ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IRAK'TAKİ KOLOREKTAL KANSERİ HASTALARINDA KULLANILAN BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER

ABDULRAZZAK FRIYYIH SAEED

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Abdulrazzaq FRIYYIH SAEED tarafından hazırlanan “Irak'taki Kolorektal Kanseri Hastalarında Kullanılan Biyokimyasal Belirteçler” adlı tez çalışması adlı tez çalışması 12.02.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Saliha ALYAR

Jüri Üyeleri :

Başkan **:** Doç. Dr. Şevki ADEM

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Fatma HAMURCU

Üye **:** Doç. Dr. Saliha ALYAR

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Enstitü Müdürü

Dr. Öğretim Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "*Irak'taki Kolorektal Kanseri Hastalarında Kullanılan Biyokimyasal Belirteçler*" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (12/02/2021).

Abdulrazzaq FRAYYIH SAEED

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Irak'taki Kolorektal Kanseri Hastalarında Kullanılan Biyokimyasal Belirteçler

Abdulrazzaq FRAYYIH SAEED

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Saliha ALYAR
Öğr. Gör. Dr. Hanan Shihab AHMAD(Eş Danışman)

Kalın bağırsakta tümör büyümesi gelişince kolon kanseri gelişmektedir. Şimdi Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın üçüncü kanser türüdür. Kolon kanseri aynı zamanda ABD'de kansere bağlı ölümlerin üçüncü en yaygın nedenidir. 2019 yılında Amerikan Kanser Birliği (ACS) ABD'de 101.420 kişinin yeni bir kolon kanseri teşhisi aldığını açıklamıştır. Kolon veya kalın bağırsak vücudun katı atıklardan su ve tuz çıkardığı yerdir. Atık daha sonra rektum boyunca hareket eder ve vücuttan anüsten çıkar. Sağlık uzmanları 50 yaşından itibaren kolon kanseri için düzenli taramalara katılmayı önermektedir. Bununla birlikte ortaya çıkan kolon kanseri ve rektum kanserini tanımlayan kolorektal kanser de yaygındır. Rektal kanser, kalın bağırsağın son birkaç santimi olan rektumda anusa en yakın olan yerde ortaya çıkar. Çalışmamız iki aşamalı olarak gerçekleştirilen kesitsel bir çalışmadır: İlki, Radyoterapi bölümünde (Bağdat Eğitim Hastanesi laboratuvarı, Bağdat, Irak) toplanan 70 numune ile ikincisi, tedavinin cerrahi ve kemoterapiye dayalı olduğu kolon kanserinden farklı olarak, tedavisi cerrahi ve radyoterapiye dayalı bir kolorektal kanserler olan rektal kanserli hasta örnekleri dâhil olmak üzere verilerin toplanmasından oluşmaktadır. OLFM4'ü kanser kolorektalinin erken teşhisi için aday biyobelirteç potansiyeli olarak önerilmiştir.

2021, 91 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Kanser, Kolorektal,Biyokimyasal

ABSTRACT

MasterThesis

Biochemical Markers Used In Colorectal Cancer Patients in Iraq

Abdulrazzaq FRAYYIH SAEED

Çankırı Karatekin University

Institute of Science

Department of Chemistry

Supervisors: Doç. Dr. Saliha ALYAR

Lecturer Dr. Hanan Shihab AHMAD

Colon cancer develops when tumor growth develops in the large intestine. It is now the third most common type of cancer in the United States. Colon cancer is also the third most common cause of cancer-related death in the United States. In 2019, the American Cancer Association (ACS) announced that 101,420 people in the USA received a new colon cancer diagnosis. The colon or large intestine is where the body extracts water and salt from solid waste. The waste then moves through the rectum and exits the body through the anus. Health professionals recommend attending regular screening for colon cancer from the age of 50. However, colorectal cancer, which defines the occurring colon cancer and rectal cancer, is also common. Rectal cancer occurs in the rectum, the last few inches of the large intestine, closest to the anus. Our study is a cross-sectional study carried out in two stages: first, with 70 samples collected in the radiotherapy department (Baghdad Training Hospital laboratory, Baghdad, Iraq), the second, unlike colon cancer, where the treatment is based on surgery and chemotherapy, rectal cancers, the treatment of which are based on surgery and radiotherapy. It consists of collecting data including samples of patients with cancer. OLFM4 has been suggested as potential candidate biomarker for early detection of cancer colorectal.

2021, 91 page

ANAHTAR KELİMELER: Cancer, Colorectal, Biochemical.

TEŞEKKÜR

“Irak'taki Kolorektal Kanseri Hastalarında Kullanılan Biyokimyasal Belirteçler” adlı bu Yüksek Lisans çalışmamın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, her türlü yardımını esirgemeyen, her zaman destekleyen ve inanılmaz bir anlayış gösteren değerli hocam Doç. Dr. Saliha ALYAR’a ve çalışmanın yönlendirilmesinde ve yürütülmesinde yol gösteren herkese sonsuz teşekkür ederim.

