taşımaktadır.

1.2.1. Sirküle apoptoz belirteçleri

Apoptoz durumunda, hücre zarı bütünlüğü yaklaşık bir gün boyunca korunur [82]. Bu süre zarfında, efektör kaspazlar hücre içi yapıları ve organelleri bozar ve ardından, bunlar küçük hücre dışı veziküllerde salınır. Bu durum, kalan hücre kalıntısının küçülmesine yol açar. Hücre zarı bozulmadan fagositler tarafından alım için uygun ortam oluşur [83]. Böylelikle apoptotik hücreler, herhangi bir enflamasyon indüksiyonu olmaksızın ortadan kaldırılabilir. Düzenlenmiş hücre ölüm süreçleri, spesifik moleküllerin proteolitik olarak parçalanması veya fosforilasyonu gibi bazı translasyon sonrası modifikasyonlar ile ilişkilidir. Apoptoz süreci, efektör kaspaz 3, 6 ve 7'nin proteolitik olarak parçalanması, dolayısıyla aktive olmasıyla gerçekleşir. Proteolitik parçalanma sonrası oluşan alt birimler aktif bir heterodimer oluştururlar. Ardından, oluşan bu heterodimer, Asp-Glu-Val-Asp amino asit sekansını içeren bir aktif bölgede substratını parçalar [84]. Şimdiye kadar 300'den fazla aktive edilmiş efektör kaspaz substratı tanımlanmıştır. Dolayısıyla, birçok farklı apoptoz biyobelirteçi mevcuttur.

1.2.1.1. Kaspaz 3

Kaspaz 3 apoptozun en bilinen ve en kritik biyobelirteçlerinden biridir [7]. Normal nöronal gelişim ve nöropatolojide önemli işlevleri olan altı proteaz ailesinden biri olan sistein-aspartat proteaz ailesine aittir [85]. Aktivasyon durumunda, hücreyi parçalayabildiği için apoptozun önemli efektörlerindendir. Apoptoz sürecinde oluşan proteolitik parçalanma sonrası alt birimler ortaya çıkar. Bu alt birimler aktif heterodimer oluşumuna katkıda bulunurlar. Ortaya çıkan heterodimerlerin Asp- Glu- Val-Asp amino asit dizisinin de içinde bulunduğu bir aktif bölgede substratını parçaladığı bilinmektedir [67, 84]. Çeşitli hücre dışı sıvılarda proteazın uzun süre boyunca Asp-Glu-Val-Asp amino asit sekansını içeren tetrapeptid dizisini parçalama fonksiyonu devam eder [86]. Bu proteolitik reaksiyon, apoptozla ilgili diğer kaspazlar tarafından da katabolize edilebilir. Dolaşımdaki Asp-Glu-Val-Asp amino asit sekansının parçalama aktivitesi genellikle kaspaz 3/7 aktivitesi olarak adlandırılır. Efektör kaspazları oldukça fazladır [86]. Örneğin, kolorektal kanserin 5FU ile tedavisi, kanser dokusunda kaspaz 3 aktivasyonunu indükler [87]. Benzer şekilde, kolorektal kanser hastalarının, 5FU bazlı kemoterapi uygulaması sonrası serum kaspaz 3/7 aktivitesinde artış gözlenmiştir [88].

Meme kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada, tümör evresi ile ilişkili olarak serumda yüksek düzeyde Asp-Glu-Val-Asp amino asit sekansı parçalanma aktivitesi tespit edilmiştir [89]. Kritik hastaların dolaşımlarında kaspaz 3/7 aktivitesinde artışı gözlenmesinin ardından, birçok farklı hastalıkta bu enzimin rolü derinlemesine araştırılmaya başlandı. Travma sonrası hastaların beyin omurilik sıvısı örneklerinde, sağlıklı kontrollere göre yaklaşık üç kat Asp-Glu-Val-Asp amino asit sekansı parçalanma aktivitesi tespit edildi [86]. Mevcut çalışmalar ve bulgular, apoptotik hücre ölümünün tespiti için, kaspaz 3 aktivitesinin sirküle eden umut verici bir biyobelirteç olduğunu doğrulamaktadır.

Kaspaz-3, umut verici bir apoptoz belirtecidir. Yapılan bir çalışmada, serum kaspaz-3 aktivitesi ile anevrizmal subaraknoid kanamanın şiddeti ve prognozu arasındaki ilişki analiz edilmiştir. Çalışma başlangıcında 118 sağlıklı bireyin ve 118 anevrizmal subaraknoid kanama geçirmiş hastanın serum kaspaz-3 aktiviteleri belirlenmiştir.

Hasta grubunda anevrizmal subaraknoid kanamadan sonraki 1, 2, 3, 5 ve 7. günlerde serum kaspaz-3 aktiviteleri belirlenmiştir. Serum kaspaz-3 aktivitesinin anevrizmal subaraknoid kanama sonrası artmış, 3. günde zirveye ulaşmış, daha sonra kademeli olarak azalmış olduğu tespit edilmiştir. Hasta grubunda, sağlıklı bireylere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek aktivite saptanmıştır. Kaspaz-3 aktiviteleri, ölen veya olumsuz bir sonuçtan muzdarip olan hastalarda daha yüksek çıkmıştır. Özetle bu çalışmada, artmış serum kaspaz-3 aktivitesinin, anevrizmal subaraknoid kanama sonrası prognoz ile oldukça ilişkili olduğu anlaşılmıştır [90].

Dolaşımdaki enzimatik aktivitenin ve belirteçlerin tespit edilmesi bazı durumlarda karmaşık olsa da, kaspaz 3 enzimi için kolay tespit sağlayan kullanıma hazır kitler mevcuttur. Bu enzim kitleri, Asp-Glu-Val-Asp amino asit sekansı içeren bir prolüminesan kaspaz substratı uygular. Dolaşımdaki aktif kaspaz, bu substratı parçalar ve parlak bir sinyal ortaya çıkarır. Dolayısıyla mevcut tekniklerle, programlı bir hücre ölümü olan apoptozu anlayabilmek için sirküle eden kaspaz 3 belirtecini tespit etmek ve bu sayede farklı hastalıklarda apoptoz seviyesini belirleyebilmek mümkündür.

1.2.1.1.1. Kaspaz aktivitesiyle bölünen sitokeratin-18

Programlanmış bir hücre ölümü olan apoptoz sırasında efektör kaspazlar, başta sitokeratin 18 olmak üzere birçok farklı proteini böler. Sitokeratin 18 proteininin, karaciğer, bağırsak, akciğer, böbrek, kemik iliği, endokrin dokular gibi çeşitli dokularda ve bunun yanı sıra epitelyal kökenli birçok katı tümörde yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir [11]. Bununla birlikte, beyin, kas, deri ve bağışıklık hücrelerinde neredeyse yoktur. Sitokeratin 18, biri Asp238, diğeri ise Asp396 olmak üzere iki farklı lokasyonda efektör kaspazlar tarafından bölünür [91]. Asp396 lokasyonundan sonraki bölünme, M30 neo-epitopunun açığa çıkmasına sebebiyet verir. M30'a karşı antikorlar, doku kesitlerinde kaspazla bölünmüş sitokeratin 18'i saptamak için kullanılmaktadır [6]. Bu antikorum apoptotik hücreleri tespit etme özgüllüğü bağırsak epitelinde gösterilmiştir. Bağırsak epiteli, kriptin dibinde bulunan kök hücreler tarafından sürekli yenilenir. Olgunlaşma sırasında, villus ucuna doğru hareket ederler. Bu hareket, hücre yaşlanmasına ve ardından hücre ölümüne işaret etmektedir. Bu aşamada apoptotik cisimciklerin oluşumu, nükleer yoğunlaşma, sitoplazmik büzülme ve membran

kabarması gibi apoptoza ait tipik morfolojik özellikler gözlenir. Yapılan çalışmalarda, M30 antikoru bu apoptotik hücrelere spesifik olarak bağlandığı tespit edilmiştir [12].

Kaspaz ile bölünmüş sitokeratin 18 ise apoptotik hücrelerden dolaşıma salınır. M30-monoklonal antikoru ise apoptoz sırasında kaspaz bölünmesinden sonra oluşan bir sitokeratin 18 neo-epitopunu tanımaktadır.

Asp396 lokasyonunda bölünen ve M30 antikoru ile karsinomali hastaların dolaşımında tespit edilen M30 antijeni, bu hastalarda apoptoz ile ilgili kritik bilgiler vermektedir. Bir çalışmaya, malign akciğer kanseri bulunan 60 hasta, benign akciğer hastalığı bulunan 22 hasta ve sağlıklı 32 birey katılmış ve katılımcıların apoptoz seviyelerinin tespiti için M30 değerleri ölçülmüştür. Bazal M30 antijen seviyeleri, hayatta kalma sürelerini tahmin etme bakımından değerlendirilmiştir. Bazal M30 antijen seviyeleri yüksek olan hastaların, daha düşük bazal M30 antijen seviyesine sahip hastalara göre anlamlı olarak daha kısa sağ kalıma sahip olduğu belirlenmiştir [7]. Akciğer kanseri hastalarında sitotoksik tedavinin serum M30 antijenini artırıp artırmadığını belirlemek için, kemoterapiden önce ve kemoterapiden 24 saat ve 48 saat sonra 18 akciğer kanseri hastasında M30 antijen düzeyleri izlendi. 48 saatte M30 antijen seviyelerinde yaklaşık dört kat artış gözlemlendiği bildirildi. Bu sonuçlar, serum M30 antijeninin akciğer kanseri hastalarında kemoterapinin etkinliğinin izlenmesi için ilk kez yeni bir biyolojik belirteç olarak kullanılabileceğini göstermesi bakımından hayati önem taşımaktadır. Buna ek olarak, M30 seviyesinin sağ kalımı tahmin etmeye yardımcı olacağı düşünülmektedir. Yüksek seviyelerde M30 antijeni olan hastalar daha kısa hayatta kalma durumu sergilemektedir [7].

Mevcut literatürde, kanser hastalarında kemoterapi sonrası artan apoptoz seviyesini araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların en önemlilerinden biri, Ulukaya ve ark. tarafından yapılan ve apoptozun spesifik bir belirteci olan kaspazla bölünmüş sitokeratin 18'in (M30-antijen) ELISA ile tespitinin hedef alındığı araştırmadır. Metastatik olmayan ve metastatik malign meme kanserli 37 hasta, benign meme kanserli 35 hasta ve 34 sağlıklı birey ile yapılan bu çalışmada, kanser hastaları, fluorourasil, epirubisin ve siklofosfamid veya epirubisin + dosetaksel

kombinasyonundan oluşan neoadjuvan kemoterapi aldı. Malign grupta kemoterapi öncesi, kemoterapiden 24 ve 48 saat sonra belirgin ölçüde apoptoz saptandı. Metastatik grupta kontrol grubuna göre apoptozun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi. Çalışmanın sonuçlarına göre ilaç uygulamasını takiben M30 antijen seviyeleri 24. saatte anlamlı olarak artış gösterdi. Başlangıçtaki M30-antijen seviyeleri, tümör gerilemesi gösteren hastalarda yaklaşık 3 kat yüksek bulundu [13]. Bu çalışma, meme kanseri vakalarında kemoterapiden sonra M30 antijen seviyesinde, dolayısıyla apoptozda artış tespit edilmesi ve bu sayede klinisyenlerin kemoterapinin etkinliğini daha erken tahmin etmesine yardımcı olması bakımından büyük önem taşımaktadır. Bu alanda yapılacak çalışmalar için yol gösterici niteliktedir.

Neoadjuvan kemoterapi olarak gemsitabin uygulaması yapılan hastalardan alınan pankreas kanseri örneklerinde preoperatif neoadjuvan kemoterapinin patolojik etkilerini ve apoptoz, epitelden mezenkime geçiş ve kanser kök hücre belirteçlerinin ekspresyonu incelenmiştir. Apoptoz belirteci M30, epitelden mezenkime geçiş belirteci Snail ve kanser kök hücre belirteci CD44, gemsitabin ile tedavi edilen hastalarda ve tedavi edilmeyen hastalarda incelenmiştir. Neoadjuvan kemoterapi grubundandan alınan tümör örneklerinde, tümör hücresi hasarı gözlenmiştir. Bununla birlikte serozal, retroperitoneal, perinöral veya vasküler invazyon, lenf nodu metastazı veya tümör boyutunda önemli bir azalma olmamıştır. M30 ve CD44 belirteçlerinin miktarları neoadjuvan kemoterapi grubunda önemli ölçüde daha yüksek bulunmuş, ancak, iki grup arasında epitelden mezenkime geçiş belirteçlerinde önemli bir fark görülmemiştir. Gemsitabin, in vivo olarak pankreas kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklemiş; ancak tümör yükünü azaltmamıştır. Ayrıca, kalan kanser dokularının kemoterapiye dirençli kanser kök hücreleri bakımından zengin olduğu saptanmıştır [14].

Meme kanseri olan hastalarda dolaşımda artış gösteren M30-antijen düzeyinin, kemoterapotik yanıt ile ilişkili olduğunu saptamıştır [6].

M30 antikoru kullanarak, ölü hücrelerin ikincil nekrotik hale gelmeden önce apoptotik hücre ölümü yoluna girdiği gösterilmiştir [92]. M30 belirtecinin varlığı, metastaz ve azalan sağ kalım için bağımsız bir risk faktörüdür. Sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında, kolorektal kanser hastalarında yüksek oranda kaspaz ile bölünmüş

sitokeratin 18 tespit edilmiştir. Dolaşımdaki kaspaz ile bölünmüş sitokeratin 18 miktarı, aynı bölünme ürünüde M30 antikorunu M5 antijenine karşı bir antikorla birleştiren spesifik bir ELISA ile tespit edilmiştir [4].

1.2.1.1.2. Kaspaz aktivitesiyle bölünen sitokeratin-18 (M30) ve bölünmemiş sitokeratin-18 (M65)

Dolaşımdaki kaspaz ile bölünmüş sitokeratin 18 miktarı, aynı bölünme ürünüde M30 antikorunu antijen M5'e karşı bir antikorla birleştiren spesifik bir ELISA ile belirlenmiştir. Bu ELISA genellikle, M6 ve M5 antijenlerine karşı antikorlar kullanılarak dolaşımdaki toplam kaspaz ile bölünmüş sitokeratin 18 miktarını nicelleştiren bir M65 ELISA ile karşılaştırılır. M30 ve M65'teki pozitif bir sinyal apoptozu gösterirken, M65'e özel bir pozitif sinyal sadece nekrozu göstermektedir. Başka bir deyişle, M65, apoptozun yanında nekrozun da olduğunu belirtmektedir [19]. Apoptoz sırasında, sitokeratin 18 kaspazlar tarafından bir proteolitik bileşene bölünür. Sadece M30 değil, aynı zamanda M65 de sitokeratin 18'in dolaşımdaki fragmanlarından biridir. M30 sitokeratin 18'in kaspazla bölünmüş türevi iken, M65, sitokeratin 18'in bozulmamış formudur [15]. M30 apoptoz sırasında salınırken, M65 hem apoptoz hem de nekroz sırasında salınır. Dolayısıyla, dolaşımdaki M65 miktarı da kanser hastalarında kemoterapi sonrası gözlenen hücre ölümü hakkında hayati bilgiler veren bir biyobelirteçtir.

Yapılan bir çalışmada, transizyonel hücreli mesane karsinomunun tanısı ve izlenmesi için sitokeratinler dahil olmak üzere çeşitli belirteçlerin kullanımı önerilmektedir. Buna göre, dolaşımdaki sitokeratin-18 (M65) ve kaspazla bölünmüş formu (M30), transizyonel hücreli mesane karsinomu bulunan bir grup hastada araştırılmıştır. Cerrahi rezeksiyon öncesi 60 hastadan serum örnekleri toplanmış ve bu gruba rezeksiyon sonrası 26 hastanın örnekleri de dahil edilmiştir. Çalışmada M30 ve M65 moleküllerinin seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçülmüş ve bu belirteçler ile hastaların klinik özellikleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Preoperatif M30 ve M65 seviyeleri arasında bir korelasyon tespit edilmiş ve M65 seviyesinin, tümör evresi ve derecesi bakımından kritik bir öneme sahip olduğu anlatılmıştır. Tümör derecesi III / IV olan hastaların, tümör derecesi I / II olan hastalara kıyasla daha yüksek M65 seviyesine sahip olduğu bulunmuştur. Tüm hastalar ele alındığında, M30 seviyelerinin oranının M65 oranına

kıyasla oldukça yüksek olduğu anlaşılmıştır. Bu bulgu, çalışmanın önemli noktalarından biridir. T1/T2 evre transizyonel hücreli mesane karsinomlu hastalarda sitokeratin-18 seviyesinin, kaspazla bölünmüş sitokeratin-18 seviyesinden az olduğu, başka bir deyişle apoptoz oranının, nekroz oranına kıyasla arttığı gösterilmiştir. T3 / T4 evre tümörlü hastalarda daha düşük M30: M65 olduğu belirlenmiş, yani apoptoz seviyesi azalmış; nekroz seviyesi artmıştır. Operasyon sonrası M30 ve M65 seviyeleri, ameliyat öncesine göre farklı bulunmamıştır. Bu çalışmada elde edilen veriler, hem M65 hem de M30:M65 oranı ile tümör ilerlemesi arasında bir ilişki olduğunu ve bu seviyelerin transizyonel hücreli mesane karsinomu izlemedeki önemini açıkça göstermektedir [16].

Dolaşımdaki sitokeratin 18 ve kaspazla bölünmüş sitokeratin 18, başka bir deyişle M30 ve M65 seviyelerini ELISA yöntemiyle ölçerek, kemoterapi ile indüklenen hücre ölümünün tespit edildiği bir başka çalışmada yaygın testiküler germ hücre kanseri tespit edilen hastalar değerlendirilmiştir. M30, apoptoz sırasında üretilen kaspazla bölünmüş sitokeratin 18'i ölçer ve M65 ise çoğunlukla bölünmemiş sitokeratin 18'i tespit etmekte kullanılır. M65'in nekroza maruz kalan hücrelerden salındığının bilinmesi, kanser çalışmalarını bu alana yönlendirmiştir. Biyobelirteçlerin kullanılması kanser çalışmalarında devrim niteliği taşımaktadır. Yapılan çalışmalar, biyobelirteçlerin kanser tedavisinde prognostik, öngörücü ve farmakolojik araçlar olarak potansiyellerini vurgulamıştır. Yaygın testiküler germ hücre kanseri tespit edilen hastalarda tedavi öncesi ve sonrası boyunca M65 ve M30'un kümülatif yüzde değişiminin, yüksek prognozlu hastalarda artış gösterdiği bulunmuştur [17].

Başka bir çalışmada ise safra yolu kanseri teşhisi için hücre ölümü biyobelirteci sitokeratin 18'in etkinliği belirlenmiştir. Malign safra yolu kanseri tanısı konan 36 hasta ve benign safra yolu hastalığı tanısı konan 45 hasta ile yapılan bu çalışmada M30 ve M65 seviyeleri hücre ölümü biyolojik belirteçleri olarak kullanılmıştır. M30 seviyeleri apoptozu gösterir ve M65 seviyeleri hem apoptozu hem de nekrozu göstermektedir. Malign grupta M30 ve M65 düzeyleri benign gruba göre kritik seviyede yüksek bulunmuştur. M30'un teşhis edilebilirliğinin, test edilen diğer belirteçlere göre oldukça fazla olduğu anlaşılmıştır. Hücre ölümü biyobelirteçlerinin malign safra yolu kanserli hastalarda daha yüksek düzeyde arttığı ve M30 biyobelirtecinin safra yolu kanseri

tanısının konmasında anlamlı bir biyobelirteç olduğu görülmüştür [18].