Abdulrazzaq FRAYYIH SAEED

ÇANKIRI, Şubat 2021

İÇİNDEKİLER

Özet……iii

Abstract……iv

1. GİRİŞ……1

2. KURAMSAL TEMELLER……..…….....3

2.1 Sindirim Sistemi Anatomisi……3

2.2 Kanser……4

2.2.1 Kolorektal kanser.....5

2.3 Polipler……5

2.3.1 Poliplerin tedavisi……...….6

2.4 Kolorektal Kanser (CRC) Epidemiyolojisi…….7

2.4.1 CRC doğal tarih……...…9

2.4.2 Irak'ta kolorektal kanser durumu……..…9

2.4.3 Kolerektal kanser belirtileri……...10

2.4.4 Kolorektal kanser tanı…….……...11

2.4.5 Kolorektal kanser tipleri……...……..13

2.4.6 Kolon kanseri evrimi…….……....14

2.5 Biyokimyasal İşaretçiler……..16

2.5.1 Tümör belirteçleri……..…...16

2.5.2 Tümör belirtecinin tanımı…….…....16

2.5.3 Kolorektal kanserde tümör belirteçleri……..……...18

2.5.4. Doku belirteçleri……...….18

2.5.5 Diğer tümör belirteçleri……..……..…..18

2.5.6 Prognostik belirteçler……19

2.5.7 Anjiyojenik belirteçler……...19

2.5.8 Biyobelirteçler -CRC……..……...19

2.5.9 CRC'lerin farklı tümör biyobelirteçleri……22

2.5.10 Biyobelirteçlerin kaynakları……24

2.5.11 Biyobelirteçlerin özellikleri…….25
2.6 Biomarker Çalışmasındaki Akademik Hedefler…….…….26
2.6.1 Tek başına 5FU kullanarak yardımcı kemoterapi.....28
2.7 FOLFOX ile Adjuvan Kemoterapi……..…….29
2.8 Klinik Sonuçlar…….29
2.8.1 IMS'yi belirleme yöntemleri……..29
2.9 Sinyal kanalları……..30
2.9.1. EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) yolu……..…….30
2.9.2 RAS yolu…….…...32
2.9.3 BRAF…….33
2.9.4 Hedeflenen anti-BRAF tedavileri……..33
2.10 Uygulamada CRC Tümör Biyobelirteçlerin Araştırılması…….34
2 MATERYAL METOD……36
3.1 Çalışma Materyali…….36
3.2. Çalışma Metodolojisi……36
3.2.1. Verilerin toplanması……..36
3.2.2. Dâhil edilme kriterleri……...36
3.2.3 İncelenen değişkenler……36
3.2.4 Numunelerin toplanması ve saklanması……37
3.2.5 MALDI TOF / TOF kütle spektrometresi ile analiz……..38
3.2.6 İstatistiksel analiz…….39
4 BULGULAR……...40
4.1. Epidemiyolojik Veriler…….40
4.1(a) Yaş……..40
4.1 (b) Cinsiyet……...41
4.2 Hastaların Kökeni…….42
4.3 Genel Hasta Durumu……43
4.3.1 Tıbbi geçmiş……..43

4.3.2 Kanser ve diyabet……..44
4.3.3 Aile öyküsü……44
4.3.4 Toksik alışkanlıklar……...45
4.3.5 Beslenme alışkanlıkları……..46
4.4 Et ve CRC……46
4.4.1 Dengeli beslenme……..47
4.5 Sosyo-Ekonomik Düzey……...48
4.6 Teşhis (Laboratuvar incelemeleri)……48
4.6.1 Radyolojik incelemeler……..48
4.7 Patolojik inceleme……50
4.7.1 Patoloji incelemesi……50
4.7.2 Serimizde bulunan ana klinik belirtiler……51
4.8 TNM Sınıflandırması……52
4.8.1 Parietal uzantı T……52
4.8.2 Locoregional lenfadenopatiler (Le) (N)……53
4.8.3 Uzaktan metastazlar (M)……...53
4.8.4 Rektal kanserin farklı aşamaları……54
4.8.5 Tedavi……54
4.9 Kolorektal Kanser Tümörü Biyokimyasal Belirteç Çalışmaları……...56
4.9.1 Tümörler……58
4.9.2 Tümör kesitlerinin oluşturulması ve lazer mikrodiseksiyon……59
4.9.3 Protein ekstraksiyonu, triptik sindirim ve tahlil……60
4.9.4 Redüksiyon, alkilasyon, ıtraq markalama……60
4.9.5 OFFGEL izoelektrik odaklama……62
4.9.6 RPLC ile ayırma……62
4.9.7 MALDI TOF / TOF kütle spektrometrianalizi……..63
4.9.8 Proteomik analiz araçları……...63
4.9.9 İmmüno histokimya……...63

4.9.10 Western Blot……65
4.9.11 ChIP……65
4.9.12 Hücre modelleri……...66
4.9.13 Kültür şartları……...67
4.9.14 Hücresel protein ekstrelerininhazırlanması……67
4.9.15 Girişim RNA……68
4.9.16 Kürelerin Oluşumu……..68
4.9.17 OLFM4 ELISA Testleri……..69
4.9.18 Klonojenite Testleri……69
4.9.19 FASP……70
4.9.20 Glikopeptit Zenginleştirme……..70
4.10 Glikopeptitlerde zenginleştirme……71
4.10.1 Lektinlerde zenginleşme……71
4.10.2 Hidrazin boncuklarında zenginleştirme……..71
4.11 OLFM4'ün Yönlendirilmiş Mutagenezi……..72
4.12 Tümör Stromasının İncelenmesi……72
5 SONUÇLAR VE TARTIŞMA……73
5.1 OLFM4'ün Glikosile edilmesi……..73
5.2 Erken Tümörlerin Saptanması İçin OLFM4'ün Belirteç Olarak Kullanılması……73
5.3 Siteye yönelik mutagenez ile glikosilasyon bölgelerinin doğrulanması……..74
5.4 OLFM4: HücreninHayatta Kalmasına Etkisi……...75
5.5 OLFM4: Hücrelerin Üç Boyutlu Yapılar Oluşturma Kapasitesine Etkisi……76
5.6 Kolorektal Tümörlerin Genetik Analizi……...77
5.7 RAS Onkojeninde Mutasyona Uğramış veya Mutasyona Uğramayan Tümörlerin Proteomik Aalizi……..79
5.8. OLFM4 ve KRAS Arasındaki Bağlantının Doğrulanması……...80
5.9. KRAS Mutasyonu İçin Bir Belirteç Olarak OLFM4'ün Doğrulanması……...83
KAYNAKLAR……86

SİMGELER VE KISALTMALAR

CRC Kolorektal Kanser

CEA Karsino Embryonik Antijen

WHO Dünya Sağlık Örgütü

APC Adenomatus poliposis Coli

KRAS K-Ras geni

CAT Bilgisayarlı eksenel tomografi

TM Tümor işaretleyicileri

NCCN Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı

CA 19-9 Karbonhidrat antijen 19-9

NIH Ulusal Sağlık Enstitüsü

NCI Ulusal Kanser Enstitüsü

FDA Gıda ve İlaç İdaresi

MRI Manyetik rezonans görüntüleme

CIN Kromozomal İstikrarsızlık

LOH Heterozigotluk Kaybı

VN Gerçek negatifler

FN Yanlış negatifler

VP Gerçek pozitifler

FP Yanlış pozitifler

PCR Polymerase chain reaction

IMS Mikro uydu kararsızlığı

EGF Epidermal büyüme faktörü

ADC Görünen Difüzyon Katsayısı

RCC Eşzamanlı radyo kemoterapi

OLFM4 İnsanlarda OLFM4 geni tarafından kodlanan bir proteindir.

ELISA The enzyme-linked immunosorbent assay

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Kalın Bağırsağın Anatomisi……..3

Şekil 2.2 Kanser Hücresinin şematik gösterimi.....4

Şekil 2.3 Kolorektal Kanserin şematik gösterimi…….5

Şekil 2.4 Polipler……..6

Şekil 2.5 Dünya çapında öngörülen yaşa göre standartlaştırılmış seviyeler……8

Şekil 2.6 2018'de dünya genelinde erkek olayları, CRC için bildirilen yaşa göre standartlaştırılmış düzeyler……9

Şekil 2.7 Kolonoskopi Aleti…….……...13

Şekil 2.8 Kolon Kanseri Evrimi…….….14

Şekil 2.9 Kolorektal karsinojenezin 2 ana yolu…….23

Şekil 2.10 Reseptör EGF-R……30

Şekil 2.11 RAS / RAF / MAK / MAPK ve PI3K / AKT kanalları……..32

Şekil 3.1 Depolama serum kitaplığı……...37

Şekil 4.1 Hastaların yaşa göre dağılımı…….40

Şekil 4.2 Hastaların cinsiyete göre dağılımı……..41

Şekil 4.3 Hastaların tıbbi geçmişe göre dağılımı……43

Şekil 4.4 Tıbbi ATCD'ye göre hastaların dağılımı…….43

Şekil 4.5 Hastaların Aile ATCD'sine göre dağılımı……...44

Şekil 4.6 Rektumun ve kalın bağırsağın son kısmının endoskopik muayenesi……..49

Şekil 4.7 Çift kontrastlı baryum lavmanını takiben kalın bağırsak röntgeni……..50

Şekil 4.8 Hastaların klinik belirtilere göre dağılımı……...51

Şekil 4.9 Parietal uzantıya (T) göre hastaların dağılımı……52

Şekil 4.10 Le N'ye göre hastaların dağılımı……...53

Şekil 4.11 Hastaların M'ye göre dağılımı……...53

Şekil 4.12 Vakaların aşamalara göre dağılımı……54

Şekil 4.13 Hastaların tedavi türüne göre dağılımı……..54

Şekil 4.14. Sağlıklı kolon dokusu ve tümör dokusu arasındaki……..60

Şekil 4.15 OLFM4'e yönelik iki siRNA'ların dizileri…….68

Şekil 5.1 Polipli hastalardan alınan serumlar üzerinde gerçekleştirilen ELISA testlerinin ön sonuçları……..73

Şekil 5.2 Glikosilasyon bölgelerinin western blot ile doğrulanması - COS7 hücreleri ve HCT116 hücreleri, OLFM4'ün mutant formlarını kodlayan plazmitlerle transfekte edilmesi ve süpernatanlar western blot ile analizi……...75

Şekil 5.3 LS180 hücrelerinde OLFM4'e yönelik bir enterferans RNA'sının transfeksiyonu 76

Şekil 5.4 Bir kontrol girişim RNA'sı ile veya OLFM4'e yönelik iki girişim RNA havuzu ile transfekte edilmiş LS180 hücreleri ile elde edilen sferoidlerin görüntüleri./Küreleri oluşturan hücrelerin sayısı 10 günlük kültür ve triptik ayrışmadan sonra sayıldı (n = 3))……...……..77

Şekil 5.5 LS174t, LS180, SW1463 ve SW403 satırlarında OLFM4 ifadesinin doğrulanması için Western blot……..82

Şekil 5.6 (A) RAS onkogeni için tümörlerin genetik durumuna göre OLFM4 ekspresyon seviyesindeki varyasyonun iTRAQ raporu.(B) RAS üzerinde mutasyona uğramamış bir tümörün ve OLFM4'e yönelik bir antikor ile mutasyona uğramış bir tümörün immünohistokimyasal etiketlemesi…….....83

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge 2.1 Doğru / yanlış negatifler ve doğru / yanlış pozitifler kavramları……26