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında paklitaksel tedavisi hem M30 hem de M65'in serum seviyeleri önemli ölçüde artmıştır ve M30:M65 oranının, hastaların genel sağkalımı için önemli bir prognostik faktör olduğu anlaşılmıştır [19].

Bir diğer çalışma, kemoterapi sonrası serum M30 ve M65 değerlerindeki değişiklikleri incelemiş, hem M30 hem de M65'in kemoterapiden 48 saat sonra yükseldiğini ve bunların hem progresyonsuz sağkalım, hem de genel sağkalım için kötü prognostik faktörler olduğunu belirlemiş, kemoterapi sonrası artan serum M65 seviyelerinin tümör yanıtını tahmin etmek için önemli bir kriter olduğu ileri sürülmüştür [20].

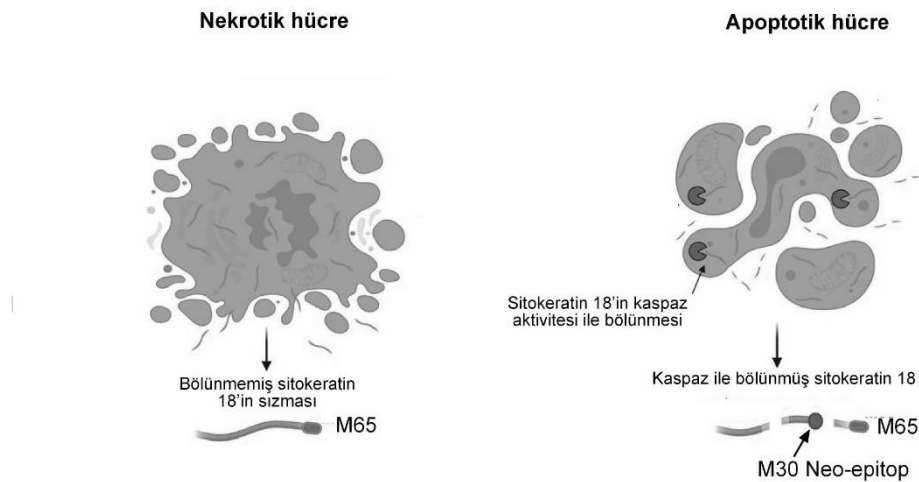
Neoadjuvan kemoterapi alması planlanan 48 akciğer kanseri hastası ve 38 sağlıklı gönüllü ile yapılan bir diğer çalışmada, M30 ve M65 seviyeleri kullanılarak, kemoterapi tedavisinden önce ve 48 saat sonra olmak üzere iki defa sitokeratin 18 seviyesi ölçülmüştür. Apoptotik ve toplam nekroz seviyeleri M65 ve M30 belirteçleri ile tespit edilmiş, beklendiği üzere kanser hastalarında M30 ve M65 antijen düzeyleri sağlıklı bireylere nazaran anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. M30 ve M65 antijen seviyeleri kemoterapiden 48 saat sonra, kemoterapi öncesine göre anlamlı ölçüde artmıştır. M30 seviyelerinin hastalık progresyonu olan hastalarda oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Akciğer kanserli hastalarda serum M30 ve M65 düzeylerinde önemli artış tespit edilmiş, kemoterapiye cevap vermeyen hastalarda serum M30 seviyelerinde daha büyük bir artış olduğu görülmüştür. Bu sonuç, apoptoz ve toplam nekrozun neoadjuvan kemoterapi alan hastalarda tek başına M30 ve M65 ölçümleri ile bu değerlerin oranının değerlendirilmesinin tedavinin etkinliğini belirlemeye katkıda bulunacağına işaret etmektedir [21].

M30 ve M65 seviyeleri, epitelyal kanserli hastalarda tümör hücresi aktivitesini anlamaya da yardımcı olmuştur. Meme kanserinin neoadjuvan tedavisinde M30 ve M65 düzeylerinin prediktif değerini belirlemeyi amaçlayan bir diğer çalışmaya, neoadjuvan kemoterapi uygulanan 41 meme kanserli hasta dahil edildi. Antrasiklin içeren 4 kür kemoterapiyi takiben, hastalara 12 hafta boyunca paklitaksel tedavisi uygulandı. Hastalardan kemoterapi öncesi ve 21. günde 2., 4. ve 8. siklulardan sonra

kan alındı. M30 ve M65 seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. 4. döngüde dolaşımdaki M30 ve M65 düzeylerinde artış olurken, 8. döngüden sonra bu düzeylerin azaldığı saptandı. Bununla birlikte, meme kanseri hastaları antrasiklin içeren kemoterapi almaya devam ettiklerinde M30 ve M65 seviyelerinin yükseldiği anlaşıldı [22].

Endometrial kanserli hastalarda serum oksidatif stres parametrelerinin ve serum M30, M65 düzeylerinin apoptotik belirteçlerinin prognostik değerini incelemeyi amaçlayan bir çalışmada, evre I endometrial kanserli hastalar ve sağlıklı bireylerin serum M30 ve M65 seviyeleri karşılaştırılmıştır. Evre-I endometrial kanserli kadınlarda toplam oksidatif stres indeksi ve serum M30 ve M65 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca serum M30 ve M65 seviyeleri, endometrial kanser grubunda ameliyat sonrası 8. günde ameliyat öncesine göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Ameliyat öncesi M30 ve M65 seviyelerinin, ameliyat sonrası seviyelerden daha yüksek olduğu bulgusu, erken evre endometrial kanserde oldukça kritik bir rol üstlenmektedir. Bozulmuş apoptotik aktivite, endometrial kanserin etiopatogenezinde önemli bir rol oynasa da, oksidatif stresin malign transformasyonda etkili olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla M30 ve M65 değerleri endometrial kanserli kadınların takibinde oldukça faydalı bilgiler sunmaktadır [23].

Şekil 4. Kaspaz aktivitesi ile bölünen sitokeratin-18 (M30) ve bölünmemiş sitokeratin-18 (M65)'in oluşumu



1.2.1.1.3. Nükleozom ve sirküle DNA

Aktive edilmiş efektör kaspazlarının bir başka hedefi, kaspaz ile aktive edilmiş DNaz inhibitörüdür. Kaspaz ile aktive edilmiş DNaz inhibitörünün bozulması, DNaz'ı aktive eder ve nükleozomlar arasında kromozomal DNA'nın bölünmesine yol açar [93]. Apoptotik hücreler ikincil nekroza doğru ilerlediğinde, nükleozomları süpernatanta bırakırlar. Oldukça immünojeniktirler ve örneğin, çift zincir DNA'ya karşı otoantikorların önemli bir rol oynadığı sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün hastalıkların gelişimine katkıda bulunurlar [94]. Nükleozomlar, her yıl toplam nükleozom konsantrasyonundaki %7 oranındaki azalmaya rağmen dolaşımda stabil kalır [67, 95]. Dolaşımdaki nükleozomların yüksek seviyelerde olması, sıklıkla farklı kanserlerde ve ayrıca travma, sepsis ve otoimmün hastalıklarda gözlenir [95]. Dolaşımdaki nükleozomlar, kanseri saptamak ve tedaviye yanıtı izlemek için invazif olmayan bir yöntem olarak kullanılmakta ve hücre ölüm süreçlerine farklı bir bakış açısı getirmektedir.

Pankreas kanserinde hasta sınıflandırması ve etkin tedavi takibi için serum biyobelirteçlerine ihtiyaç vardır. İleriye dönük bir tanısal gözlem çalışması kapsamında, palyatif kemoterapi öncesi ve sırasında haftalık olarak pankreas kanserli 78 hastadan kan örnekleri alınmıştır. Dolaşımdaki nükleozomlar ve immünojenik hücre ölümü belirteçleri, bazı reseptörler ve DNaz aktivitesi ölçülmüş ve radyolojik evreleme sonuçlarıyla ilişkilendirilmiştir. Pankreas kanseri ilerleyen hastalarda nükleozom seviyeleri oldukça yüksek bulunmuştur. Prognoz tahmini ile ilgili olarak, yüksek nükleozom seviyeleri korelasyon göstermiştir. Özetle bu çalışmada, kemoterapinin pankreas kanseri hastalarında dolaşımdaki nükleozomların daha da artmasına neden olduğu anlaşılmıştır [96].

Bir başka çalışmada, meme kanseri hastalarında, dolaşımdaki nükleozom seviyeleri ile tümör progresyonu arasında benzer bir eğilim gözlenmiştir. Benign meme kanseri tespit edilen 20 hasta, primer meme kanseri tanısı konan 31 hasta (M0), metastatik meme kanseri tanısı konan 32 hasta (M1) ve 28 sağlıklı birey ile yapılan bu çalışmada ELISA yöntemi ile hücre ölüm belirteçleri tespit edilmiştir. Benign ve malign tümör tespit edilen hastaların kanlarında sağlıklı bireylere nazaran, önemli ölçüde yüksek

seviyelerde nükleik asit bulunmuştur. Tüm serum örnekleri üzerinde yapılan analizler, dolaşımdaki nükleozom ile DNA konsantrasyonları, kaspaz aktiviteleri ile nükleozom konsantrasyonları ve proteaz aktiviteleri ile kaspaz arasında anlamlı korelasyon ortaya koymuştur. Lenf nodu pozitif meme kanseri hastalarının kanlarında, nod negatif hastalara göre daha yüksek nükleozom seviyeleri belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları proteolitik aktivitelerin apoptozla ilişkili deregülasyonunda gözlenen değişikliklerin, yüksek serum nükleozom seviyeleri ve kandaki DNA ile birlikte meme kanserinin ilerlemesiyle bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur [89].

Dolaşımdaki nükleozomlar, sağlıklı deneklerden alınan numunelerde tanısal değerleri sınırlandırarak da gözlemlenebilir. DNA'nın nükleozomlara bağlanma etkinliğinin, DNA'nın epigenetik metilasyonu ve nükleozomun histon kuyruğunun translasyonel modifikasyonu ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu dikkate alınmalıdır. Bu tür DNA metilasyonları ve nükleozomların histon modifikasyonları kanser dokularında oldukça yaygındır [97]. DNA metilasyonu ve / veya histon modifikasyonları başta olmak üzere epigenetik yeniden programlama mekanizmaları, oluşan tümöre özgü gen ekspresyonunun tümör oluşumu ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynar. DNA metilasyon modelindeki değişikliklerin ve spesifik histon asetilasyon veya metilasyon belirteçlerinin kaybının, ilaç direnci, epitelyal-mezenkimal geçiş ve metastaz gibi kanserin birkaç ayırt edici özelliği ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca son zamanlarda epigenetik değişikliklerin kanser hücrelerinin düzenlenmesinde kritik rolü olduğu vurgulanmıştır. Kanser hastalarının metastatik tümör dokusu geliştirmesinden, kanser kök hücrelerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Epigenetik mekanizmanın düzensizliği, yeni terapötik hedeflere olan ihtiyacı arttırmaktadır. Bu nedenle, epigenetik aktiviteye sahip bileşikler, kansere karşı mücadelede yeni tedavi ajanları geliştirmek için çok önemli hale gelmiştir. RNA epigenetiğinin kanser tedavisindeki rolü, kanser tedavisi için yeni bir yol ve potansiyel hedef olarak literatüre girmiştir [98].

Sirküle eden nükleozomlardaki stabil yapı, histon modifikasyonlarında kansere özgü değişikliklerin saptanması için önemli bir değer olabilmektedir. Dolaşımda bulunan nükleik asitler, potansiyel invazif olmayan biyobelirteçler olarak kanserde sıvı biyopsi için kullanılır. İnsidans ve ölüm oranları bakımından önde gelen kanser türlerinden biri olan kolorektal kansere histon metilasyonu biyobelirteçleri bakımından odaklanan bir

çalışmada, H3K9me3 ve lizin H4K20me3 üzerinde trimetilasyonunun, dolaşımdaki nükleozomlarla ilişkisi incelenmiştir. Bu modifikasyonlara ek olarak, 63 kolorektal kanser hastasından ve 40 sağlıklı bireyden alınan plazma örneklerinde ELISA tabanlı metilasyon testleri yapılmış ve H3K27me3 değeri ölçülmüştür. Çalışmanın sonuçlarında, kolorektal kanser hastasında H3K27me3 ve H4K20me3 modifikasyon miktarlarının sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma, histon metilasyon belirteçleri ölçümü ve belirteç kombinasyonlarının ilave etkisi ile kolorektal kanser tespitinin potansiyelini ortaya koymaktadır [99].

Çeşitli hastalıklarda, dolaşımdaki nükleozomların hücre dışı DNA seviyesiyle ilişkili olduğu gözlenmiştir. Tümörden türetilen hücre dışı DNA, kanser araştırmalarında artan bir önem kazanmıştır. Çok sayıda çalışma, tümör kaynaklı hücre dışı DNA analizinin, çeşitli kanser türlerinin erken teşhisi, tümör ilerlemesini ve tedaviye yanıtı izlemek ve metastatik hastalığı erken tespit etmek için değerli bir araç olduğunu doğrulamaktadır [100]. İlginç bir şekilde, dolaşımdaki hücre dışı DNA, apoptotik tümör hücreleri tarafından kan dolaşımına salınan nükleozom korumalı DNA'dan oluşur. Tümörden türetilen hücre dışı DNA fragmanları, bir apoptotik hücreden enzimatik olarak işlendikten sonra 166 baz çifti uzunluğuna sahiptir. Bu baz çifti sayısı, bir nükleozom (~147 baz çifti) ve bir bağlantı parçası (~20 baz çifti) etrafına sarılmış DNA uzunluğuna karşılık gelir. Bu nedenle, tümöre özgü yüksek seviyelerde hücre dışı DNA, apoptotik tümör hücrelerinden yüksek nükleozom salımına işaret eder. Yapılan bir çalışmada, 166 baz çifti uzunluğunda mononükleozomal hücre dışı DNA'nın saptanmasının, dolaşımdaki nükleozomal proteinlerin ek kanıtı olmaksızın apoptoz için bir gösterge olarak kullanılabileceğini öne sürülmüştür [101].

1.2.1.1.4. Ekstraselüler veziküller

Apoptoz aynı zamanda kaspaz aracılı sub-membranöz aktin-miyozin hücre iskeleti yapılarının kasılması ile karakterizedir. Bu, genellikle "apoptotik kabarcıklar" olarak adlandırılan ve sonunda apoptotik hücre kaynaklı ekstraselüler veziküller olarak hücre kalıntısından salınan, hücre dışı çıkıntıların oluşumuyla sonuçlanır [102]. Kabarcıklanma adı verilen bu işlem, ölmekte olan hücrenin daha küçük parçalara bölünmesini kolaylaştırır. Ardından, komşu fagositler tarafından daha kolay temizlenebilir hale

gelir. Son bulgular, apoptotik hücre kaynaklı ekstraselüler veziküllerin apoptoza karşı immün yanıtı da modüle ettiğini düşündürmektedir. Apoptotik hücre kaynaklı ekstraselüler veziküllerin büyük kısmı, çoğu zaman tüm organelleri içeren, 1 ile 5 µm arasında bir çapa sahip büyük apoptotik gövdelerden oluşur. Apoptotik hücreler ayrıca 1µm'den daha küçük bir boyuta sahip apoptotik mikroveziküller salgılar [82, 102]. Normal sürecinde canlı hücrelerin de hücre dışı vezikülleri salgıladığı fikri, giderek artan bir şekilde kabul edilmektedir. Sağlıklı insanlarda dolaşımdaki hücre dışı veziküller genellikle 0,03-1 µm çapa sahiptir ve esas olarak trombositler, eritrositler, monositler, lökositler ve düz kas hücrelerinden türemektedir. Malignite durumunda, hücre dışı veziküller canlı kanser hücrelerinden de kaynaklanabilir. Hücreler arasındaki moleküler trafikte rol oynarlar ve bu nedenle fizyolojik fonksiyon üzerinde kritik bir etkiye sahiptirler. Kanser benzeri önemli hastalıklar için biyolojik belirteçler olarak kullanılmaktadırlar [102].

Sağlıklı hücrelerden alınan ekstraselüler veziküller, büyük apoptotik cisimciklerden belirgin şekilde daha küçük olmasına rağmen, apoptotik hücre kaynaklı ekstraselüler veziküller ile hala bir boyut çakışması vardır. Bu durum, ekstraselüler veziküller ve apoptotik mikroveziküller arasındaki farklılaşmayı daha da karmaşık hale getirmiştir. Yapılan bir çalışma, bortezomib bazlı kemoterapinin multipl miyelomlu hastaların dolaşımında üç gün içinde dolaşımdaki büyük ölü hücre gövdelerinde bir artışa neden olduğunu göstermiştir. Bu ölü hücre birikimi, monositlerin, apoptotik hücreleri fagositoz yapma kabiliyetinin bozulmasıyla açıklanmaktadır [103].

Dolaşımda bulunan kromatin içeren apoptotik materyalin, sistemik lupus eritematozuslu hastalarda antikromatin otoimmün yanıt için önemli bir itici güç olduğu ileri sürülmüştür. Bir diğer çalışmada araştırmacılar, sistemik lupus eritematozus hastalarının dolaşımdaki mikropartiküllerin kesin yapısını belirlemeyi ve mikropartiküllerin bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit ve sistemik skleroz hastalarının plazmasından ve sağlıklı deneklerden izole edilen mikropartiküller analiz edilmiştir. Mikropartiküllerin kandan türetilen dendritik hücreler ve nötrofiller üzerindeki etkileri, akış sitometrisi, enzime bağlı immünosorbent analizi ve immünofloresan mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Sistemik lupus eritematozus

hastalarında, sağlıklı deneklerde veya romatoid artrit ve sistemik skleroz hastalarında bulunmayan anneksin V ve apoptozla modifiye edilmiş kromatin içeren mikropartiküller saptanmıştır. Bu mikropartiküller çoğunlukla CD31 + / CD45- (endotelyal), kısmen CD45 + / CD66b + (granülosit) ve B ve T hücre belirteçleri için negatiftir. Sistemik lupus eritematozus hastalarının plazmasından izole edilen mikropartiküller, yüzey molekülleri CD40, CD80, CD83 ve CD86 ifadesini ve proinflamatuvar sitokin, interlökin-6, tümör nekroz faktörü tarafından üretilmesini arttırmıştır. Bu sonuçlar, apoptotik mikropartiküllerin SLE hastalarında otoimmün yanıtı yönlendirmedeki önemli rolünün altını çizmektedir [104].

Tümörler tarafından doku faktörü ifade edilmekte ve bu durum tümör büyümesine katkıda bulunmaktadır. Doku faktörü pozitif mikropartiküllerin salınımı, venöz tromboembolizme katkıda bulunur. Artmış mikropartikül ile ilintili doku faktörü aktivitesinin dört farklı kanser türünde venöz tromboembolizm veya mortalite öngörümünde kullanılabilişliğini anlayabilmek için yapılan bir çalışmaya, pankreas, mide, kolorektal ve beyin kanseri hastaları dahil edilmiştir. Bu hastalarda mikropartikül ile ilintili doku faktörü aktivitesi belirlenmiştir. Takip sırasında pankreas kanseri hastalarının %20'sinde, mide kanseri hastalarının %14'ünde, kolorektal kanseri hastalarının %10'unda ve son olarak beyin kanseri hastalarının %16'sında venöz tromboembolizm geliştiği tespit edilmiştir. Aynı gruplarda sırasıyla % 77, %70, %37 ve %56 oranında ölüm gerçekleşmiştir. Mikropartikül ile ilintili doku faktörü aktivite seviyeleri en yüksek pankreas kanseri hastalarında görülmüştür. Bu çalışmanın bulguları, mikropartikül ile ilintili doku faktörü aktivitesinin, agresif bir pankreas kanseri fenotipini yansıttığına işaret etmektedir [105].