Çizelge 4.1 Hastaların kökenlerine göre dağılımı……..42

Çizelge 4.2 Toksik Alışkanlıklara Göre Hastaların Dağılımı…….45

Çizelge 4.3 Yemek Alışkanlıklarına Göre Hastaların Dağılımı…….46

Çizelge 4.4 OLFM4'ü mutasyona uğratmak için kullanılan mutagenez primerleri…...72

Çizelge 5.1 70 kolon tümörü üzerindeki mutasyonların analizinin sonuçları……78

Çizelge 5.2 KRAS'ta mutasyona uğramış ve mutasyona uğramamış tümörlerin sağlıklı doku havuzuna kıyasla proteomik analizinin sonucu……..79

Çizelge 5.3 RAS durumuna göre kolorektal hücre çizgilerinde OLMF4 mRNA ekspresyon seviyesi…….81

1. GİRİŞ

Kanser kelimesi, 200'den fazla kötü huylu tümörü kapsayan çok geniş bir terimdir. Her biri, bazı durumlarda diğer kanserlerin geri kalanından tamamen farklı olan ve nedenleri, evrimleri ve özel tedavileri ile bağımsız hastalıklar olarak kabul edilebilecek belirli özelliklere sahiptir. Bu nedenle kanser teşhisi konmuş iki kişinin yaşayabileceği süreci birbiriyle karşılaştırmak uygun değildir. Aynı adı taşıyan bir hastalıktan muzdarip olmasına rağmen, semptomları, tedavileri ve evrimi tamamen farklı olabilir ve biri için işe yarayanın bir başkası için hiçbir değeri olmayabilir.

Kolon ve rektum gastrointestinal sistem adı da verilen sindirim sisteminin parçalarıdır. Kolon ve rektum kalın bağırsağı oluştururlar. Kalın bağırsağın büyük kısmını oluşturan kolon yaklaşık 1,5 metre uzunluğunda kaslardan oluşan bir tüp şeklindedir. Kolon, çekum, çıkan kolon, hepatik fleksura, transvers kolon, splenikfleksura, inen kolon ve sigmoid kolon adı verilen yedi farklı kısımdan oluşur. Rektum ise kalın barsağın son 15 cm'lik kısmıdır. Sigmoid kolondan sonra başlar ve anüsde sonlanır. Alınan gıdalar, ince barsaklarda sindirim ve emilimden geçtikten sonra, kalan içerik kolona geçer, burada da içindeki su ve tuz emilir. Geriye kalan içerik ise ilerleyerek sindirim sisteminin son kısmı olan rektuma ulaşır ve burada anüsten dışarı atılana kadar depolanır.

Kolorektal kanser, gelişmiş ülkelerde en yüksek insidans ve en yüksek ölüm oranına sahip neoplazmalardan biridir. Şu anda, bu hastaların sınıflandırma, prognostik ve tedavi sistemleri, yalnızca ve münhasıran, böyle karmaşık bir hastalığın tüm heterojenliğini yansıtamayan klinik ve patolojik kriterlere dayanmaktadır. Bu gerçek, deneklerin aynı aşamada sınıflandırılmasına, hastalıkta gelişmesine veya aynı tedaviye farklı yanıt vermesine neden olur.

İnsan genomunun sıralanması ve mikrodiziler gibi büyük analiz tekniklerinin ortaya çıkması, bu hastalığın moleküler karmaşıklığının küresel ve etkili bir şekilde ele alınmasına izin vererek, meme kanseri gibi bazı durumlarda hastalardan klinik tedavi için etkili araçlar sağlamıştır. Bu öncülleri dikkate alarak, hedefleri aşağıda ayrıntılı olarak verilen bu çalışmayı gerçekleştirmeyi düşünüyoruz:

• Bu çalışmanın amacı, Iraklı Hastalarda kolorektal kanser ve biyolojik yönetimi hakkında genel bir anlayış geliştirmektir.

• Birinci bölümde, kolon ve rektumun anatomisi hakkında kısa hatırlatmalar yaptıktan sonra, dünyada ve Irak'ta iyi tanımlanmış sıklık ve vakalar vererek bu kanser türünün bir halk sağlığı sorunu olarak önemini tartışacağız. Daha sonra kolorektal karsinojenezin hem moleküler bir süreçle (gen mutasyonlarının ilerleyen birikimi) hem de morfolojik bir süreçle bağlantılı olduğunu gösterdik.

• Bu çalışma aynı zamanda başarılı bir teşhisin dayandığı klinik, immünokimyasal, radyolojik, anatomopatolojik ve biyolojik incelemeleri de kapsamaktadır. Ek olarak, seçimi sadece teşhis sırasındaki kanserin evresi ve boyutuna değil, aynı zamanda hastanın genel sağlığına da bağlı olan terapötik olanaklar gösterilerek tedavi de dikkate alındı.

• İkinci bir bölüm, esas olarak kolorektal kanserde doğrudan veya dolaylı olarak yer alan farklı biyolojik belirteç türlerini, bunların belirleme yöntemlerini ve bunların tarama, tanı, bir tedavinin etkinliğini izleme ve nükslerin saptanmasındaki klinik kullanımlarını incelemek için gerçekleştirilmiştir.

• Bağdat Hastanesi laboratuvarında örneklenen hastalarda kolorektal kanserde Karsinoembriyonik antijen (CEA) gibi tümör belirteçlerinin plazma seviyesindeki varyasyonu belirlemek.