Bir diğer çalışma prostat kanseri üzerine yoğunlaşmıştır. Prostat kanseri olan Afrikalı-Amerikalı erkeklerin tipik olarak diğer ırksal veya etnik gruplara mensup erkeklerden daha agresif tümörler geliştirdiği ve bu malignitenin orantısız bir şekilde yüksek ölüm oranına neden olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, prostat kanseri olan Afrikalı-Amerikalı ve Avrupalı Amerikalı erkekler arasında kandan türetilmiş ekzozomal veziküllerde, bilinen bir onkoprotein ailesi olan apoptoz protein inhibitörlerinin ekspresyonundaki farklılıklar değerlendirilmiştir. Kontrollere kıyasla prostat kanseri hastalarında, dolaşımdaki survivin seviyelerinde önemli bir artış tespit edildi ve bu artış

en yüksek Afrikalı-Amerikalı hastalarda gözlemlendi. Prostat kanseri olan Afrikalı-Amerikalı hastaların, Avrupalı-Amerikalı hastalara göre plazmalarında ve serumlarında daha yüksek miktarlarda ekzozomal vezikül olduğu görüldü. Ek olarak, prostat kanseri olan Afrikalı-Amerikalı hastalardan alınan ekzozomal veziküller, Avrupalı Amerikalı hastalardan alınan ekzozomal veziküllere kıyasla çok daha fazla apoptoz protein inhibitörü içermekteydi. Prostat kanseri olan Afrikalı Amerikalı hastalardan alınan ekzozomal veziküllerde artan apoptoz protein inhibitörlerinin ekspresyonu, dolayısıyla artan tümör saldırganlığının mortaliteyi etkilediği sonucuna varıldı. Bu bulgular ekzozomal veziküllerin, prostat kanserinin anlaşılmasında yeni biyobelirteç ve terapötik hedefler olarak kullanılmalarının etkili olabileceğini gösterdi [106].

Pıhtılaşmanın primer başlatıcısı olan doku faktörü, genellikle malignitede aşırı eksprese edilir. Bu nedenle hiper pıhtılaşma durumunun tahmin edilmesinde birincil adaydır. Bu potansiyel rolün daha fazla araştırılmasıyla özellikle yüksek insidans tromboembolik komplikasyonlara sahip kanser hastalarında, serbest dolaşımında doku faktörü ifade eden mikropartiküllerin sayısında artış tespit edilmiştir. Kanserde venöz tromboemboliz riskinin kemoterapi ile daha da arttığı bulunmuştur. Kemoterapi, kanser hücreleri apoptozunu ortaya çıkarırken, dolaşımdaki prokoagülan mikropartiküllerin salınmasında bir artışa neden olabileceği düşünülmüştür. Venöz tromboemboliz riskini öngörmeye artmış tümör doku faktörü ekspresyonu ve artmış dolaşımdaki doku faktörü-pozitif mikropartiküllerin potansiyel rolü oldukça büyüktür [107]

1.2.2. Sirküle nekroz belirteçleri

Primer veya birincil nekroz olarak da bilinen, kazara meydana gelen nekroz, modifiye edilmemiş hücre içi moleküllerin ani ve düzensiz bir şekilde salınmasına neden olur. Buna karşılık, düzenlenmiş hücre ölümünün her biçimi, seçilen moleküllerin karakteristik değişikliklerine yol açmaktadır. Ancak, çoğu molekül değişmeden kalır. Ölen hücre zamanında temizlenmezse, düzenlenen hücre ölümü süreci "sekonder nekroz" a kadar ilerler. Dolayısıyla hücre içi moleküler modifikasyon gerçekleşir [83]. Dolayısıyla, dolaşımda bulunan modifiye edilmemiş moleküller ya birincil nekrozdan ya da ikincil nekrozdan kaynaklanabilir. Bu nedenle, "nekroz" veya "doku hasarı"

biyobelirteçleri, hücre ölümünün ilk nedenine bakılmaksızın, yırtılmış bir plazma membranına sahip ve ölmekte olan tüm hücreleri içerir. Dolaşımdaki laktat dehidrojenaz (LDH) enzimatik aktivitesi, klasik bir biyobelirteçtir. Laktat dehidrojenaz, hemen hemen tüm hücrelerde ifade edilir. Periferik kandaki yüksek laktat dehidrojenaz aktivitesi, nekrozu ve doku hasarını belirtir. Karaciğer transaminazları, alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST), iyi yapılandırılmış dokuya özgü bu biyobelirteçlerin en önemli örneklerindendir [108].

İlaca bağlı karaciğer hasarı için günümüzde kullanılan alanin aminotransferazdan daha duyarlı, spesifik ve öngörücü biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, keratin-18 belirteçleri M65 / M30, microRNA-122, glutamat dehidrojenaz ve alfa-fetoprotein başta olmak üzere yeni ilaca bağlı karaciğer hasarı biyobelirteçleri test edilmiştir. Asetaminofen çalışmasında, serum M65 ve microRNA-122 seviyeleri, ALT'den daha erken bir noktada önemli ölçüde artış göstermiştir. Ayrıca, M65 ve microRNA-122'nin maksimum yükselmesi, ALT'daki artışın da üstüne çıkmıştır. Bu çalışmada analiz edilen tüm yeni biyobelirteçlerin 1 haftalık tedaviden sonra arttığı saptanmıştır. Dolayısıyla, M65 ve microRNA-122, duyarlılık ve özgüllük açısından ALT'den üstün ilaca bağlı karaciğer hasarı potansiyel biyobelirteçlerindendir [109].

Bir diğer çalışma, malign plevral mezotelyoma üzerine yoğunlaşmıştır. Malign plevral mezotelyoma geleneksel kemoterapi ve radyoterapiye sınırlı yanıt gösteren mezotelyal kökenli agresif bir malign tümördür. Bu nedenle, malign plevral mezotelyomayı erken teşhis etmek çok önemlidir. HMGB1 proteininin, pulmoner fibroz ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Malign plevral mezotelyoma, akciğer fibroblastlarına benzer mezenkimal hücrelerden kaynaklanan mezotelyal hücrelerin malign transformasyonunu içerir. Yapılan çalışmada, malign plevral mezotelyoma hastalarında serum HMGB1 seviyeleri araştırılmış ve bu grup, malign plevral mezotelyoma geliştirmeden asbeste maruz kalmış bir popülasyonun HMGB1 seviyeleri ile karşılaştırılmıştır. 4 malign plevral mezotelyoma hücre hattından 2'sinin HMGB1 konsantrasyonları, normal mezotelyal hücre hattı Met-5A'dan daha yüksek bulunmuştur. Malign plevral mezotelyoma tanısı konulan hastaların, asbeste maruz kalmış ancak malign plevral mezotelyoma geliştirmemiş popülasyona göre önemli

ölçüde daha yüksek serum HMGB1 seviyelerine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular, serum HMGB1 konsantrasyonunun malign plevral mezotelyoma için oldukça yararlı bir prognostik faktör olduğunu göstermektedir [110].

Nekrozun dolaşımdaki bir diğer belirteci de mikro RNA'lardır. MikroRNA (miRNA), transkripsiyon sonrası düzeyde gen ekspresyonunu düzenleyen 19-24 nükleotid uzunluğunda kodlamayan RNA molekülleridir. MikroRNA'lar çekirdekte üretilir, sitoplazmaya giderken işlenir ve sonunda bir argonaute (AGO) proteinine yüklenir. Oluşan miRNA-AGO kompleksleri, hedef mRNA'ların tamamlayıcı 3' translasyona uğramamış bölgelerine bağlanarak hedef stabilitesini ve translasyon etkinliğini azaltabilir. Şimdiye kadar yaklaşık 1900 farklı insan miRNA'sı tanımlanmıştır. Ekspresyonu dokuya özgüdür ve bu spesifte oldukça yüksektir. miRNA'ların dolaşımda bulunduğunun keşfedilmesinden sonra, bu alanda yapılan çalışmalar miRNA üzerinde yoğunlaştı ve miRNA'ların önemli bir belirteç olabileceği düşünüldü [111]. Hücre dışı miRNA'lar (ex-miRNA) vezikül içermeyen miRNA-AGO ribonükleoprotein partikülleridir (RNP). RNazlar tarafından hızla bozulan serbest RNA'ların aksine, RNP'ler insan plazmasında uzun süre stabil olarak kalmaktadır. Ex-miRNA'nın farklı hücreler arasında iletişime aracılık edebildiği gösterilmiştir. Örneğin, aktive edilmiş trombositler, endotelial hücreler tarafından alınan ve bu hücrelerin ICAM1 ekspresyonunu düzenleyen fonksiyonel ex-miRNA 223'ü serbest bırakır [112]. Dolaşımdaki serbest miRNA miktarı, hastalıkların gidişatı ve tedaviye verdiği yanıtı ön görme bakımından önemlidir. Yapılan bir çalışmada, serbest miRNA'nın biyobelirteç olma özelliğinden faydalanılmıştır. İlaça bağlı karaciğer hasarı, birçok ilacın sık görülen bir yan etkisidir, hasta sağlığı için büyük bir tehdit oluşturur ve sağlık harcamaları üzerinde muazzam bir ekonomik etkiye sahiptir. Vücudun en savunmasız organlarından biri olan karaciğerde ilaca bağlı hasarın erken belirtilerini tespit etmek için güvenilir ve öngörücü belirteçleri belirlemek için çok sayıda çalışma yapılmıştır, ancak bu çalışmalar yaklaşık 30 yıldır mevcut olan serum aminotransferaz belirteçlerinden daha ileri gidememiştir. Farede aşırı doz asetaminofen ile indüklenen karaciğer hasarı yapılmış bir çalışmada hem karaciğer dokularında, hem de plazmada mikroRNA seviyelerinde oldukça önemli farklılıklar gözlenmiştir. Asetaminofen doz aşımına uğramış hayvanlardan toplanan plazmada dolaşan bir dizi yüksek mikroRNA, karaciğerde yüksek oranda eksprese edilir. Mir-122 ve mir-192 gibi spesifik

mikroRNA türlerinin her ikisinin de karaciğer dokusunda arttığı ve plazma aminotransferaz seviyeleri ve karaciğer dejenerasyonunun histopatolojisine paralel olarak plazmada doza ve maruz kalma süresine bağlı değişiklikler sergilediği saptanmıştır. Bu bulgular, ilaca bağlı karaciğer hasarı için duyarlı ve bilgilendirici biyobelirteçler olarak dolaşımdaki spesifik mikroRNA'ları kullanma potansiyelini ortaya koymaktadır [113].

Hücre dışı miRNA seviyesini dokuya özgü ve hassas bir sitotoksikite markeri olarak kullanma durumu, diğer dokularda da denenmiştir. Sıçanlara tek seferlik yapılan nörotoksik trimetiltin uygulaması, dolaşımdaki mir-9 ve mir-384 seviyelerinde kritik bir artışı tetiklemiştir. Bu artış, nöronal hücre ölümü ile koreledir [114]. Benzer şekilde ex-miRNA, nekroza ve doku hasarına neden olan hastalıklarda da artar. Örneğin miyokardiyumda yüksek oranda eksprese edilen mir-21'in dolaşımdaki seviyelerinin aort darlığı hastalarında sol ventrikül fibrozunu yansıttığı bulunmuştur. 75 aort darlığı hastasından ve 32 cerrahi kontrolden alınan sol ventrikül biyopsilerinde, miR-21, miR-21-hedefleri ve ECM- ve TGF- β -sinyal elemanlarının miyokardiyal transkript seviyelerinin ölçüldüğü bu çalışmada, miR-21'in *in situ* hibridizasyonu miyokardiyal bölümlerde gerçekleştirilmiştir. Miyokardiyal ve plazma miR-21 seviyeleri aort darlığı hastalarında kontrollere kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar miR-21'in aort darlığı hastalarında aşırı basınç yüklenmesine yanıt olarak oluşan fibrotik sürecin bir düzenleyicisi olarak rolünü desteklemekte ve miyokardiyal fibroz için bir biyobelirteç olarak dolaşımdaki miR-21'in değerinin altını çizmektedir [115]. Pankreas beta hücrelerinin kaybı genellikle diyabet tip I ve II'nin gelişimi ile ilişkilidir. Bir diğer çalışmada, pankreas beta hücrelerinin bakımı ve rejenerasyonunu izlemenin yanı sıra, hastalığın gidişatını tespit etmek için biyobelirteç olarak adacık spesifik miRNA kullanma fikri hayata geçirilmiştir [116].

1.2.3. Sirküle nekroptoz belirteçleri

Son yıllarda, apoptoz ve nekroz gibi hücre ölüm süreçlerine bir yenisi daha eklenmiş ve çalışmalar bu alana da kaymıştır. Düzenlenmiş nekrozun en yoğun araştırılan alt gruplarından biri de, son yıllarda önemi artan nekroptozdur. Bu hücre ölümü süreci, hücre küçülmesi olmaksızın plazma membranının yırtılmasına yol açar. Membran parçalanması, MLKL psödokinazın fosforile edilmiş formu veya bu tür bazı kinazlarla

geçekleştirilir [117]. Nekrotozun indüksiyon aşaması sırasında MLKL, reseptörle etkileşen serin-treonin kinazlar 1 ve 3 (RIPK1 ve RIPK3) ile kompleks oluşturur. RIPK1, kaspaz-8 ile etkileşim yoluyla hem nekrotoz hem de apoptozun düzenlenmesinde rol oynar. Kaspaz-8 yolu engellenirse, RIPK1, RIPK3'e bağlı MLKL fosforilasyonunun bir düzenleyicisi olarak işlev görür [118]. Dolayısıyla, RIPK1, RIPK3 ve MLKL varlığı nekrotoz için gereklidir ve belirteç olarak kullanılabilir.

MLKL proteinini, son yıllarda kanser hücresi ölümünün önemli bir süreci olan ve tümör nekroz faktörünün neden olduğu nekrotozun önemli bir belirteci olarak tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar, kolon kanseri dokularında MLKL ekspresyonunu tespit etmeyi ve kolon kanseri hastalarını prognostik olarak değerlendirmeyi amaçlamıştır. Bu sebeple, kolon kanseri teşhisi konan 135 hastanın kolonlarında sağlıklı ve kanserli dokular toplanmış, MLKL ekspresyonu ile prognoz parametresi (rekürrenssiz sağkalım, genel sağkalım) arasındaki ilişki, analiz edilmiştir. Adjuvan kemoterapi alan 79 hastada, düşük MLKL ekspresyonu ve azalmış rekürrenssiz sağkalım tespit edilmiştir. Bu çalışma MLKL belirtecini, kolon kanseri hastalarına önemli prognostik bilgiler sağlayabileceğini göstermektedir [119]. Bir diğer çalışmada, over karsinomlarında MLKL ekspresyonu karakterize edilmiş ve over kanserli hastalarda MLKL'nin prognostik önemi değerlendirilmiştir. Over kanseri teşhisi konulan 153 hastadan doku örnekleri toplanmış ve MLKL ekspresyon seviyeleri saptanmıştır. Hastaların %49'unda yüksek MLKL ekspresyonu tespit edilmiş; düşük MLKL ekspresyonunun, azalmış rekürrenssiz sağkalım ve genel sağkalım ile korele olduğu anlaşılmıştır [120].

Benzer şekilde, farklı kanser tanıları konmuş 613 hastayla yapılan bir meta-analizde, MLKL'nin azalmış ekspresyon seviyesinin, düşük genel sağkalım ve rekürrenssiz sağkalım ile anlamlı bir ilişkili içinde olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, anti-tümör immün tepkisini arttırması beklenen nekroptotik hücre ölümünün pro enflamatuvar özelliğini desteklemektedir. Her ne kadar immünokimyasal olarak yapılan MLKL miktar tayini, nekroptotik hücre ölümünü kanıtlamak için yeterli olmasa da, kanserlerde prognostik olarak önemli bir biyobelirteç olma rolü üstlenmektedir [121]. Kanser hücresinden türetilen MLKL'nin fosforilasyon durumuna ilişkin gelecekteki çalışmalar, kanserdeki nekrotozun rolü hakkında daha fazla bilgi edinmeye yardımcı

olabilir.

Yapılan bir çalışmada RIPK1 belirteci amiyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalarındaki nekroptozu değerlendirebilmek için kullanılmıştır. Optineurin genindeki mutasyonların, hem ailesel hem de sporadik amiyotrofik lateral sklerozda (ALS) rol oynadığı bilinmektedir. Ancak, bu proteinin merkezi sinir sistemindeki rolü ve ALS patolojisine nasıl katkıda bulunabileceği belirsizdir. İlgili çalışmada, optineurinin, RIPK1-bağımlı sinyali aktif olarak baskıladığı bulunmuştur. OPTN kaybının, RIPK1, RIPK3 ve MLKL dahil olmak üzere merkezi sinir sistemindeki nekroptotik mekanizmaların devreye girmesiyle progresif demiyelinasyona ve aksonal dejenerasyona yol açtığı saptanmıştır. Ayrıca, RIPK1- ve RIPK3 aracılı aksonal patoloji, ALS hastalarından alınan patolojik numunelerde yaygın olarak gözlemlenmiştir. Bu nedenle, RIPK1'in ve RIPK3'ün, ilerleyen aksonal dejenerasyona aracılık etmede kritik bir rol oynadığını söylemek mümkündür. Ayrıca, RIPK1 kinazın inhibe edilmesi, ALS'nin ve aksonal dejenerasyon ile karakterize edilen diğer dejeneratif hastalıkların tedavisi için aksonal koruyucu strateji sağlayabilir [122].