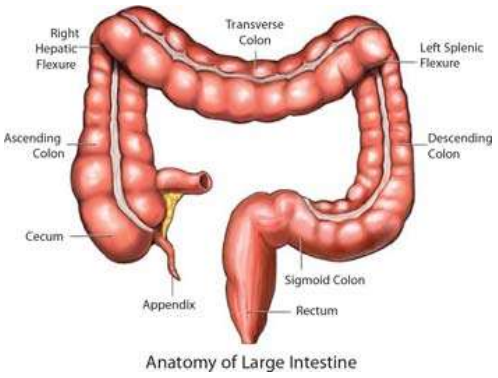
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Sindirim Sistemi Anatomisi

Sindirim sistemi, ağız, yemek borusu, mide, ince bağırsak ve kalın bağırsaktan oluşan karmaşık bir sistemdir. Ana işlevi, gıdanın sindirilmesi ve içerdiği farklı besin maddelerinin emilmesinin yanı sıra artık malzemenin (dışkı) boşaltılmasıdır.

Kalın bağırsak, sindirim sisteminin son bölümüdür. Yaklaşık 1,5 metre uzunluğundadır ve ince bağırsağın ucundan anüse kadar uzanır.

Kalın bağırsağın ilk kısmı (Şekil 2. 1), ince bağırsağın boşaldığı ve çekum olarak adlandırılan, karnın sağ alt kısmında yer alır. Oradan kolon, karaciğer bölgesine (yükselen kolon) yükselir ve karından (enine kolon) geçer. Kolon daha sonra, rektuma ve son olarak anal sfinkter yoluyla dışarıya açılan anüse, dışkıların atıldığı sigma adı verilen bir alana ulaşana kadar, aşağıya doğru inen kolon adı verilen aşağı doğru yönlendirilir.



Şekil 2.1 Kalın Bağırsağın Anatomisi

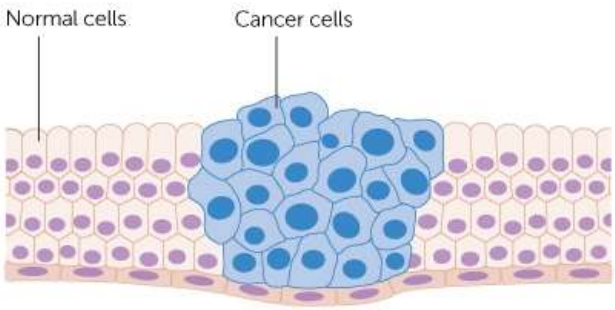
Yükselen ve enine kolonun spesifik işlevi, su ve elektrolitleri (sodyum, potasyum, vb.) Emmek iken, inen ve rektum kolonun işlevi dışkı maddesini anüsten dışarı atılana kadar depolamaktır.

Hem kolon hem de rektum birkaç doku katmanından oluşur, en içte mukozadır ve submukoza ile çevrelenir, kas tabakası dışarıda bulunur (kasılması sindirim sisteminin içeriğinin ilerlemesini sağlar) sırayla serosa (en dıştaki katman) ile kaplıdır.

Mukozada mukus üreten bezler vardır, bunlar içinde en sık malign tümörlerin görüldüğü yerdir.

2.2 Kanser

Organizmamız, yalnızca mikroskopla görülebilen, önceden yaşlanmış veya ölmüş olanların yerini almak ve böylece farklı organların bütünlüğünü ve doğru çalışmasını sağlamak için periyodik ve düzenli olarak bölünen bir grup hücreden oluşur.



Şekil 2.2 Kanser Hücresinin şematik gösterimi

Bölünme süreci, hücreye ne zaman bölünmeye başlayacağını ve ne zaman duracağını söyleyen bir dizi kontrol mekanizması tarafından düzenlenir. Bir hücrede bu kontrol mekanizmaları değiştirildiğinde, hücre ve onun soyundan gelenler, sonunda bir tümöre veya nodüle yol açacak olan kontrolsüz bir bölünme başlatır. Bu tümörü oluşturan hücreler diğer organları istila etme ve yok etme kabiliyetine sahip olmadığında iyi huylu tümörlerden bahsediyoruz. Ancak bu hücreler, kontrolsüz büyümenin yanı sıra yeni değişikliklere uğrayarak çevredeki doku ve organları istila etme (infiltrasyon) ve vücudun diğer bölümlerinde hareket etme ve çoğalma (metastaz) yeteneği kazandığında, buna kötü huylu tümör denir, biz buna kanser diyoruz.

Hastalığın evrimi, birbiriyle etkileşime girecek çok sayıda faktöre bağlıdır. Bu faktörler hem tümöre hem de hastaya göre değişir. Sizinle aynı tümör olmasına rağmen, kendinizi başka bir kişiyle veya elde ettiğiniz bilgilerle karşılaştırmamalısınız, bunun sizinki ile tam olarak aynı olması gerekmediğini ve evrimin büyük ölçüde değişiklik gösterebileceğini unutmamak önemlidir.

2.2.1 Kolorektal kanser

Kötü huylu tümör kolon veya rektuma yerleştiğinde, kolorektal kanserden bahsediyoruz.