Nekroptoz, hücre içi bileşenlerin salınmasına neden olan bir hücre ölüm sürecidir. Bu bilgiye dayanarak, son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, spesifik ELISA'lar kullanılarak, nekroptoz belirteci olduğu bilinen MLKL ve RIPK3'ün periferik kandaki konsantrasyonunu araştırmayı hedeflemiştir. Yoğun bakım ünitesinde yatan ve üç gün yoğun bakım ünitesinde tedavi gördükten sonra durumu kritik olan 136 hastada serum MLKL seviyeleri analiz edilmiş ve sonuçlar 36 sağlıklı birey ile karşılaştırılmıştır. Üç günlük yoğun bakım tedavisinden sonra ortalama serum MLKL seviyeleri, yoğun bakım ünitesine henüz kabul edildiklerindeki seviyelerine kıyasla önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Serum MLKL seviyeleri, yoğun bakım ünitesi tedavisi sırasında kısa süreli sağkalım için öngörücü olmasa da, üçüncü gündeki yüksek MLKL konsantrasyonları, hastaların yoğun bakım ünitesi sağkalımının negatif bir göstergesi durumundadır. Üç gün süren yoğun bakım ünitesi tedavisinden sonra yükselen MLKL seviyeleri, hastaların mortalitesini öngörmekte ve bu durum sürekli ve düzensiz hücre ölümünün, kritik hastalıkta olumsuz bir prognoz ile ilişkili olduğunu göstermektedir [123]. Ancak dolaşımda bulunan nekroptoz belirteçlerinin hastalık prognozu ile ilişkisini araştıran çalışmalar oldukça sınırlıdır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Hastalar

Çalışmamıza değişik kanserler nedeniyle Altınbaş Üniversitesi Bahçelievler Medikal Park Hastanesi ve Kemoterapi Onkoloji Merkezi'nde tedavi almakta olan ve araştırmaya katılmayı kabul eden 120 ileri evre kanser hastası dahil edilmiştir. Hastaların tümünde metastatik evre IV hastalık vardır. Metastatik kanseri olmayan, enflamatuvar bir hastalığı olan ya da terminal dönemde olan hastalar hariç tutulmuştur. Hastalardan aldıkları her kemoterapi öncesinde ve 24-48 saat sonrasında koldan venöz kan alınarak M30 (kaspazla kırılmış CK-18, ccCK18) ve M65 (total CK-18) antijen düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca hastaların kemoterapi seansları bittikten sonra radyolojik yanıt değerlendirmesi yapılmış ve hastalar yanıt verenler (tam veya kısmi yanıt) ve yanıt vermeyenler (stabil ya da progresif hastalık) olarak iki gruba ayrılarak analizler yapılmıştır. Çalışmanın protokolü İstinye Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Tarih: 27.01.2021, No:143) ve çalışma Helsinki deklarasyonuna uygun olarak yürütülmüştür. Hastalar çalışma öncesi bilgilendirilmiş onam vermiştir.

2.2. Kemoterapi protokolü

Çalışmamıza katılan hastaların almakta oldukları kemoterapi protokolleri hastanın kanser tipi, genel durumu ve geçmiş tedavi öyküsüne göre değişkenlik göstermekle beraber uluslararası kılavuzlarca uygun görülen tedavi protokolü uygulanmıştır.

Kanser tipine göre hastaların almış olduğu tedavi protokolleri aşağıda yer almaktadır:

Pankreas: “Gemsitabin+Oksaliplatin” veya “Folinik asit+Fluorourasil+İrinotekan+Oksaliplatin”

Meme: “Dosetaksel+Gemsitabin” veya “Karboplatin+Paklitaksel”

Akciğer: “Karboplatin+Paklitaksel” veya “Sisplatin+Dosetaksel” veya “Gemsitabin+Sisplatin”

Kolon: “Folinik asit+Fluorourasil+Oksaliplatin ± Bevacizumab” veya “Folinik asit+Fluorourasil+İrinotekan ± Bevacizumab” veya “Folinik asit+Fluorourasil+İrinotekan+Oksaliplatin ± Bevacizumab”

Mide: “Dosetaksel+Sisplatin+Fluorourasil” veya “Folinik asit+Fluorourasil+Oksaliplatin”

Over: “Paklitaksel+Karboplatin” veya “Topotekan” veya “Gemsitabin”

Prostat: “Dosetaksel”

Böbrek: “Tirozin Kinaz İnhibitörü+Gemsitabin”

Hepatosellüler Karsinom: “Doksorubisin+Tirozin Kinaz İnhibitörü”

Beyin: “Temozolomid+Irinotekan+Bevacizumab”

Lenfoma: “Siklofosfamid+Doksorubisin+Vinkristin+Prednizolon+Rituksimab”

Yumuşak Doku: “Doksorubisin+Ifosfamid” veya “Gemsitabin+Dosetaksel”

Baş-Boyun: “Dosetaksel+Sisplatin”

Özefagus: “Dosetaksel+Sisplatin+Fluorourasil”

Serviks: “Paklitaksel+Karboplatin”

Periton: “Paklitaksel+Karboplatin”

Rektum: “Folinik asit+Fluorourasil+Oksaliplatin”

Safra Yolu: “Dosetaksel+Sisplatin+Fluorourasil”

2.3. M30 ve M65 antijen düzeyi ölçümleri

Ölçümler için koldan 5 ml venöz kan alınmış, serumlar ayrılmış ve değerlendirmeye kadar -20°C’da saklanmıştır.

2.3.1. M30 ölçümleri

M30 ölçümleri için M30-Apoptosense® ELISA test kiti (Peviva, VLVbio AB, İsveç) kullanılmıştır. Bu test M30 antikoru sayesinde K18Asp396 neo-epitopunu içeren kaspaz ile kırılmış ve çözünür olan apoptoz ile ilişkili K18 (ccK18) fragmanlarını ölçmektedir. Kaspazlar apoptoz sırasında birçok hücrel proteinde kırılıma yol açmaktadır. Epitel hücrelerde, bu proteinlerden birisi intermedier filaman protein K18’dir. M30 antikoru K18’in kaspaz ile kırılımından sonra ortaya çıkan bir yeni epitopu tespit etmektedir. Bu test bir katı-faz sandviç enzim immünassay’dır. Standartlar, kontroller ve örnekler K18’e yönelik solid faz yakalama antikoru M5 ve K18Asp396 neo-epitopuna yönelik HRP (horseradish peroksidaz) ile konjuge M30 antikoru ile reaksiyona girerler. Bağlanmamış konjugat yıkama sırasında uzaklaştırılır ve TMB (3,3’,5,5’-tetrametil benzidin) substrat eklenir. Daha sonra renk oluşumu durdurulur ve absorbans ölçülür. Oluşan renk analiz

edilen maddenin konsantrasyonu ile doğrudan orantılıdır. Bilinen konsantrasyonlara ait standart absorbans eğrisi oluşturularak örneğin içerisindeki antijen düzeyi hesaplanır ve litrede ünite olarak ifade edilir ((U/L). Sonuçlar bilgisayar yardımı ile analiz edilir. Ölçüm aralığı 0-1000 U/L dir. Normal referans değeri medyan 94 U/L ve 95 persentil 251 U/L'dir.

2.3.2. M65 ölçümleri

M65 ölçümleri için M65[®] ELISA test kiti (Peviva, VLVbio AB, İsveç) kullanılmıştır. Bu test ölü hücrelerden (apoptotik ya da nekrotik) salınan toplam çözünür keratin 18 (K18) düzeylerini tespit etmektedir ve ekstraselüler K18 epitel hücre ölümü belirteci olarak kullanılabilir. Bu test bir katı-faz sandviç enzim immünassay'dir. Standartlar, kontroller ve örnekler K18'e yönelik solid faz yakalama antikoru M6 ve K18'in farklı bir epitopuna yönelik HRP (horseradish peroksidaz) ile konjuge M5 antikoru ile reaksiyona girerler. Bağlanmamış konjugat yıkama sırasında uzaklaştırılır ve TMB (3,3',5,5'-tetrametil benzidin) substrat eklenir. Daha sonra renk oluşumu durdurulur ve absorbans ölçülür. Oluşan renk analiz edilen maddenin konsantrasyonu ile doğrudan orantılıdır. Bilinen konsantrasyonlara ait standart absorbans eğrisi oluşturularak örneğin içerisindeki antijen düzeyi hesaplanır ve litrede ünite olarak ifade edilir (U/L). Sonuçlar bilgisayar yardımı ile analiz edilir. Ölçüm aralığı 0-2000 U/L dir. Normal referans değeri medyan 264 U/L ve 95 persentil 413 U/L'dir.

2.4. Yanıt değerlendirmesi

Tedavi yanıtı hastanın kemoterapi sikluslarının sonunda radyolojik olarak RECIST kriterlerine göre yapıldı. Çalışmaya başladıktan sonra tedavi yanıtı için yapılan ilk radyolojik değerlendirme analizlerde kullanıldı. Radyolojik yanıt PET-CT ile yapıldı, beyin metastazı varsa MRI da eklendi. Değerlendirme sonucu tam ya da kısmi yanıt veren hastalar 'Yanıt verenler' grubuna, stabil hastalık ya da progresif hastalık olanlar ise 'Yanıt vermeyenler' grubuna yerleştirildi.

2.5. İstatistiksel analiz

Verilerin değerlendirilmesinde Windows için IBM SPSS versiyon 21.0 kullanılmıştır. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir. Devamlı değişkenlerde normalliği test etmek için grafik yöntemler ve hipotez testleri (Shapiro-Wilk ya da Kolmogorov-Smirnov) kullanılmıştır. Grupların (yanıt verenler/vermeyenler) devamlı değişkenler açısından karşılaştırılmasında (yaş ve M30/M65 değişim değerleri) bağımsız örneklemeler için Student t testi ya da Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. İki'den fazla grubun karşılaştırılmasında (kanser grupları) gene normaliteye bakılarak Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Aynı kişiden yapılan farklı 2 ölçümü karşılaştırmak için eşleştirilmiş örneklemeler için student t testi ya da Wilcoxon işaretli sıra testi kullanılmıştır. Grupların kategorik değişkenler açısından karşılaştırılmasında Pearson Ki-kare testi ya da Fisher kesin testi kullanılmıştır. İki değer arasındaki korelasyon dağılımın durumuna göre Pearson ya da Spearman testi ile değerlendirilmiştir. Aynı hastadan yapılan ölçümlerin (kemoterapi sonrası M30 ve M65 değişimleri) zaman içerisindeki seyri açısından grupların karşılaştırılmasında tekrarlayan ölçümler için iki-yönlü ANOVA testi kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Demografik ve klinik özellikler

Tablo 2’de hastaların demografik özellikleri verilmiştir. Yanıt veren ve vermeyen hastalar arasında yaş ($p=0.875$) ve cinsiyet dağılımı ($p=0.359$) açısından anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 2. Hastaların demografik özelliklerine göre dağılımı

Özellik	Tüm hastalar (n=120)	Yanıt var (n=92)	Yanıt yok (n=28)	p
Yaş, yıl (Ort. SS)	57.9±11.5	58.0±11.0	57.6±13.2	0.875
Cinsiyet				
Kadın	51 (%42.5)	37 (%40.2)	14 (%50.0)	
Erkek	69 (%57.5)	55 (%59.8)	14 (%50.0)	0.359

Ort. Ortalama, SS, standart sapma

Tablo 3 ve 4’de tüm hastaların her bir kemoterapi seansı öncesi ve sonrası M30 ve M65 değerleri verilmiştir.

Tablo 3. Hastaların her bir kemoterapi seansı öncesi ve sonrası M30 değerleri

No	Yanıt	1. kemoterapi		2. kemoterapi		3. kemoterapi		4. kemoterapi		5. kemoterapi		6. kemoterapi	
		Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra
1	Var	162	134	103	99	114	99						
2	Var	68	101	95	128								
3	Var	160	158	126	164	124	147	161	163				
4	Var	161	207	211	165								

5	Var	74	88	69	89						
6	Var	155	133	367	444						
7	Var	158	147	160	150						
8	Yok	729	758	674	739						
9	Var	1444	1428	1354	1325	696	666	458	509		
10	Var	148	221	119	508						
11	Var	209	233	175	223	169	340	145	182		
12	Var	129	129	140	135	291	204				
13	Var	146	138								
14	Var	110	197								
15	Var	116	170	121	147						
16	Var	519	518								
17	Yok	119	126								
18	Var	123	127	129	166						
19	Var	656	623	228	172	180	162	227	222	186	160
20	Var	93	90								
21	Yok	172	150								
22	Var	129	175	131	222						
23	Var	166	199	129	129	94	84				
24	Yok	764	142	97	487						
25	Var	454	578								
26	Var	129	352	156	181						
27	Var	90	101	109	99						
28	Var	1673	1684	1551	1554	1550	1559				
29	Yok	424	390	351	290						
30	Var	60	67	71	77						
31	Yok	330	366								
32	Yok	324	614								
33	Var	152	142								
34	Var	128	166	174	150	141	141	518	142		
35	Yok	87	73	119	109	135	136	121	106		
36	Var	161	106	156	139						
37	Yok	310	418	343	293						
38	Var	95	99								
39	Var	157	94	224	318	159	164				
40	Var	69	70	102	131						
41	Var	144	164	239	156	171	190				
42	Var	379	566								

43	Var	137	391	98	484	131	281				
44	Var	74	77								
45	Var	532	633								
46	Var	129	90	93	98	138	129				
47	Yok	116	121								
48	Var	353	415	405	186						
49	Var	1458	560	148	488						
50	Yok	601	1205	1402	1490	687	775				
51	Var	144	182	180	169						
52	Var	168	249	160	143						
53	Var	123	121								
54	Var	151	122	211	154	275	208				
55	Var	164	208	165	305						
56	Var	152	137	158	122						
57	Var	357	286	287	282	365	360				
58	Var	143	146								
59	Var	437	390	247	287	302	403				
60	Var	171	345	478	396						
61	Var	238	241	351	364	397	309				
62	Var	176	198								
63	Yok	134	89								
64	Var	552	691	314	265	416	362				
65	Var	103	80	123	560	114	98				
66	Var	95	117	409	83	106	88				
67	Var	259	184	1223	547						
68	Var	123	151	160	195	385	256	189	170	163	224
69	Var	96	108							140	148
70	Var	186	244	323	310	643	435				
71	Yok	1582	1583								
72	Yok	147	243								
73	Var	97	253	179	239						
74	Yok	1564	1554	1556	1556						
75	Yok	461	464	321	575						
76	Yok	126	117								
77	Var	95	140	148	132	249	145				
78	Var	337	513								
79	Yok	71	87								
80	Yok	198	276	290	398						

81	Var	1527	1580	1243	2000								
82	Var	330	450	281	159	178	415						
83	Yok	138	169	223	99	136	196						
84	Yok	129	191										
85	Yok	140	249	188	244								
86	Var	73	94	130	111	126	158	163	161	116	147	129	167
87	Var	210	207	216	256								
88	Yok	100	111										
89	Var	162	149										
90	Var	82	55										
91	Yok	265	219										
92	Var	92	104	114	106	79	86						
93	Yok	200	179	83	172	352	391						
94	Var	105	129	238	138								
95	Yok	102	147	163	159								
96	Var	216	327	397	149	223	152						
97	Var	106	116										
98	Var	691	380	601	463								
99	Var	214	274	405	341	419	369	350	472				
100	Var	170	171	179	193	192	156						
101	Var	114	88										
102	Var	2000	2000										
103	Var	149	159	90	137								
104	Yok	96	105										
105	Var	172	117										
106	Var	107	173	104	155								
107	Var	108	105										
108	Var	81	133										
109	Var	697	731	420	668								
110	Var	81	74										
111	Var	433	542	479	438								
112	Var	595	231	238	227								
113	Var	96	122	152	627								
114	Yok	131	97	89	98								
115	Var	146	148	165	100								
116	Var	196	253	511	338								
117	Var	110	126	137	122								
118	Var	271	262										

119	Var	83	101	128	181				
120	Var	168	106	187	279				

Tablo 4. Hastaların her bir kemoterapi seansı öncesi ve sonrası M65 değerleri

No	Yanıt	1. kemoterapi		2. kemoterapi		3. kemoterapi		4. kemoterapi		5. kemoterapi		6. kemoterapi	
		Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra
1	Var	482	452	161	202	174	171						
2	Var	323	502	325	581								
3	Var	400	585	172	295	510	1319	72	613				
4	Var	190	255	411	468								
5	Var	322	258	28	79								
6	Var	327	306	432	592								
7	Var	461	207	215	283								
8	Yok	1801	1913	1539	1754								
9	Var	1775	1708	1763	1673	1202	1137	825	861				
10	Var	581	532	487	791								
11	Var	492	578	461	322	272	583	237	328				
12	Var	297	300	244	60	429	359						
13	Var	113	503										
14	Var	562	406										
15	Var	160	317	65	70								
16	Var	689	1031										
17	Yok	32	412										
18	Var	205	250	214	414								
19	Var	2048	1920	989	752	537	501	628	478	518	447		
20	Var	234	142										
21	Yok	401	480										
22	Var	565	649	381	1123								
23	Var	268	343	230	213	61	33						
24	Yok	677	248	405	170								
25	Var	600	932										
26	Var	248	533	470	323								
27	Var	282	302	215	278								

28	Var	2467	2322	2332	2640	1582	2048				
29	Yok	616	605	684	635						
30	Var	226	219	116	97						
31	Yok	680	540								
32	Yok	997	1561								
33	Var	368	106								
34	Var	243	261	213	184	232	578	2237	198		
35	Yok	275	321	197	182	467	42	274	1367		
36	Var	461	203	109	391						
37	Yok	528	815	512	529						
38	Var	151	286								
39	Var	508	403	438	574	423	433				
40	Var	444	225	237	333						
41	Var	444	359	690	412	221	229				
42	Var	590	641								
43	Var	239	637	187	124	239	500				
44	Var	298	218								
45	Var	1052	2285								
46	Var	281	157	150	207	53	41				
47	Yok	224	278								
48	Var	363	580	502	418						
49	Var	1961	837	405	633						
50	Yok	1611	2284	2328	2494	1224	1330				
51	Var	133	469	247	394						
52	Var	355	419	274	168						
53	Var	117	401								
54	Var	379	351	264	299	433	412				
55	Var	308	396	358	549						
56	Var	1026	1079	217	198						
57	Var	479	293	275	206	469	276				
58	Var	493	478								
59	Var	819	795	678	488	505	592				
60	Var	532	697	924	647						
61	Var	279	315	523	493	463	583				
62	Var	326	326								
63	Yok	282	180								
64	Var	934	1391	548	567	826	714				
65	Var	165	439	39	74	190	161				

66	Var	215	640	596	170	258	399						
67	Var	616	539	1198	704								
68	Var	490	428	790	568	526	409	246	272	103	388	59	265
69	Var	343	312										
70	Var	598	535	532	502	913	634						
71	Yok	3460	3152										
72	Yok	441	621										
73	Var	365	660	599	334								
74	Yok	3025	3025	3026	3026								
75	Yok	1136	985	599	1152								
76	Yok	245	222										
77	Var	350	447	281	236	247	248						
78	Var	544	887										
79	Yok	351	476										
80	Yok	951	876	694	790								
81	Var	1792	2984	1405	3106								
82	Var	830	1377	457	405	384	1839						
83	Yok	231	280	60	84	45	301						
84	Yok	477	573										
85	Yok	412	508	471	563								
86	Var	166	212	279	304	250	529	198	213	185	48	440	238
87	Var	615	505	797	665								
88	Yok	190	350										
89	Var	410	420										
90	Var	138	47										
91	Yok	356	337										
92	Var	177	356	294	235	143	550						
93	Yok	462	540	155	435	548	642						
94	Var	134	212	55	71								
95	Yok	271	393	401	446								
96	Var	871	851	413	278	311	227						
97	Var	213	187										
98	Var	1233	588	866	592								
99	Var	585	704	670	840	518	546	506	563				
100	Var	428	510	307	298	411	308						
101	Var	198	186										
102	Var	3282	3225										
103	Var	241	457	192	192								

104	Yok	71	463					
105	Var	427	201					
106	Var	366	450	169	278			
107	Var	463	409					
108	Var	489	522					
109	Var	2720	2541	874	1725			
110	Var	228	233					
111	Var	757	899	750	626			
112	Var	954	471	314	374			
113	Var	404	474	138	64			
114	Yok	300	362	152	158			
115	Var	164	158	191	143			
116	Var	1163	1599	789	641			
117	Var	325	411	313	212			
118	Var	248	279					
119	Var	244	252	298	609			
120	Var	673	314	257	1339			

Tablo 5 hastaların kanser tipine göre dağılımını ve başlangıç M30 ve M65 değerlerini göstermektedir. En sık kanser tipi pankreas kanseridir (%27.5), bunu sıklık sırasına göre meme (%12.5), akciğer (%10.0), kolon (%9.2) ve mide kanseri (%9.2) takip etmektedir. Kanser tiplerinin dağılımı açısından tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastalar arasında anlamlı farklılık yoktur ($p=0.432$). Tüm hastalar esas alındığında, başlangıç M30 değerleri ve M65 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0.001$), başlangıç M65 değerleri başlangıç M30 değerlerinden anlamlı düzeyde yüksektir.

Tablo 5. Hastaların kanser tipine göre dağılımı ve başlangıç M30 ve M65 değerleri

Kanser tipi	Tüm hastalar (n=120)	Yanıt var (n=92)	Yanıt yok (n=28)	Başlangıç M30 değeri	Başlangıç M65 değeri
Pankreas	33 (%27.5)	26 (%28.3)	7 (%25.0)	267.9±292.8	560.3±557.0
Meme	15 (%12.5)	12 (%13.0)	3 (%10.7)	240.7±372.1	439.5±414.7
Akciğer	12 (%10.0)	7 (%7.6)	5 (%17.9)	173.9±108.3	440.6±242.4

Kolon	11 (%9.2)	8 (%8.7)	3 (%10.7)	587.6±621.4	1326.9±1121.8
Mide	11 (%9.2)	9 (%9.8)	2 (%7.1)	346.6±411.9	704.5±549.9
Over	6 (%5.0)	5 (%5.4)	1 (%3.6)	120.6±21.8	243.9±128.0
Prostat	5 (%4.2)	5 (%5.4)	0 (%0.0)	112.5±38.3	264.5±168.0
Böbrek	5 (%4.2)	4 (%4.3)	1 (%3.6)	483.1±551.3	834.3±669.3
Hepatosellüler Karsinom	4 (%3.3)	3 (%3.3)	1 (%3.6)	700.5±692.6	1661.9±1102.7
Beyin	3 (%2.5)	1 (%1.1)	2 (%7.1)	184.0±126.4	292.4±342.3
Lenfoma	3 (%2.5)	1 (%1.1)	2 (%7.1)	131.2±2.9	275.1±29.2
Yumuşak Doku	3 (%2.5)	3 (%3.3)	0 (%0.0)	131.1±33.6	412.0±153.9
Baş-Boyun	2 (%1.7)	2 (%2.2)	0 (%0.0)	93.2±1.9	195.9±26.9
Özefagus	2 (%1.7)	2 (%2.2)	0 (%0.0)	153.1±12.9	462.9±27.4
Serviks	2 (%1.7)	2 (%2.2)	0 (%0.0)	281.7±100.9	488.5±178.2
Periton	1 (%0.8)	1 (%1.1)	0 (%0.0)	166.1±*	267.6±*
Rektum	1 (%0.8)	0 (%0.0)	1 (%3.6)	764.2±*	676.9±*
Safra Yolu	1 (%0.8)	1 (%1.1)	0 (%0.0)	171.5±*	532.5±*
Tüm kanserler	120 (%100.0)	92 (%100)	28 (%100.0)	290.1±367.2	608.6±638.6

*Tek vaka olduğundan standart sapma hesaplanamamıştır.

Tablo 6’da çalışmamızda sık olan kanser tiplerinde başlangıç M30 ve M65 değerlerinin karşılaştırılması görülmektedir. Gruplar arasında hem başlangıç M30 hem de başlangıç M65 değerleri arasından anlamlı farklılık vardır. Farkın nereden kaynaklandığını tespit etmek için yapılan ikili karşılaştırmalarda başlangıç M30 değerleri için meme kanseri ile gastrointestinal sistem kanserleri arasında ($p=0.010$) ve akciğer kanseri ile gastrointestinal kanserler arasında ($p=0.038$) anlamlı fark vardır ve iki durumda da gastrointestinal sistem kanserlerinin başlangıç M30 değerleri daha yüksektir. Başlangıç M65 değerleri için meme kanseri ile gastrointestinal sistem kanserleri arasında ($p=0.003$), akciğer kanseri ile gastrointestinal kanserler arasında (0.023) ve pankreas kanseri ile gastrointestinal kanserler arasında (0.015) anlamlı fark vardır ve üç durumda da gastrointestinal sistem kanserlerinin başlangıç M65 değerleri daha yüksektir.

Tablo 6. Çalışmamızda sık olan kanser tiplerinde başlangıç M30 ve M65 değerleri

Kanser tipi/grubu	Başlangıç M30 değerleri	Başlangıç M65 değerleri
Pankreas	267.9±292.8	560.3±557.0
Akciğer	173.9±108.3	440.6±242.4
Meme	240.7±372.1	439.5±414.7
Gastrointestinal*	453.8±506.6	957.9±875.2
<i>p</i> değeri**	0.042	0.010

*Mide, kolon, özofagus ve rektum kanserleri gastrointestinal sistem kanserleri olarak gruplanmıştır.

**Gruplar arası farkın Kruskal-Wallis testine göre *p* değeri.

Tablo 7’de, yanıt değerlendirmesi yapılmadan önce hastaların aldıkları toplam kemoterapi seansı sayısına göre dağılımı görülmektedir. Dört veya daha fazla seans kemoterapi az sayıda hasta tarafından alınmıştır (n=9, %7.5). Alınan kemoterapi seansı dağılımı açısından tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastalar arasında anlamlı fark yoktur (p=0.283).

Tablo 7. Hastaların aldıkları kemoterapi seansı sayısına göre dağılımı

Kemoterapi seansı sayısı	Tüm hastalar (n=120)	Yanıt var (n=92)	Yanıt yok (n=28)
1 seans kemoterapi	39 (%32.5)	25 (%27.2)	14 (%50.0)
2 seans kemoterapi	48 (%40.0)	38 (%41.3)	10 (%35.7)
3 seans kemoterapi	24 (%20.0)	21 (%22.8)	3 (%10.7)
4 seans kemoterapi	6 (%5.0)	5 (%5.4)	1 (%3.6)
5 seans kemoterapi	1 (%0.8)	1 (%1.1)	0 (%0.0)
6 seans kemoterapi	2 (%1.7)	2 (%2.2)	0 (%0.0)

Tablo 8’de yanıt veren (n=92) ve yanıt vermeyen (n=28) hastaların yanıt alt tipi açısından dağılımı görülmektedir. Yanıt verenlerin üçte biri tam yanıt verirken üçte ikisi kısmi yanıt vermiştir. Yanıt vermeyenlerin hepsinde progresif hastalık görülmüştür.

Tablo 8. Yanıt* göre hasta gruplarının yanıt alt tipine göre dağılımı

Yanıt alt tipi	Tüm hastalar (n=120)	Yanıt var (n=92)	Yanıt yok (n=28)
Tam yanıt	31 (25.8%)	31 (%33.7)	0 (%0.0)
Kısmi yanıt	61 (%50.8)	61 (%66.3)	0 (%0.0)
Stabil hastalık	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)
Progresyon	28 (%23.3)	0 (%0.0)	28 (%100.0)

*Çalışmada tanım olarak yanıt olması tam yanıt ya da kısmi yanıt olarak, yanıt olmaması ise stabil ya da progresyon olarak tanımlanmıştır.

3.2. M30 ve M65 belirteçlerinin değişimi

Başlangıçtaki (ilk kemoterapi öncesi) M30 değerleri açısından yanıt verenler (274.5 ± 358.7 U/L) ve vermeyenler (341.5 ± 396.3 U/L) arasında istatistiksel fark yoktur ($p=0.318$). Başlangıçtaki (ilk kemoterapi öncesi) M65 değerleri açısından yanıt verenler (570.9 ± 569.5 U/L) ve vermeyenler (732.3 ± 826.8 U/L) arasında istatistiksel fark yoktur ($p=0.507$).

Yapılan tekrarlayan ölçümler için iki-yönlü ANOVA testinde tedaviye yanıt veren hastalar ile yanıt vermeyen hastalar arasında kemoterapiye yanıt olarak M30 değişiminin zaman içerisindeki seyri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.342$). Yapılan tekrarlayan ölçümler için iki yönlü ANOVA testinde tedaviye yanıt veren hastalar ile yanıt vermeyen hastalar arasında kemoterapiye yanıt olarak M65 değişiminin zaman içerisindeki seyri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.169$).

Tablo 9 ve 10’da M30 ve M65 değerlerinde kemoterapi öncesi ve sonrası gözlenen değişim açısından, aldıkları kemoterapi sayısına göre, yanıt veren ve vermeyen hastalar karşılaştırılmıştır. Burada belirtecin son değeri son alınan kemoterapi seansı sonrasındaki değer olarak alınmıştır. İlk değerlerin hepsi ise ilk kemoterapiden önceki değerlerdir. Bu şekilde değerlendirme yapıldığında, M30 değerlerindeki değişim açısından, sadece 3 kemoterapi seansı alanlarda, yanıt vermeyenlerin M30 değişimi yanıt verenlerden yüksek bulunmuştur (artış yönünde) ($p=0.029$) (Tablo 9). Bunun dışındaki alt gruplarda yanıt verenler ve vermeyenler arasında M30 değişimi açısından fark yoktur. M65 değişimi açısından ise (Tablo 10) hiçbir kemoterapi sayısı alt grubunda yanıt verenler ve vermeyenler arasında anlamlı fark yoktur ($p>0.05$).

Tablo 9. Hastaların aldığı kemoterapi sayısına göre M30 değerinde kemoterapi öncesi ve sonrası gözlenen değişim açısından grupların karşılaştırılması

	M30 Değişim		
	Yanıt var (n=92)	Yanıt yok (n=28)	p
Sadece 1 kemoterapi alanlar (n=39)	24.5±62.0 (n=25)	29.5±84.2 (n=14)	0.836
Sadece 2 kemoterapi alanlar (n=48)	38.1±236 (n=38)	1.8±134.7 (n=10)	0.645
Sadece 3 kemoterapi alanlar (n=24)	10.0±92.7 (n=21)	141.2±72.1 (n=3)	0.029
Sadece ≥4 kemoterapi alanlar (n=9)	-132.7±388 (n=8)	18.9± -* (n=1)	0,724

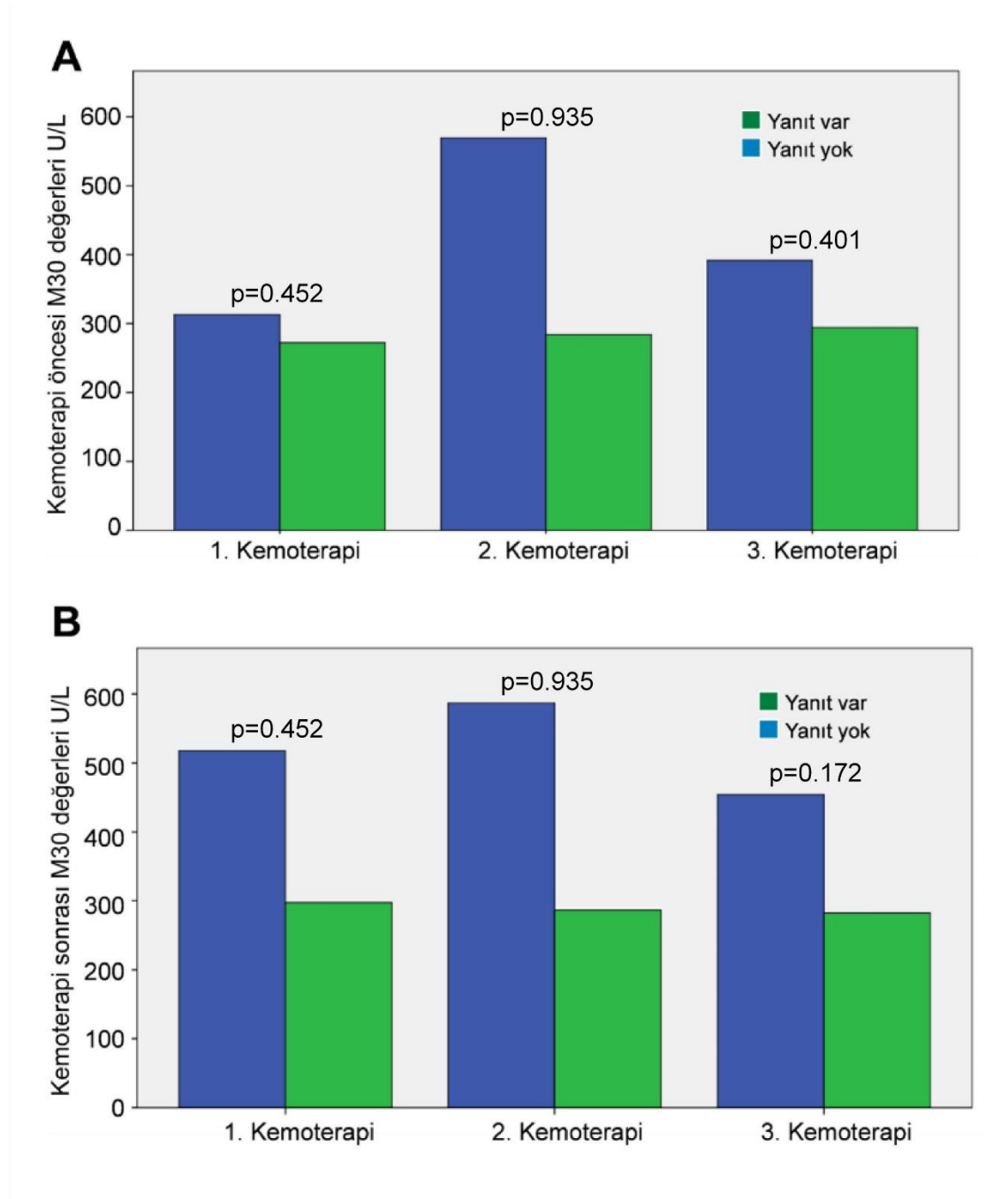
Değişim hesaplanırken ilk değerlerin hepsi ilk kemoterapiden önceki değerlerdir. Son değer ise sadece 1 kemoterapi alanlar için birinci kemoterapi sonrası, sadece 2 kemoterapi alanlar için ikinci kemoterapi sonrası, sadece 3 kemoterapi alanlar için üçüncü kemoterapi sonrası, sadece ≥4 kemoterapi alanlar için son kemoterapi sonrası değerdir. *Sadece tek hasta olduğundan standart sapma hesaplanamamıştır.

Tablo 10. Hastaların aldığı kemoterapi sayısına göre M65 değerinde kemoterapi öncesi ve sonrası gözlenen değişim açısından grupların karşılaştırılması

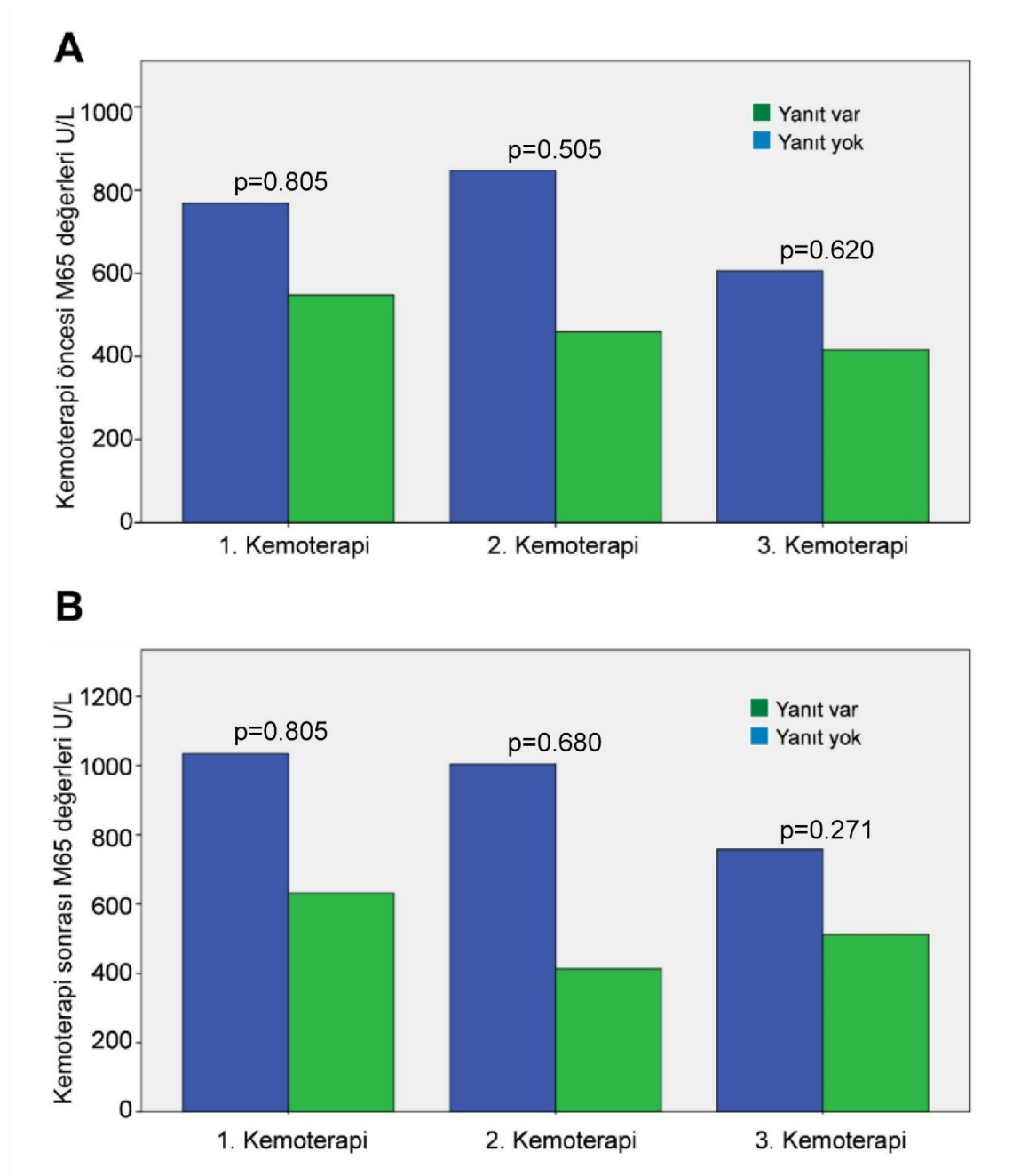
	M65 Değişim		
	Yanıt var (n=92)	Yanıt yok (n=28)	p
Sadece 1 kemoterapi alanlar (n=39)	83.4±297.2 (n=25)	102.6±229.7 (n=14)	0.836
Sadece 2 kemoterapi alanlar (n=48)	-45.6±458.7 (n=38)	-49.4±192.9 (n=10)	0.979
Sadece 3 kemoterapi alanlar (n=24)	-35.8±34.3 (n=21)	-10.5±240.8 (n=3)	0.904
Sadece ≥4 kemoterapi alanlar (n=9)	-335.6±612.9 (n=8)	1092.3± -* (n=1)	0.064

Değişim hesaplanırken ilk değerlerin hepsi ilk kemoterapiden önceki değerlerdir. Son değer ise sadece 1 kemoterapi alanlar için birinci kemoterapi sonrası, sadece 2 kemoterapi alanlar için ikinci kemoterapi sonrası, sadece 3 kemoterapi alanlar için üçüncü kemoterapi sonrası, sadece ≥4 kemoterapi alanlar için son kemoterapi sonrası değerdir. *Sadece tek hasta olduğundan standart sapma hesaplanamamıştır.