Şekil 2.3 Kolorektal Kanserin şematik gösterimi

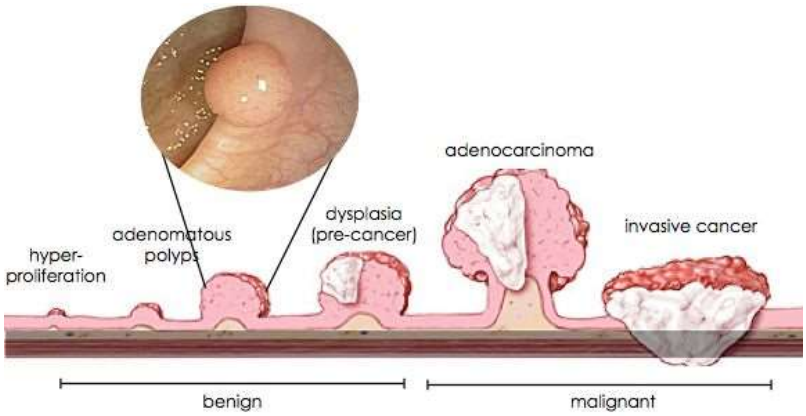
Normal bir ilk hücrenin dönüşümünden tespit edilebilir bir kanserin ortaya çıkmasına kadar, genlerde birden fazla değişiklik içeren bir süreç olduğu için uzun yıllar alır.

İnsanlar genellikle kolorektal kanser hakkında konuşsalar da, bu terim çok farklı davranışlara sahip kolon kanseri ve rektal kanserİ olmak üzere iki tümörü kapsar.

Kolorektal kanserlerin çoğu, kolon veya rektum mukozasında yıllar önce var olan ve üzerindeki farklı ajanların etkisiyle zamanla kötü huylu bir tümöre dönüşen bir polip üzerinde görülür.

2.3 Polipler

Polipler, kolon ve rektumun astarında görülen küçük iyi huylu tümörlerdir. Genellikle 50 yaşın üzerindeki insanlarda oldukça sık görülür.



Şekil 2. 4. Polipler

Bir polip mikroskop altında incelendiğinde, birkaç farklı tipleri olduğu görülebilir:

- Hiperplastik: poliplerden en sık görülendir ve kötü huylu değildir.

- Enflamatuar: Daha öncekiler gibi, kötü huylu olma kapasiteleri de yoktur.

- Adenomatöz: Bu polipler, boyutlarına ve sayılarına bağlı olarak malignite potansiyeline sahiptir.

Not: Adenomatöz poliplerin hepsi kötü huylu değildir, sadece% 10'u kötü huyludur.

2.3.1 Poliplerin tedavisi

Genel olarak poliplerin tedavisi kolonoskopi sırasında çıkarılmasından (polipektomi) oluşur. Çıkarıldıktan sonra, mikroskop altında analiz edilmek üzere, polip hücrelerinin malignizasyonu gibi bir dizi önemli veriyi sağlayacak olan Patolojik Anatomi servisine gönderilirler. Bu durumda polipin temeli değerlendirilmelidir (polip, kolon veya

rektumun duvarına yapıştığı alan).Söz konusu bölgede herhangi bir anormal hücre gözlenmiyorsa polip tedavisi sona ermiştir aksi takdirde polipektomi yeterli olmaz ve uzatılması gerekir.

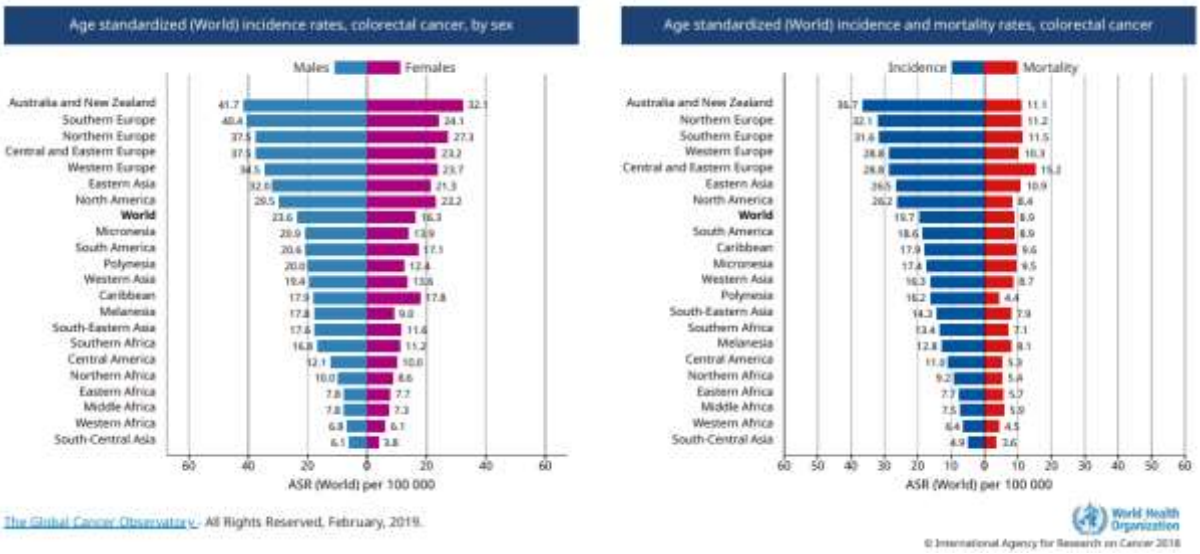
2.4 Kolorektal Kanser (CRC) Epidemiyolojisi

CRC, önümüzdeki on yıllar için artan bir projeksiyon ve endişe ile dünya çapında en yüksek insidans ve ölüm oranına sahip tümörlerden biridir.