Şekil 5. Sadece 3 kemoterapi alan hastalarda kemoterapi öncesi ve sonrası M30 değerlerinin dağılımı



Şekil 6. Sadece 3 kemoterapi alan hastalarda kemoterapi öncesi ve sonrası M65 değerlerinin dağılımı



Sadece 3 kemoterapi alan hastalarda Şekil 5 ve 6’da görüldüğü gibi kemoterapi öncesi ve sonrası M30 ve M65 değerleri açısından yanıt veren ve vermeyen hastalar karşılaştırılmıştır, ancak hiçbir karşılaştırmada anlamlı fark bulunmamıştır.

Sadece 3 kemoterapi alan hastalarda (n=24), kemoterapi öncesi ve sonrası M30 ve M65 değerlerinin değişimi incelenmiş, her bir kemoterapi seansının öncesi ve sonrası arasındaki farkların anlamlılığı değerlendirilmiştir. M30 değerlerinde birinci kemoterapi sonrası değişim (pre-: 277.4±328.6, post: 325.1±379.8, p=0.199), ikinci kemoterapi sonrası değişim (pre-: 319.7±370.1, post: 324.2±389.2, p=0.689) ve üçüncü kemoterapi sonrası değişim (pre-: 306.6±310.0, post: 303.8±312.2, p=0.881) anlamlı olarak farklı bulunmamıştır. Benzer şekilde M65 değerlerinde birinci kemoterapi sonrası değişim (pre-: 575.5±518.8, post: 682.4±586.3, p=0.130), ikinci kemoterapi sonrası değişim (pre-: 507.5±590.7, post: 487.2±659.3, p=0.538) ve üçüncü kemoterapi sonrası değişim (pre-: 439.7±370.7, post: 542.9±509.3, p=0.304) anlamlı olarak farklı bulunmamıştır. Ancak, Tablo 9’da da gösterildiği üzere 3. kemoterapi sonrası M30 değerleri ile 1. kemoterapi öncesi M30 değerleri arasında bu hasta alt grubunda anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p=0.029).

Sadece 3 kemoterapi almış olan hasta grubunda (n=24) M30 ve M65 değerleri ile yanıt (1: progresyon, 2: kısmi yanıt, 3: tam yanıt şeklinde puanlandırma yapılmıştır) arasındaki korelasyon aşağıdaki gibidir:

Yanıt puanı ile birinci kemoterapi öncesi (r=-0.116, p=0.589), birinci kemoterapi sonrası (r=-0.116, p=0.589), ikinci kemoterapi öncesi (r=-0.024, p=0.913), ikinci kemoterapi sonrası (r=-0.101, p=0.640), üçüncü kemoterapi öncesi (r=-0.135, p=0.530) ve üçüncü kemoterapi sonrası (r=-0.247, p=0.244) M30 değerleri arasında anlamlı korelasyon bulunamamıştır. Aynı şekilde, birinci kemoterapi öncesi (r=-0.066, p=0.761), birinci kemoterapi sonrası (r=-0.097, p=0.653), ikinci kemoterapi öncesi (r=0.201, p=0.347), ikinci kemoterapi sonrası (r=0.114, p=0.594), üçüncü kemoterapi öncesi (r=-0.070, p=0.745) ve üçüncü kemoterapi sonrası (r=-0.129, p=0.549) M65 değerleri arasında anlamlı korelasyon bulunamamıştır.

3.3. Birleştirilmiş verilerin değerlendirilmesi

Her bir kemoterapi seansı esas olarak yapılan incelemede her bir kemoterapi seansının sonrasındaki M30 ve M65 değerleri hesaplanmış, ilgili hastanın nihai yanıt durumu her bir kemoterapi seansının da sonucu olarak kullanılmıştır. Bu şekilde toplam 248 kemoterapi seansına ait M30 ve M65 değişim değerleri elde edilmiştir. Bunlardan 201'inde (81.0%) ilgili hasta sonuç olarak tedaviye yanıt vermiş, 47'si (19.0%) ise vermemiştir. M30 ve M65 değişim değerleri açısından yanıt verenler ve yanıt vermeyenler arasında istatistiksel olarak fark yoktur ($p>0.05$). Karşılaştırmalar Tablo 11'de gösterilmektedir. Ayrıca her bir kemoterapi seansı esas alındığında M30 değerleri kemoterapi sonrasında kemoterapi öncesine göre anlamlı olarak artmıştır (tedavi öncesi 291.2 ± 335.8 U/L'den tedavi sonrası 305.9 ± 341.2 U/L'ye, $p=0.007$). Benzer şekilde M65 değerleri de kemoterapi sonrasında kemoterapi öncesine göre anlamlı olarak artmıştır (tedavi öncesi 551.0 ± 567.0 U/L'den tedavi sonrası 610.4 ± 614.0 U/L'ye, $p=0.004$). Ancak, Tablo'da da görüldüğü gibi, bu artışlar ile tedavi yanıtı arasında ilişki yoktur.

Tablo 11. Kemoterapi seanslarının esas alındığı birleştirilmiş verilere göre M30 ve M65 değerlerindeki değişim açısından grupların karşılaştırılması

	Yanıt var (n=201)	Yanıt yok (n=47)	p
M30 değişimi	9.7 $\pm$ 144.1	35.5 $\pm$ 156.1	0.156
M65 değişimi	50.3 $\pm$ 337.7	98.1 $\pm$ 262.7	0.061

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda değişik kanserlere sahip evre IV hastaların kemoterapi öncesi ve sonrası M30 ve M65 düzeylerindeki değişiklik ile kemoterapiye verilen yanıt arasında ilişki olup olmadığı araştırılmış, bu hasta grubunda bu biyobelirteçlerdeki değişim ile radyolojik tedavi yanıtı arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Ancak Tablo 9’da da görüldüğü gibi sadece üç kemoterapi alanlarda tedavi öncesi ve son kemoterapi sonrası arasında M30 değerlerinde yanıt vermeyenlerde daha yüksek olmak şeklinde anlamlı artış olmuştur. Aynı tabloda sadece 4 veya fazla kemoterapi alanlarda yanıt olan ve olmayan hasta sonuçları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamasına rağmen sadece 3 kemoterapi alanlarla benzer şekilde yanıt vermeyenin değeri daha yüksek olmak şeklinde sayısal fark gözlenmektedir. Bu da eğer hasta sayısı bu grupta daha yüksek olsaydı istatistiksel anlamlılığa ulaşılabilceğini düşündürmektedir. Benzer durum Tablo 10’daki 4 veya daha fazla kemoterapi alanlardaki M65 değişimleri için de geçerlidir. Yanıt olmayan daha yüksek olmak şeklinde sayısal büyük fark olmasına rağmen istatistiksel anlamlılığa burada da muhtemelen hasta sayısı azlığından ulaşılamamıştır. Ayrıca her bir kemoterapi seansı esas alındığında, hem M30 değerleri hem de M65 değerleri, kemoterapi öncesi ile karşılaştırıldığında, kemoterapi sonrasında anlamlı olarak artmıştır ancak bu artışlar ile tedavi yanıtı arasında ilişki görülmemiştir. Çalışmamız tamamen metastatik ileri evre kanseri olan bir grupta M30 ve M65 biyobelirteçlerindeki değişim ile radyolojik tedavi yanıtı arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk çalışmadır ve şüana kadar M30 ve M65 biyobelirteçlerinin araştırıldığı tüm çalışmalar arasında en yüksek hasta sayısı olan çalışmadır.

Bugüne kadar değişik çalışmalarda M30 ve M65 biyobelirteçleri malignansi hastalarında hücre ölümü süreçlerinin göstergesi olarak, özellikle de kemoterapi ile ilişkili olarak araştırılmıştır. Asp396 lokasyonunda bölünen ve M30 antikoru ile karsinomali hastaların dolaşımında tespit edilen M30 antijeni, bu hastalarda apoptoz ile ilgili kritik bilgiler vermektedir. Bir çalışmaya, malign akciğer kanseri bulunan 60 hasta, benign akciğer hastalığı bulunan 22 hasta ve sağlıklı 32 birey katılmış ve katılımcıların apoptoz seviyelerinin tespiti için M30 değerleri ölçülmüştür. Bazal M30 antijen seviyeleri, hayatta kalma sürelerini tahmin etme bakımından değerlendirilmiştir. Bazal M30 antijen seviyeleri yüksek olan hastaların, daha düşük

bazal M30 antijen seviyesine sahip hastalara göre anlamlı olarak daha kısa sağ kalıma sahip olduğu belirlenmiştir [7]. Akciğer kanseri hastalarında sitotoksik tedavinin serum M30 antijenini artırıp artırmadığını belirlemek için, kemoterapiden önce ve kemoterapiden 24 saat ve 48 saat sonra 18 akciğer kanseri hastasında M30 antijen düzeyleri izlenmiştir. 48. saatte M30 antijen seviyelerinde yaklaşık dört kat artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar, serum M30 antijeninin akciğer kanseri hastalarında kemoterapinin etkinliğinin izlenmesi için ilk kez yeni bir biyolojik belirteç olarak kullanılabileceğini göstermesi bakımından hayati önem taşımaktadır. Buna ek olarak, M30 seviyesinin sağ kalımı tahmin etmeye yardımcı olacağı düşünülmektedir. Yüksek seviyelerde M30 antijeni olan hastalar daha kısa hayatta kalma durumu sergilemektedir [7].

Mevcut literatürde, kanser hastalarında kemoterapi sonrası artan apoptoz seviyesini araştıran çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmaların en önemlilerinden biri, Ulukaya ve ark. tarafından yapılan ve apoptozun spesifik bir belirteci olan kaspazla bölünmüş sitokeratin 18'in (M30-antijen) ELISA ile tespitinin hedef alındığı çalışmadır. Metastatik olmayan ve metastatik malign meme kanserli 37 hasta, benign meme kanserli 35 hasta ve 34 sağlıklı birey ile yapılan bu çalışmada, kanser hastaları, florourasil, epirubisin ve siklofosfamid veya epirubisin + dosetaksel kombinasyonundan oluşan neoadjuvan kemoterapi almıştır. Malign grupta kemoterapi öncesi, kemoterapiden 24 ve 48 saat sonra belirgin ölçüde apoptoz saptandı. Metastatik grupta kontrol grubuna göre apoptozun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi. Çalışmanın sonuçlarına göre ilaç uygulamasını takiben M30 antijen seviyeleri 24. saatte anlamlı olarak artış gösterdi. Başlangıçtaki M30-antijen seviyeleri, tümör gerilemesi gösteren hastalarda yaklaşık 3 kat yüksek bulundu [13]. Bu çalışma, meme kanseri vakalarında kemoterapiden sonra M30 antijen seviyesinde, dolayısıyla apoptozda artış tespit edilmesi ve bu sayede klinisyenlerin kemoterapinin etkinliğini daha erken tahmin etmesine yardımcı olması bakımından büyük önem taşımaktadır. Bu alanda yapılacak çalışmalar için yol gösterici niteliktedir.

Neoadjuvan kemoterapi olarak gemitabin uygulaması yapılan hastalardan alınan pankreas kanseri örneklerinde preoperatif neoadjuvan kemoterapinin patolojik etkilerini ve apoptoz, epitelden mezenkime geçiş ve kanser kök hücre belirteçlerinin

ekspresyonu incelenmiştir [14]. Apoptoz belirteci M30, epitelden mezenkime geçiş belirteci Snail ve kanser kök hücre belirteci CD44, gemsitabin ile tedavi edilen hastalarda ve tedavi edilmeyen hastalarda incelenmiştir. Neoadjuvan kemoterapi grubundan alınan tümör örneklerinde, tümör hücresi hasarı gözlenmiştir. Bununla birlikte serozal, retroperitoneal, perinöral veya vasküler invazyon, lenf nodu metastazı veya tümör boyutunda önemli bir azalma olmamıştır. M30 ve CD44 belirteçlerinin miktarları neoadjuvan kemoterapi grubunda önemli ölçüde daha yüksek bulunmuş, ancak, iki grup arasında epitelden mezenkime geçiş belirteçlerinde önemli bir fark görülmemiştir. Gemitabin, in vivo olarak pankreas kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklemiş; ancak tümör yükünü azaltmamıştır. Ayrıca, kalan kanser dokularının kemoterapiye dirençli kanser kök hücreleri bakımından zengin olduğu saptanmıştır [14].

Dolaşımdaki sitokeratin 18 ve kaspazla bölünmüş sitokeratin 18, başka bir deyişle M30 ve M65 seviyelerini ELISA yöntemiyle ölçerek, kemoterapi ile indüklenen hücre ölümünün tespit edildiği bir başka çalışmada yaygın testiküler germ hücre kanseri olan hastalar değerlendirilmiştir [17]. Yaygın testiküler germ hücre kanseri tespit edilen 34 hastada bleomisin, etoposid ve sisplatin tedavisine başlamadan önce ve tedavi sırasında sirküle M30 ve M65 seviyeleri tespit edilmiştir. Kemoterapi öncesi serum M65 ve M30 antijen düzeylerinin testiküler kanser tümör belirteçleri olan laktat dehidrojenaz, α -fetoprotein ve β -hCG ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Çalışmanın sonuçları, tedavi öncesi ve sonrası boyunca M65 ve M30'un kümülatif yüzde değişiminin, kötü prognozlu hastalarda yüksek olduğunu göstermektedir. Kötü prognozu olan hastalar M65 ve M30 düzeylerinde en yüksek kümülatif azalmayı göstermişlerdir [17].

Bugüne kadar birkaç çalışma, bizim çalışmamızda olduğu gibi, kemoterapi sırasında M30 ve M65 değişimleri ile kemoterapiye verilen tümör yanıtı arasındaki ilişki üzerinde odaklanmıştır. Bir çalışmada, M30 monoklonal antikoru ile apoptoz sonrası dolaşıma salınan sitokeratin 18 proteinin meme kanserindeki tespiti için yapılan bir çalışma, M30 antijen düzeyi ile kemoterapi yanıtı arasındaki ilişkiyi araştırmayı hedeflemiştir [6]. İnvaziv meme karsinomu olan 42 hasta ile yapılan bu çalışmada, hastalara 4 döngü halinde antrasiklin bazlı neoadjuvan kemoterapi uygulanmıştır. İlk kemoterapi döngüsünde, uygulamanın öncesinde, 24 saat sonrasında ve 48 saat

sonrasında olmak üzere toplam 3 defa M30-antijen seviyelerinin değerlendirilmesi ve kemoterapiye bağlı apoptozun belirlenmesi için serum örnekleri alınmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, 24 ve 48. saatlerde M30 antijen seviyelerinin başlangıça göre anlamlı derecede yükseldiğini ortaya koymuştur. Bu çalışma, dolaşımda artış gösteren M30-antijen düzeyinin, kemoterapotik yanıt ile ilişkili olduğunu saptamıştır. Sonuç olarak, M30 düzeylerinde kemoterapi sonrası 24. saatte başlangıça göre üçte birden fazla artış olmasının orta düzeyde duyarlılık ve özgüllükle pozitif bir klinik yanıtı tahmin ettiği tespit edilmiştir.

Kemoterapi sonrası serum M30 ve M65 değerlerindeki değişiklikleri ve bu değerlerin ilerlemiş mide kanserli hastaların tedaviye yanıtı ve progresyonsuz sağkalımı ve genel sağkalımı arasındaki ilişkiyi belirlemeyi amaçlayan bir diğer çalışma, ilerlemiş mide kanserli toplam 31 hasta ile yapılmıştır. M30 ve M65 değerleri, ilk kemoterapi döngüsünden önce ve 48 saat sonra serum örneklerinde kantitatif enzime bağlı immünosorbent testi ile ölçülmüş, M30 ve M65'in kemoterapi öncesi ve sonrası değerleri karşılaştırılmıştır. Kemoterapi öncesi ve sonrası serum M30 ve M65'in ortalama değerleri arasındaki fark hesaplanmış ve sağkalım için değişikliklerin prognostik önemi yapılan analizler ile değerlendirilmiştir. Kemoterapi sonrası serum M30 ve M65 düzeylerinin anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. İlerlemiş mide kanserli hastaların serum örneklerinde hem M30 hem de M65'in kemoterapiden 48 saat sonra yükseldiğini ve bunların hastaların hem progresyonsuz sağkalımı, hem de genel sağkalımı için kötü prognostik faktörler olduğu belirlenmiştir. Bütün bu bulgulara ek olarak, kemoterapi sonrası artan serum M65 seviyelerinin tümör yanıtını tahmin etmek için önemli bir kriter olduğu anlaşılmıştır [20].

Neoadjuvan kemoterapi alması planlanan 48 akciğer kanseri hastası ve 38 sağlıklı gönüllü ile yapılan bir diğer çalışmada, M30 ve M65 seviyeleri kullanılarak, kemoterapi tedavisinden önce ve 48 saat sonra olmak üzere iki defa sitokeratin 18 seviyesi ölçülmüştür. Apoptotik ve toplam nekroz seviyeleri M65 ve M30 belirteçleri ile tespit edilmiş, beklendiği üzere kanser hastalarında M30 ve M65 antijen düzeyleri sağlıklı bireylere nazaran anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. M30 ve M65 antijen seviyeleri kemoterapiden 48 saat sonra, kemoterapi öncesine göre anlamlı ölçüde artmıştır. M30 seviyelerinin hastalık progresyonu olan hastalarda oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

Akciğer kanserli hastalarda serum M30 ve M65 düzeylerinde önemli artış tespit edilmiş, kemoterapiye cevap vermeyen hastalarda serum M30 seviyelerinde daha büyük bir artış olduğu görülmüştür. Bu sonuç, apoptoz ve toplam nekrozun neoadjuvan kemoterapi alan hastalarda tek başına M30 ve M65 ölçümleri ile bu değerlerin oranının değerlendirilmesinin tedavinin etkinliğini belirlemeye katkıda bulunacağına işaret etmektedir [21].

Diğer bir çalışmada 32 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastasında kemoterapi öncesi ve kemoterapiden 48 saat sonra ölçülen M30 ve M65 değerleri incelenmiş ve kemoterapiye bağlı bu değişimin hastalık prognozu açısından önemi değerlendirilmiştir [28]. Hastaların yarısında lokal ile evre hastalık (evre IIIA, IIIB) diğer yarısında ise metastatik hastalık (evre IV) vardır. Hiçbirisi son altı ay içerisinde kemoterapi almamıştır. Tüm hastalar platin-taksan kombinasyonu almıştır ve M30 ve M65 değerleri kemoterapi sonrasında anlamlı olarak artmıştır. Prognoza etki eden faktörleri değerlendiren çok değişkenli analizde sadece kemoterapi sonrası medyan M30 değeri hem progresyonsuz sağkalım hem de genel sağkalım için bağımsız prognostik belirleyici olarak çıkmıştır. Kemoterapi sonrası M30 değerinin yüksek olması (>550.2 IU) daha kısa progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalımla ilişkili bulunmuştur. Evre, histopatoloji, cerrahi ve kemoterapi sonrası M65 düzeyleri ise sağkalım açısından bağımsız belirleyici olarak bulunmamıştır.

Yakın zaman önce yapılan Nagel ve arkadaşlarının çalışmasında ise ileri evre gastrik kanser hastalarında M30 ve M65 düzeylerinin tedavi yanıtını ve sağkalımı öngörmek açısından değerleri incelenmiştir [29]. Hastaların %48'inde metastatik hastalık vardır. M30 ve M65 düzeyleri kemoterapi öncesinde ve kemoterapiden 14 gün sonra ölçülmüş, ayrıca çalışmanın 12 aylık takip süresinde tedavi yanıtı, progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım değerlendirilmiştir. M30 düzeyleri metastaz ve lenf nodu tutulumu olan hastalarda daha yüksek bulunmuştur. M30 düzeyleri tedavi ile birlikte anlamlı şekilde düşmüştür, ancak metastatik hastalığı olanlarda bu düşüş gözlenmemiştir. Tedavisi başarılı olmayanların başlangıç M30 değerleri daha yüksek bulunmuş, ayrıca 14. gündeki M30 değerlerinin yüksek olması tedavi yanıtı ile ilişkili bulunmuştur. 14. gündeki M30 değerleri çok değişkenli analizde tedavi yanıtı için anlamlı bağımsız belirleyici olarak bulunmuş, daha düşük değerler daha yüksek tedavi yanıtı ile ilişkili olmuştur.

Ayrıca, düşük M30 ve M65 değerleri daha iyi sağkalım ile ilişkili olmuştur. Yazarlar, palyatif kemoterapi alan ileri evre gastrik kanser hastalarında serum M30 ve M65 değerlerinin tedavi yanıtının göstergesi olarak kullanılabileceği sonucuna varmıştır.

Yakın zaman önce, M30 ve M65'deki kemoterapiye bağlı değişimlerin prediktif değerini değerlendirmek için, yeni tanı konmuş ve lokal olarak ilerlemiş meme kanseri hastalarında (T4 veya N2-3), neoadjuvan kemoterapi öncesi ve sonrası M30 ve M65 düzeyleri ölçülmüştür [30]. Cerrahi neoadjuvan tedavinin tamamlanmasından 2-3 hafta sonra yapılmış ve patolojik yanıt değerlendirilmiştir. Çalışmaya toplam 35 hasta alınmıştır. Ölçümler ilk kemoterapi seansı öncesinde ve 24 saat sonrasında yapılmıştır. Kemoterapi öncesi M30 ve M65 değerleri ile menopozal durum, tümör derecesi, hormon reseptör durumu, Ki67 ekspresyonu, moleküler alt tip ve evre gibi klinik özellikler arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Ayrıca, M30 ve M65'un kemoterapi öncesi ve sonrası değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. M30/M65 oranı da kemoterapi öncesi ve sonrasında anlamlı değişim göstermemiştir. Ayrıca, M30 ve M65 düzeylerindeki değişim ile patolojik yanıt arasında ilişki olup olmadığı araştırılmış, patolojik tam yanıt verenler ile tam yanıt vermeyenlerin neoadjuvan kemoterapi öncesi ve sonrası M30 ve M65 değişimleri arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Yazarlar, M30 ve M65 değerlerinin meme kanserinin neoadjuvan tedaviye yanıtını öngörebilecek hassas belirteçler olmadığı sonucuna varmıştır.

Chu ve arkadaşlarının çalışmasında, küçük hücreli dışı akciğer kanserinin paklitaksel ile tedavisinin erken döneminde M30 ve M65 değerlerinin kemoterapi sonucunu tahmin etmede yararlı olup olamayacağı araştırılmıştır [19]. Çalışmaya 44 ileri evre (evre III ve IV) küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastası alınmıştır. M30 ve M65 ölçümleri kemoterapi öncesinde ve kemoterapiden 48 saat sonra yapılmıştır. Kemoterapi sonrasında hem M30 hem de M65 düzeylerinde anlamlı artış olmuştur. Altmış aylık takibin sonunda ölçülen parametreler ile sağkalım arasındaki ilişki araştırılmıştır. Kemoterapi sonrası değerler ele alındığında, M30 ve M65 değerlerinin yüksek ya da düşük olması genel sağkalım üzerinde etki yapmamıştır. Ancak, M30/M65 oranı genel sağkalım için anlamlı bir prognostik belirteç olmuştur. M30/M65 oranı düşük olan hastalarda bu oranın yüksek olduğu hastalara göre genel sağkalımın daha iyi olduğu görülmüştür. Yüksek/düşük değerlendirmelerinde cut-off olarak medyan değerler alınmıştır (M30 için 433 U/L, M65

için 1210 U/L). Yazarlar, paklitaksel kemoterapisi sonrası M30/M65 oranının küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında kemoterapi sonucu için prognostik bir faktör olduğu sonucuna varmışlardır.

Benedict ve arkadaşları Calmette-Guerin basiline dirençli yüzeyel mesane kanseri hastalarında intravesical Ad-IFN α Syn3 tedavisi sonrası idrardaki M30 ve M65 düzeylerinin tam remisyonun bir belirteci olup olmadığını araştırmışlardır [31]. Tedaviden 24 saat sonra idrarda hem M30 hem de M65 düzeylerinde artış görülmüş, bunların 5 gün ve sonrasında normale dönmesi ise tam yanıt ile güçlü bir şekilde ilişkili bulunmuştur.

Bugüne kadar değişik tümör tiplerinde ve evrelerinde verilen kemoterapiye erken M30 ve M65 yanıtının hastalık seyri üzerindeki belirleyici etkisi araştırılmış, yukarıda da görüldüğü gibi değişik çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Erken artış bazı çalışmalarda kötü prognoza işaret edebildiği gibi bazı çalışmalarda da iyi prognoza işaret etmiştir. Bizim çalışmamızda da, gene birkaç çalışmada olduğu gibi, bu değişim tedavi yanıtı açısından belirleyici olmamıştır. Bu farklılıkların birçok sebebi olabilir. Öncelikle, genellikle çalışmalarda hastalık evresi açısından tam olarak da homojen hasta grupları alınmamıştır. Değişik evrelerde tümör yükü farklı olacağından apoptoz ve nekroz belirteçlerinin prognoz belirleyici özelliği kaybolabilir. Bizim çalışmamızda ise sadece evre IV hastalar bulunmaktadır ve bunların tümör yükü zaten yüksektir. Bu hasta grubunda ileri düzeyde bazal apoptoz, hücre ölümü ve doku yıkımının olması bu belirteçlerin tedavi yanıtı ve prognoz ile ilişkisi varsa bile varsa bile maskeleyebilecektir. Çalışmamızda kemoterapi öncesi ve sonrası M30 ve M65 değişimlerinin tedavi yanıtı ile ilişkili görülmemesini öncelikle buna bağlıyoruz. Diğer taraftan, daha önceki çalışmalar genellikle tek bir tümör tipi ile yapılmıştır, bizim çalışmamızda ise bu açıdan değişkenlik vardır. Dolayısıyla, belirli bir tümör tipinde M30 ve M65 biyobelirteçlerindeki değişimin tedavi yanıtı ve prognoz açısından önemi varsa bile bu durum çalışma grubumuzun heterojenitesi sebebiyle maskelenmiş olacaktır. Çalışmamızın önemli bir özelliği ise kemoterapi öncesi ya da sonrası mutlak değerleri değerlendirmek dışında değişiminde incelenmiş olmasıdır. Bu yöntemin olası bir kısa dönemlik değişimin sonuçlar üzerindeki etkisini araştırmak açısından bir avantaj olduğunu düşünüyoruz.

5. SONUÇ

Çalışmamızın bulguları evre IV metastatik kanseri olan hastalarda, kemoterapi sonrası erken dönemde M30 ve M65 değerlerinin artmasına rağmen, bu değişimlerin kemoterapiye tedavi yanıtı ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir.

Literatürde değişik kanser türlerinde yapılan çalışmalarda kemoterapi sonrası M30 ve M65 değerlerinin prediktif değeri ile ilgili bulgular çelişkilidir. Bunlardaki artış olumlu prognozu öngördüğü gibi, olumsuz prognozu da öngörmüştür. Ya da bizim çalışmamızda olduğu gibi prediktif bir değer bulunamamıştır.

Evre IV hastalarda zaten yüksek tümör yükü sebebiyle muhtemelen artmış nekroz/apoptoz olacağından, olası bir prediktif değer maskelenmiş olabilir.

M30 ve M65'in kemoterapi sonrası değişimlerinin prediktif değeri kanser türüne de bağlı olacağından, her bir kanser türünden daha fazla hasta sayısı olan geniş çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, literatürde kemoterapi sonrası ölçüm zamanı noktasında farklılıklar bulunmakta olup bununda elde edilen verilere direkt etkisi olabileceğinden dolayı ölçüm zamanlaması konusunda bir standardizasyon olması benzer sonuçlara ulaşılabilmesi noktasında yararlı olacaktır.

KAYNAKÇA

- 1 Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;60:277-300.
- 2 Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol.* 1997;138:1379-94.
- 3 Ueno T, Toi M, Linder S. Detection of epithelial cell death in the body by cytokeratin 18 measurement. *Biomed Pharmacother.* 2005;59 Suppl 2:S359-62.
- 4 Kramer G, Erdal H, Mertens HJ, et al. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Res.* 2004;64:1751-6.
- 5 Yaman E, Coskun U, Sancak B, et al. Serum M30 levels are associated with survival in advanced gastric carcinoma patients. *Int Immunopharmacol.* 2010;10:719-22.
- 6 Demiray M, Ulukaya EE, Arslan M, et al. Response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer could be predictable by measuring a novel serum apoptosis product, caspase-cleaved cytokeratin 18: a prospective pilot study. *Cancer Invest.* 2006;24:669-76.
- 7 Ulukaya E, Yilmaztepe A, Akgoz S, et al. The levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 are elevated in serum from patients with lung cancer and helpful to predict the survival. *Lung Cancer.* 2007;56:399-404.
- 8 Olofsson MH, Ueno T, Pan Y, et al. Cytokeratin-18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13:3198-206.
- 9 Ozturk B, Coskun U, Sancak B, et al. Elevated serum levels of M30 and M65 in patients with locally advanced head and neck tumors. *Int Immunopharmacol.* 2009;9:645-8.

- 10 Ausch C, Buxhofer-Ausch V, Olszewski U, et al. Caspase-cleaved cytokeratin 18 fragment (M30) as marker of postoperative residual tumor load in colon cancer patients. *Eur J Surg Oncol*. 2009;35:1164-8.
- 11 Uhlen M, Zhang C, Lee S, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017;357.
- 12 Koornstra JJ, Rijcken FE, De Jong S, et al. Assessment of apoptosis by M30 immunoreactivity and the correlation with morphological criteria in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. *Histopathology*. 2004;44:9-17.
- 13 Ulukaya E, Karaagac E, Ari F, et al. Chemotherapy increases caspase-cleaved cytokeratin 18 in the serum of breast cancer patients. *Radiol Oncol*. 2011;45:116-22.
- 14 Tajima H, Ohta T, Kitagawa H, et al. Neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine for pancreatic cancer increases in situ expression of the apoptosis marker M30 and stem cell marker CD44. *Oncol Lett*. 2012;3:1186-90.
- 15 Linder S, Olofsson MH, Herrmann R, et al. Utilization of cytokeratin-based biomarkers for pharmacodynamic studies. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10:353-9.
- 16 Malek-Hosseini Z, Khezri A, Amirghofran Z. Circulating Levels of M30 and M65 Molecules in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder and Their Relation to Tumor Progression. *Iran J Cancer Prev*. 2016;9:e4086.
- 17 de Haas EC, di Pietro A, Simpson KL, et al. Clinical evaluation of M30 and M65 ELISA cell death assays as circulating biomarkers in a drug-sensitive tumor, testicular cancer. *Neoplasia*. 2008;10:1041-8.
- 18 Sugimoto M, Abe K, Hayashi M, et al. The efficacy of serum cell death biomarkers for diagnosing biliary tract cancer. *Sci Rep*. 2018;8:16997.
- 19 Chu T, Jiang L, Ying W, et al. M30/M65 ratio predicts the outcome of paclitaxel chemotherapy for NSCLC. *Clin Transl Oncol*. 2017;19:326-31.
- 20 Bilici A, Ustaalioglu BB, Ercan S, et al. The prognostic significance of the increase in the serum M30 and M65 values after chemotherapy and relationship between

these values and clinicopathological factors in patients with advanced gastric cancer. *Tumour Biol.* 2012;33:2201-8.

21 Coskun BN, Dizdar OS, Korkmaz S, et al. The roles of M30 and M65 in the assessment of treatment response and prognosis in patients with non-small cell lung cancer, who receive neoadjuvant treatment. *Contemp Oncol (Pozn).* 2019;23:208-13.

22 Turk HM, Aliyev A, Celik RS, et al. Usefulness of serum M30 and M65 levels to predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Curr Probl Cancer.* 2020;44:100497.

23 Camuzcuoglu A, Sezgin B, Celik H, et al. Evaluation of serum M30 and M65 activity in patients with stage-I endometrial cancer. *J Obstet Gynaecol.* 2019;39:1112-6.

24 Scott LC, Evans TR, Cassidy J, et al. Cytokeratin 18 in plasma of patients with gastrointestinal adenocarcinoma as a biomarker of tumour response. *Br J Cancer.* 2009;101:410-7.

25 Hickman JA, Beere HM, Wood AC, et al. Mechanisms of cytotoxicity caused by antitumour drugs. *Toxicol Lett.* 1992;64-65 Spec No:553-61.

26 Kramer G, Schwarz S, Hagg M, et al. Docetaxel induces apoptosis in hormone refractory prostate carcinomas during multiple treatment cycles. *Br J Cancer.* 2006;94:1592-8.

27 Bilici A, Ustaalioglu BB, Ercan S, et al. Is there any impact of plasma M30 and M65 levels on progression-free survival of patients with advanced gastric cancer? *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68:309-16.

28 Ustaalioglu BB, Bilici A, Ercan S, et al. The prognostic importance of changing serum M30 and M65 values after chemotherapy in patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Med Oncol.* 2013;30:551.

29 Nagel M, Schulz J, Maderer A, et al. Cytokeratin-18 fragments predict treatment response and overall survival in gastric cancer in a randomized controlled trial. *Tumour Biol.* 2018;40:1010428318764007.

- 30 Fazilat-Panah D, Vakili Ahrari Roudi S, Keramati A, et al. Changes in Cytokeratin 18 during Neoadjuvant Chemotherapy of Breast Cancer: A Prospective Study. *Iran J Pathol.* 2020;15:117-26.
- 31 Benedict WF, Fisher M, Zhang XQ, et al. Use of monitoring levels of soluble forms of cytokeratin 18 in the urine of patients with superficial bladder cancer following intravesical Ad-IFNalpha/Syn3 treatment in a phase I study. *Cancer Gene Ther.* 2014;21:91-4.
- 32 Ghosh AP, Roth KA. Detection of Apoptosis and Autophagy. In: McManus LM, Mitchell RN, editors. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*; Elsevier; 2014. p. 3841-58.
- 33 Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 2015;22:58-73.
- 34 Aki T, Funakoshi T, Uemura K. Regulated necrosis and its implications in toxicology. *Toxicology.* 2015;333:118-26.
- 35 Kers J, Leemans JC, Linkermann A. An Overview of Pathways of Regulated Necrosis in Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol.* 2016;36:139-52.
- 36 Clarke PG, Clarke S. Nineteenth century research on cell death. *Exp Oncol.* 2012;34:139-45.
- 37 Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* 1973;7:253-66.
- 38 Krishna S, Overholtzer M. Mechanisms and consequences of entosis. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:2379-86.
- 39 Wallach D, Kang TB, Dillon CP, et al. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. *Science.* 2016;352:aaf2154.
- 40 Formigli L, Papucci L, Tani A, et al. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol.* 2000;182:41-9.

- 41 Desai J, Mulay SR, Nakazawa D, et al. Matters of life and death. How neutrophils die or survive along NET release and is "NETosis" = necroptosis? *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:2211-9.
- 42 Hanson B. Necroptosis: A new way of dying? *Cancer Biol Ther.* 2016;17:899-910.
- 43 Rello-Varona S, Herrero-Martin D, Lagares-Tena L, et al. The importance of being dead: cell death mechanisms assessment in anti-sarcoma therapy. *Front Oncol.* 2015;5:82.
- 44 Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006;25:4798-811.
- 45 Cotto-Rios XM, Gavathiotis E. Chemical genetics: Unraveling cell death mysteries. *Nat Chem Biol.* 2016;12:470-1.
- 46 Benarroch EE. Acquired axonal degeneration and regeneration: Recent insights and clinical correlations. *Neurology.* 2015;84:2076-85.
- 47 Chen P, Piao X, Bonaldo P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol.* 2015;130:605-18.
- 48 Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol.* 2014;171:2000-16.
- 49 Florey O, Kim SE, Overholtzer M. Entosis: Cell-in-Cell Formation that Kills Through Entotic Cell Death. *Curr Mol Med.* 2015;15:861-6.
- 50 Costanzo A, Fausti F, Spallone G, et al. Programmed cell death in the skin. *Int J Dev Biol.* 2015;59:73-8.
- 51 Weerasinghe P, Buja LM. Oncosis: an important non-apoptotic mode of cell death. *Exp Mol Pathol.* 2012;93:302-8.
- 52 Lee D, Kim IY, Saha S, et al. Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products. *Pharmacol Ther.* 2016;162:120-33.

- 53 Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, et al. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol.* 2012;226:380-93.
- 54 Kepp O, Galluzzi L, Zitvogel L, et al. Pyroptosis - a cell death modality of its kind? *Eur J Immunol.* 2010;40:627-30.
- 55 Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:2195-209.
- 56 Brown GC, Vilalta A, Fricker M. Phagoptosis - Cell Death By Phagocytosis - Plays Central Roles in Physiology, Host Defense and Pathology. *Curr Mol Med.* 2015;15:842-51.
- 57 Constantinou C, Papas KA, Constantinou AI. Caspase-independent pathways of programmed cell death: the unraveling of new targets of cancer therapy? *Curr Cancer Drug Targets.* 2009;9:717-28.
- 58 Tait SW, Green DR. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene.* 2008;27:6452-61.
- 59 Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res.* 2005;11:3155-62.
- 60 Jia M, Njapo SA, Rastogi V, et al. Taming glutamate excitotoxicity: strategic pathway modulation for neuroprotection. *CNS Drugs.* 2015;29:153-62.
- 61 Salinska E, Danysz W, Lazarewicz J. The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences.* 2005;43:322-39.
- 62 Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007;14:1237-43.
- 63 Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16:329-44.
- 64 Conradt B. Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annu Rev Genet.* 2009;43:493-523.

- 65 Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kepp O, et al. Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73:2405-10.
- 66 Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:860-75.
- 67 Wimmer K, Sachet M, Oehler R. Circulating biomarkers of cell death. *Clin Chim Acta*. 2020;500:87-97.
- 68 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.
- 69 Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Funct*. 2011;29:468-80.
- 70 D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43:582-92.
- 71 Aydinlik S, Dere E, Ulukaya E. Induction of autophagy enhances apoptotic cell death via epidermal growth factor receptor inhibition by canertinib in cervical cancer cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019;1863:903-16.
- 72 Brumatti G, Salmanidis M, Ekert PG. Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:1619-30.
- 73 Yatim N, Cullen S, Albert ML. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:262-75.
- 74 Flusberg DA, Sorger PK. Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. *Trends Cell Biol*. 2015;25:446-58.
- 75 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35:495-516.
- 76 Degterev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*. 2005;1:112-9.