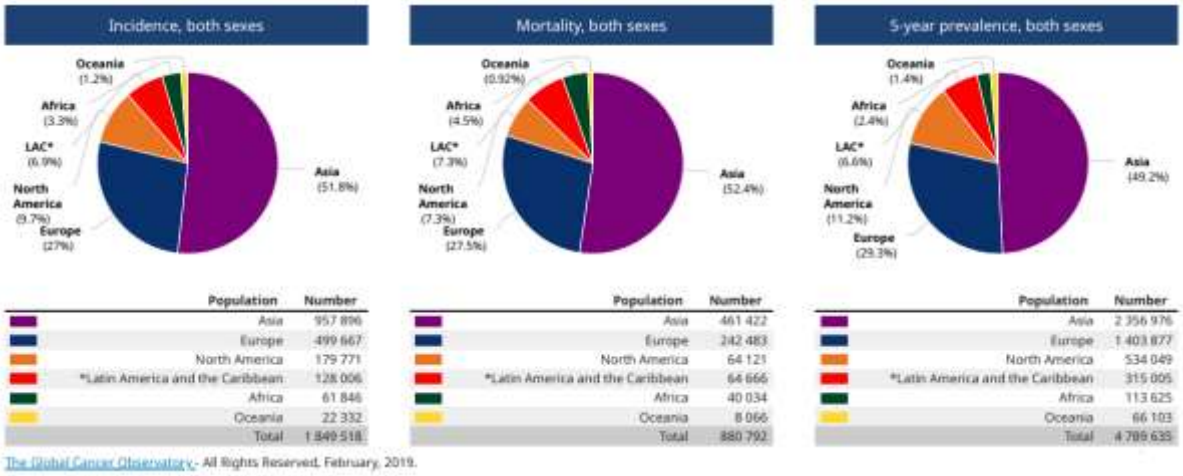
Kolorektal kanser (CRC), kalın bağırsakta bulunan tüm tümörlere karşılık gelir ve bu nedenle bu tümörler ileoçekal kapaktan rektuma yerleşebilir. Dünya çapında, her yıl yaklaşık olarak bir milyon yeni kolorektal kanser vakası ve yarım milyon ölüm gerçekleşmekte olup, kabaca dünya ölüm oranı 8.1 / 100.000 kişidir; en gelişmiş bölgeleri etkileyenler (25.1 / 100.000 nüfus), en az gelişmiş bölgelerde ise oran önemli ölçüde daha düşüktür (3.9 / 100.000 nüfus). Irak'ta, son yıllarda, şu anda kanserden dördüncü ölüm nedenini oluşturan CRC insidansı ve ölüm oranlarında bir artış gözlenmiştir. Irak gibi Arap ülkelerinde, her yerde olduğu gibi, kolon ve rektum seviyesinde bulunan kolorektal kanserler, sindirim kanserlerinin en sık görülenleri olup, üçüncü ölüm nedenini oluşturmaktadır. Erkeklerde kolorektal kanser akciğer ve prostat kanserini takip eder ve kadınlarda meme ve rahim kanserinden hemen sonra ortaya çıkar. Şekil 2.5'te dünya çapında öngörülen yaşa göre standartlaştırılmış seviyeler gösterilmiştir. Şekil 2.6' da ise 2018'de erkek olayları, CRC, dünya genelinde bildirilen yaşa göre standartlaştırılmış seviyeler göülmektedir (Ban Jasim *et al.* 2015; Al-Bayati *et al.* 2009).

Dünyadaki en yüksek kolorektal kanser insidansı Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya / Yeni Zelanda, Batı Avrupa ve Japonya'da, özellikle erkeklerde görülmektedir. Güney Amerika'da görülme sıklığı orta olma eğilimindedir ve Afrika ve Asya'da düşüktür. Kolorektal kanser insidansı, daha önce düşük bir insidansı olan ülkelerde (genel olarak Japonya ve Asya) artarken, yüksek insidansa sahip ülkeler stabilize olma (Batı ve Kuzey Avrupa) veya zaman içinde azalma (Amerika Birleşik Devletleri) eğilimi göstermektedir. Kolorektal kanser, dünya genelinde her iki cinsiyette

de en sık görülen üçüncü kanserdir, ancak gelişmiş ülkelerde ikinci sıradadır. Poliplerin incelenmesi ve erken rezeksiyonu nedeniyle, kolorektal kolon insidansı 1985'ten beri azalmıştır. Genel olarak, beş yıllık sağkalım bölgeye göre değişir; Amerika Birleşik Devletleri'nde % 65, diğer gelişmiş ülkelerde % 55, Sahra Altı Afrika'da % 14 ve gelişmekte olan ülkelerde % 39. 2002'de erkeklerde kolorektal kanser, 550.465 yeni vaka ile dünya çapında neoplazmalarda dördüncü sırada (akciğer, prostat ve mide kanserinden sonra); kadınlarda ise 472.687 yeni vaka ile üçüncü sırada (meme ve serviks kanserinden sonra) yer aldı. Kolorektal kanser, beyaz, siyah, Asyalı / Pasifik Adalı ve Alaska Yerli Kızılderililerinde kanser ölümlerinin üçüncü önde gelen nedenidir ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Hispanik erkeklerde kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedenidir. Amerikalı kadınlarda kanserden ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir.



Şekil 2.5 Dünya çapında öngörülen yaşa göre standartlaştırılmış seviyeler



Şekil 2.6 2018'de dünya genelinde erkek olayları, CRC için bildirilen yaşa göre standartlaştırılmış düzeyler

2.4.1 CRC doğal tarih

İnsanlar genellikle kolorektal kanser hakkında konuşsalar da, bu terim çok farklı davranışlara sahip iki tümörü kapsar: kolon kanseri ve rektum kanseri. Kolorektal kanserlerin çoğu, kolon veya rektumun mukozasında önceden var olan bir polip üzerinde görülür ve bu polip, üzerindeki farklı ajanların etkisiyle zamanla kötü huylu bir tümöre dönüşür.