- 77 Oliveira SR, Amaral JD, Rodrigues CMP. Mechanism and disease implications of necroptosis and neuronal inflammation. *Cell Death Dis.* 2018;9:903.
- 78 Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:135-47.
- 79 Marchal JA, Lopez GJ, Peran M, et al. The impact of PKR activation: from neurodegeneration to cancer. *FASEB J.* 2014;28:1965-74.
- 80 Yazdani R, Fatholahi M, Ganjalikhani-Hakemi M, et al. Role of apoptosis in common variable immunodeficiency and selective immunoglobulin A deficiency. *Mol Immunol.* 2016;71:1-9.
- 81 Ladoire S, Enot D, Andre F, et al. Immunogenic cell death-related biomarkers: Impact on the survival of breast cancer patients after adjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology.* 2016;5:e1082706.
- 82 Liang YY, Rainprecht D, Eichmair E, et al. Serum-dependent processing of late apoptotic cells and their immunogenicity. *Apoptosis.* 2015;20:1444-56.
- 83 Sachet M, Liang YY, Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis.* 2017;22:1189-204.
- 84 Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 2005;115:2665-72.
- 85 Yagami T, Yamamoto Y, Koma H. Pathophysiological Roles of Intracellular Proteases in Neuronal Development and Neurological Diseases. *Mol Neurobiol.* 2019;56:3090-112.
- 86 Hentze H, Schwoebel F, Lund S, et al. In vivo and in vitro evidence for extracellular caspase activity released from apoptotic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283:1111-7.

- 87 Jin L, Vu T, Yuan G, et al. STRAP Promotes Stemness of Human Colorectal Cancer via Epigenetic Regulation of the NOTCH Pathway. *Cancer Res.* 2017;77:5464-78.
- 88 Fuchs CS, Fakih M, Schwartzberg L, et al. TRAIL receptor agonist conatumumab with modified FOLFOX6 plus bevacizumab for first-line treatment of metastatic colorectal cancer: A randomized phase 1b/2 trial. *Cancer.* 2013;119:4290-8.
- 89 Roth C, Pantel K, Muller V, et al. Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression. *BMC Cancer.* 2011;11:4.
- 90 Wang J, Wang JF, Hu XM. Caspase-3 in serum predicts outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Clin Chim Acta.* 2016;460:196-202.
- 91 Ku NO, Strnad P, Bantel H, et al. Keratins: Biomarkers and modulators of apoptotic and necrotic cell death in the liver. *Hepatology.* 2016;64:966-76.
- 92 Tamura K, Yokoyama S, Ieda J, et al. Hollow spheroids beyond the invasive margin indicate the malignant potential of colorectal cancer. *BMJ Open.* 2011;1:e000179.
- 93 Collins JA, Schandi CA, Young KK, et al. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 1997;45:923-34.
- 94 Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Meister S, et al. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med.* 2008;205:3007-18.
- 95 Holdenrieder S, Stieber P. Clinical use of circulating nucleosomes. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46:1-24.
- 96 Wittwer C, Boeck S, Heinemann V, et al. Circulating nucleosomes and immunogenic cell death markers HMGB1, sRAGE and DNase in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy. *Int J Cancer.* 2013;133:2619-30.
- 97 Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* 2009;10:295-304.

- 98 Akar RO, Selvi S, Ulukaya E, et al. Key actors in cancer therapy: epigenetic modifiers. *Turk J Biol.* 2019;43:155-70.
- 99 Gezer U, Yoruker EE, Keskin M, et al. Histone Methylation Marks on Circulating Nucleosomes as Novel Blood-Based Biomarker in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2015;16:29654-62.
- 100 Li J, Han X, Yu X, et al. Clinical applications of liquid biopsy as prognostic and predictive biomarkers in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37:213.
- 101 Ulz P, Thallinger GG, Auer M, et al. Inferring expressed genes by whole-genome sequencing of plasma DNA. *Nat Genet.* 2016;48:1273-8.
- 102 Caruso S, Poon IKH. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Front Immunol.* 2018;9:1486.
- 103 Liang YY, Schwarzingen I, Simonitsch-Klupp I, et al. Impaired efferocytosis by monocytes in multiple myeloma. *Oncol Lett.* 2018;16:409-16.
- 104 Dieker J, Tel J, Pieterse E, et al. Circulating Apoptotic Microparticles in Systemic Lupus Erythematosus Patients Drive the Activation of Dendritic Cell Subsets and Prime Neutrophils for NETosis. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68:462-72.
- 105 Thaler J, Ay C, Mackman N, et al. Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *J Thromb Haemost.* 2012;10:1363-70.
- 106 Khan S, Simpson J, Lynch JC, et al. Racial differences in the expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in extracellular vesicles (EV) from prostate cancer patients. *PLoS One.* 2017;12:e0183122.
- 107 Date K, Hall J, Greenman J, et al. Tumour and microparticle tissue factor expression and cancer thrombosis. *Thromb Res.* 2013;131:109-15.

- 108 Huijgen HJ, Sanders GT, Koster RW, et al. The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997;35:569-79.
- 109 Thulin P, Nordahl G, Gry M, et al. Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts. *Liver Int.* 2014;34:367-78.
- 110 Tabata C, Shibata E, Tabata R, et al. Serum HMGB1 as a prognostic marker for malignant pleural mesothelioma. *BMC Cancer.* 2013;13:205.
- 111 Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008;18:997-1006.
- 112 Li J, Tan M, Xiang Q, et al. Thrombin-activated platelet-derived exosomes regulate endothelial cell expression of ICAM-1 via microRNA-223 during the thrombosis-inflammation response. *Thromb Res.* 2017;154:96-105.
- 113 Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:4402-7.
- 114 Ogata K, Sumida K, Miyata K, et al. Circulating miR-9* and miR-384-5p as potential indicators for trimethyltin-induced neurotoxicity. *Toxicol Pathol.* 2015;43:198-208.
- 115 Villar AV, Garcia R, Merino D, et al. Myocardial and circulating levels of microRNA-21 reflect left ventricular fibrosis in aortic stenosis patients. *Int J Cardiol.* 2013;167:2875-81.
- 116 Farr RJ, Joglekar MV, Taylor CJ, et al. Circulating non-coding RNAs as biomarkers of beta cell death in diabetes. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2013;11:14-20.
- 117 Gunther C, He GW, Kremer AE, et al. The pseudokinase MLKL mediates programmed hepatocellular necrosis independently of RIPK3 during hepatitis. *J Clin Invest.* 2016;126:4346-60.

- 118 Rickard JA, O'Donnell JA, Evans JM, et al. RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. *Cell*. 2014;157:1175-88.
- 119 Li X, Guo J, Ding AP, et al. Association of Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Expression With Prognosis in Patients With Colon Cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2017;16:428-34.
- 120 He L, Peng K, Liu Y, et al. Low expression of mixed lineage kinase domain-like protein is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1539-43.
- 121 Hu B, Shi D, Lv X, et al. Prognostic and clinicopathological significance of MLKL expression in cancer patients: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2018;18:736.
- 122 Ito Y, Ofengeim D, Najafov A, et al. RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS. *Science*. 2016;353:603-8.
- 123 Vucur M, Roderburg C, Kaiser L, et al. Elevated Serum Levels of Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Predict Survival of Patients during Intensive Care Unit Treatment. *Dis Markers*. 2018;2018:1983421.

EKLER

EK - 1 : Kurum İzni 1– Altınbaş Üniversitesi Bahçelievler Medical Park Hastanesi

EK - 2 : Kurum İzni 2– Kemoterapi Onkoloji Merkezi

EK - 3 : Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu



EK - 1 : Kurum İzni 1– Altınbaş Üniversitesi Bahçelievler Medical Park Hastanesi



İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU BAŞKANLIĞINA

Tarih :

Abdul Kadir Slocum isimli araştırmacının “Serum M30 ve M65 biyobelirteç düzeylerinin metastatik kanser hastalarında kemoterapi yanıtını önceden tahmin etmedeki öneminin araştırılması” adlı çalışmasını Altınbaş Üniversitesi Bahçelievler Medical Park Hastanesi 'nde metastatik kanser hastalarına uygulanması uygundur.

MEDICAL PARK
BAHÇELİEVLER HASTANESİ

İmza gizlenmiştir.

EK - 2 : Kurum İzni 2– Kemotermi Onkoloji Merkezi



İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU BAŞKANLIĞINA

Tarih :

Abdul Kadir Slocum isimli araştırmacının "Serum M30 ve M65 biyobelirteç düzeylerinin metastatik kanser hastalarında kemoterapi yanıtını önceden tahmin etmedeki öneminin araştırılması" adlı çalışmasını Kemotermi Onkoloji Merkezi 'nde metastatik kanser hastalarına uygulanması uygundur.

KEMOTERMİ SAĞLIK
HİZMETLERİ EĞİTİM TİCARET
VE KAMAYI LIMITED ŞİRKETİ

İmza gizlenmiştir.

EK - 3 : Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Sizi merkezimizde yürütülen "Serum M30 ve M65 biyobelirteç düzeylerinin metastatik kanser hastalarında kemoterapi yanıtını önceden tahmin etmedeki öneminin araştırılması" başlıklı araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın ne amaçla ve nasıl yapılacağını, bu araştırmanın gönüllü katılımcılara getireceği olası faydaları, riskleri ve rahatsızlıklarını bilmeniz ve kararınıza bu bilgilendirme çerçevesinde özgürece vermeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Bu form araştırma sorumlusu olarak bizler tarafından size sözel olarak aktarılan bilgilendirmenin yazılı şeklini içermektedir. Formu imzalamadan önce size sözel olarak da anlatılan aşağıdaki bilgileri birkez de dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Katılmayı kabul ettiğiniz takdirde, tarafınız ve bilgilendirme esnasında yanınızda olan tanık kişi tarafından imzalanan bu formun bir kopyası saklamamız için size verilecektir. Araştırmanın konusu kemoterapinin apoptoz (hücre ölümü) biomarkerlarına (kanda tespit edilebilen biyolojik gösterge) olan etkisi olup, amaç bu biomarkerların (kanda tespit edilebilen biyolojik gösterge) tedavi yanıt öngörüsünde etkili olup olmadığının tespit edilmesidir ve araştırma için tarafınızdan alınan serum laboratuvar ortamında değerlendirilip tespit edilen M30 ve M65 düzeyi ile tedavi yanıtınız arasında ki ilişki değerlendirilecektir.

Araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkına sahipsiniz. İstemediğiniz sorulara cevap vermemeye hakkına sahipsiniz. Her üç durumda da hiçbir yaptırma ve hak kaybına maruz kalmayacağınızı bildirmek isteriz.

Ayrıca yapılacak olan çalışmada / araştırmada "Kişisel Verilerin Korunması Kanununun" ilgili maddeleri dikkate alınacağını belirtmek isteriz.

*Araştırma Sorumlusu
(Adı-Soyadı-Ünvanı-imza)*

GÖNÜLLÜ ONAMI

Yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırmaya ilişkin bilgilendirme bölümünü okudum ve aşağıda imzası olan ilgili tarafından önce sözlü sonra yazılı olarak bilgilendirildim. Katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları tamamen anladım. Çalışma hakkında soru sorma ve tartışma imkanı buldum ve tatmin edici yanıtlar aldım. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları sözlü olarak da anlatıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerçekçeli veya gerçekşesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırmaya dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Bu koşullarda;

- 1) Söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı (çocuğumun/vasımın bu çalışmaya katılmasını) kabul ediyorum.
- 2) Gerek duyulursa kişisel bilgileri mevsuatta belirtilen kişi/kurum/kuruluşların erişebilmesine,
- 3) Çalışmada elde edilen bilgilerin (kimlik bilgilerim gizli kalmak koşulu ile) yayın için kullanılma, arşivleme ve eğer gerek duyulursa bilimsel katkı amacı ile ülkemiz dışına aktarılmasına olur veriyorum.

Eki başkaca bir açıklamaya gerek duymadan, hiçbir baskı altında kalmadan ve bilinçli olarak bu araştırmaya katılmayı onaylıyorum

Gönüllünün (Kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:
İletişim:
Tarih:
İmzası:

*Velayet veya Vesayet Altında Bulunanlar
İçin Veli veya Vasisinin (kendi el yazısı ile)*

Adı-Soyadı:
İletişim:
Tarih:
İmzası:

Gönüllünün Dil / İletişim Problemi var ise;

Gönüllüye tarafından yapılan tüm açıklamaları tercüme ettim. Gönüllüye toplam 2 sayfadan, bilgilendirme ve rıza bölümlerinden oluşan bu formun tüm sayfalarını okuyarak tercüme ettim. Tercüme ettiğim bilgiler gönüllü tarafından anlaşılmış ve uygun bulunmuştur.

Tercüman Adı Soyadı:

İmzası:

Araştırmaya Katılma / Ayrılma Konusunda Haklarımız ve Araştırmacının Haklarımızı Koruma Güvencesi

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da başladıktan sonra herhangi bir zamanda bırakabilirsiniz. Çalışmaya katılmama, çalışmadan çıkma veya çıkarılma durumlarında herhangi bir ceza ya da yararıma olan hakların kaybı kesinlikle söz konusu olmayacaktır. Araştırma konusu ile ilgili araştırmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edilmesi durumunda siz ya da yasal temsilciniz bilgilendirilecektir.

Araştırmanın sonuçları bilimsel ve eğitim amaçları ile kullanılacaktır. Sizden elde edilen tüm bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacak, gizli tutulacak, araştırma yayınlandığında da varsa kimlik bilgilerinizin gizliliği korunacaktır.

(sex, fotoğraf veya görüntü kaydı kullanılacak ise burada mutlaka belirtiniz.)

İletişim Kurulacak Kişi(ler)

Ad Soyad: Abdul Kadir Slocum

Telefon: Gizlenmiştir

Toplam 2 sayfadan oluşan işbu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu 2 nüsha olarak hazırlanmış olup, bir nüshası gönüllüye teslim edilmiştir.

ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Araştırmanın Başlığı: Serum M30 ve M65 Biyobelirteç Düzeylerinin Metastatik Kanser Hastalarında Kemoterapi Yanıtını Önceden Tahmin Etmedeki Öneminin Araştırılması			
Proje Danışmanı: Prof. Dr. Engin ULUKAYA		Sorumlu Araştırmacı: Abdul Kadir SLOCUM	
Toplantı Tarihi	27.01.2021	Protokol No:	143

SONUÇ

☒ Etik olarak uygun bulunmuştur.
☐ Düzeltme gereklidir:
☐ Görevsizdir; Gerekçe, Görüş, Tavsiye ve Açıklamalar:

Başvuruda bulunduğunuz başvuru dosyası ve ilgili belgeleri İstinye Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiştir.

İmza Gizlenmiştir.

Prof. Dr. Şefra ŞARDAŞ
Etik Kurul Başkanı

İmza Gizlenmiştir.

Prof. Dr. Hikmet KOÇAK
Üye

İmza Gizlenmiştir.

Prof. Dr. Yeşim Saliha GÜRBÜZ
Üye

İmza Gizlenmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Nurgül DÜRÜSTKAN ELBAŞI
Üye

İmza Gizlenmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Zehra AYDIN
Üye

İmza Gizlenmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Doğan ÜÇKEL
Üye

İmza Gizlenmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Bernis SÜTCÜBAŞI
Üye

İNTİHAL RAPORU

Turnitin Orjinallik Raporu

İşleme kondu: 10-Ağu-2021 15:36 +03
NUMARA: 1629915926
Kelime Sayısı: 15885
Gönderildi: 1

Tez Abdul Kadir Slocum tarafından

Doküman Görüntüleyici

Benzerlik Endeksi
%7

Kaynağa göre Benzerlik
İnternet Sources: %5
Yayınlar: %2
Öğrenci Ödevleri: %5

[alıntıları dahil et](#) [bibliyografyayı dahil et](#) [küçük eşleşmeleri çıkar](#)

mod: raporu hızlı görüntüle (klasik)

Change mode [yazdır](#) [venile](#) [İndir](#)

2% match (07-May-2020 tarihli internet) https://es.scribd.com/document/169713336/Bayesian-Methods-Python	❏
1% match (29-May-2021 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Anadolu University on 2021-05-29	❏
1% match (14-Nis-2021 tarihli internet) https://saglikbilimleri.istinye.edu.tr/sites/saglikbilimleri.istinye.edu.tr/files/inline-files/%C4%B0S%C3%9C%20SBE%20TEZ%20YAZIM%20KILAVUZU.pdf	❏
1% match (27-Oca-2021 tarihli öğrenci ödevleri) Sınıf: YÜKSEK LİSANS TEZİ Ödev: 10377115 Ödev Numarası: 1495267456	❏
<1% match (03-May-2020 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK) on 2020-05-03	❏
<1% match (10-Haz-2021 tarihli internet) https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/1462/ZeynepPurenAkguner.pdf?isAllowed=y&sequence=2	❏
<1% match (30-May-2021 tarihli internet) http://acikerisim.fsm.edu.tr	❏
<1% match (17-Ara-2019 tarihli internet) http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	❏
<1% match (11-May-2021 tarihli internet) http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	❏
<1% match (11-May-2021 tarihli internet) http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	❏
<1% match (19-Kas-2020 tarihli internet) https://www.selcukmedj.org/tr-tr/search-article-makale-arama/arastirma-makalesi/	❏
<1% match (19-Kas-2019 tarihli internet) http://nek.istanbul.edu.tr:4444	❏
<1% match (02-Tem-2021 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Firat Üniversitesi on 2021-07-02	❏
<1% match (31-Tem-2021 tarihli internet) https://app.trdizin.gov.tr/makale/TXpNMk1EUXdNQTO9/key-actors-in-cancer-therapy-epigenetic-modifiers	❏
<1% match (25-Mar-2021 tarihli internet) https://app.trdizin.gov.tr/yazar/TWpVME16TXpNdZ09/bulent-valcin	❏
<1% match (24-May-2015 tarihli internet) http://web.deu.edu.tr	❏
<1% match (17-Kas-2020 tarihli internet) https://www.researchgate.net/publication/261712080_Thrombolytic_therapy_for_acute_myocardial_infarction_and_nursing_interventi	❏
<1% match (08-Eki-2015 tarihli internet) http://www.researchgate.net	❏
<1% match (yayınlar) "Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015	❏
<1% match (28-Oca-2019 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Baskent University on 2019-01-28	❏
<1% match (26-Tem-2018 tarihli internet) http://sabe.klu.edu.tr	❏
<1% match (yayınlar) İLGAZ, Fatma, ARSLAN, Perihan and YALCIN, Suayip. "Kemoterapinin Kolon Kanserli Hastaların Beslenme Durumlarına Etkisi", Türkiye Diyetisyenler Derneği, 2016.	❏

ÖZGEÇMİŞ

Dr. Abdul Kadir Slocum, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi eğitiminden sonra Medipol Üniversitesi'nde Sağlık Bakanlığı onaylı Fitoterapi ve Ozon Terapi uygulama sertifika programlarını tamamlamıştır. Özellikle onkolojide inovatif tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve uygulanması konusunda ilgisi olup bu alanda klinik hayatına Prof. Dr. Bülent Berkarda ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet Salih İyikesici ile başlamıştır. Konvansiyonel kanser tedavisini destekleyici olarak metabolik destekli kemoterapi, ketojenik diyet, hipertermi, hiperbarik oksijen ve metabolik tedaviler hakkında çalışmaları olmuş ve bu tedavilerin klinik kullanımının tedavi sonuçlarına etkisi hakkında uluslararası hakemli dergilerde yayınlar yapmıştır.