Polipler, kolon ve rektumun astarında görülen küçük iyi huylu tümörlerdir. Genellikle 50 yaşın üzerindeki popülasyonda oldukça sık görülür. CRC'de iki karsinogenez modeli vardır. Bunlar baskılayıcı yol veya kromozomal kararsızlık (klasik) ve mutant yol veya mikro uydu kararsızlığı (alternatif) dır. Klasik yol, 1990 yılında Fearon ve Volgestein tarafından tanımlanan Adenoma - Karsinom ilerleme modelidir. Mutant yol, genellikle DNA'daki hataların onarımından sorumlu olan genlerdeki mutasyonlarla karakterize edilir, etkisiz hale getirilir ve genetik materyalde çok sayıda mutasyon oluşumuna yol açan birçok hata ortaya çıkar. En sık görülen mutasyonlar şunlardır: APC%60, p53%70, DCC%70, KRAS%40 ve BAX%50. İnsan genomu bilgisindeki yeni ve hızlı ilerlemeler, kanserlerin genetik kökeninin daha iyi anlaşılmasına yol açmıştır. Kesinlikle kanser bir DNA hastalığıdır ve genetik değişikliklerin ve daha özel olarak hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol oynayan genlerin birikmesinden kaynaklanır. Tüm bu olaylar,

klasik karsinogenez modeline yol açar. Kolorektal kanserin biyolojik yönetimi, adenokarsinomların saptanmasında biyolojik belirteçlerin kullanımının avantaj ve sınırlarını, bunların teşhisini ve bu kanserli hastaların kanser tedavisi öncesinde, seyrinde ve sonrasında izlenmesini değerlendirmek için çok sayıda çalışmalara konu olmuştur.

2.4.2 Irak'ta kolorektal kanser durumu

2017'de yayınlanan en son DSÖ verilerine göre, Irak'ta kolorektal kanserden ölümler 1.015'e (tüm ölümlerin % 0.58'i) ulaşmıştır. Yaşa göre ölüm oranı 100.000 kişi başına 5,79'dur (Iraqi Cancer Board. 2012).

Kolorektal kanser Irak halkı arasında en sık görülen 7. kanserdir, 60 yaş üstü erkekleri etkiler ve çoğu ileri aşamada sol taraflı tümörler ve kötü farklılaşma ile karşımıza çıkmaktadır (Iraqi Cancer Registry Center, Ministry of Health, 2015)

Irak'tan önceki çalışmada da benzer sonuçlar bildirilmiştir (Al-Bahrani *et al.* 1980). Irak'ta kolorektal kanserde birkaç tanımlayıcı çalışma yapıldığında, kolorektal kanser düşüktü ancak son birkaç yılda artış göstermiştir (Al-Jenabi *et al.* 2019) Irak'ta bildirilen ilk kolorektal ve özofagus kanseri insidansı, 1979 ve 1980'de Al-Bahrani ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (Al-Bahrani et al. 1980; Abdulmawjood Faris *et al.* 2019). Irak'ta düşük kolorektal kanser sıklığı ve yüksek oranda özofagus ve mide kanseri olduğunu bildirmiştir. Bu arada, 2008'deki Al-Humid çalışmasında, 1965'ten 1994'e kadar kolorektal kanser teşhisi konan 511 hasta olduğunu bildirdirmiştir (Alhilfi *et al.* 2019). Irak'ta kolorektal kanserle ilgili tanımlayıcı araştırmalar yaş, cinsiyet, belirtiler ve semptomları içeriyordu ve Irak'ta kolorektal kanser arttı. Orta yaştaki hastalar en yüksek yüzdeyi sundu (Bardelli *et al.* 2019). Kolorektal hastalara kanser ve kabızlık ve rektum başına kanama gibi semptomlar hakkında eğitim verilmelidir. Kolorektal karsinom, Misan popülasyonunda en sık görülen Gastrointestinal Sistem (GİT) kanseridir (National Cancer Institute 2019) Orta yaşlı gruplar, kolorektal kanser için yaygın yaşlardır. 30 yıllık dönemde (65-94) Irak Kanser Kayıt Merkezinde yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, kolorektal kanser insidansının %25'ten %50'ye ve mide kanserinin %78'den %50'ye düştüğünü göstermiştir. Irak'ta kolorektal kanser görülme

sıklığı, gelişmiş ülkelerde %6-13 ve sanayileşmiş ülkelerde %17-51.1'e kıyasla %2.6'dır.

2.4.3 Kolorektal kanser belirtileri

Tüm kötü huylu tümörler gibi, kolorektal kanser de kalın bağırsak içindeki konumuna bağlı olarak değişebilen bir dizi semptom üretir. Bunlar:

i. Dışkıda kan: Kolorektal kanserin en sık görülen semptomlarından biridir. Rektum, sigma ve inen kolon tümörlerinde daha sık görülen kırmızı kan veya melena olarak da adlandırılan siyah dışkıya neden olan dışkı ile karışan siyah kan olabilir.Belli bir kanama süresinden sonra ve kanama tespit edilmediğinde veya tanı ve tedavi için doktora başvurulmadığında genellikle az veya çok üretebilen anemi ve nefes darlığı, yorgunluk, çarpıntı, baş dönmesi gibi belirtiler ortaya çıkar.Bu semptomun aralıklı olabileceğini unutmamak gerekmektedir. Başka bir deyişle, bir polip veya kanserin her gün kanaması gerekmez. Sadece birkaç gün sürse bile herhangi bir anal kanama konusunda doktorabaşvurmak tavsiye edilmektedir.

ii. Bağırsak hareketlerinin ritminde değişiklik: Daha önce normal bağırsak ritmi olan kişilerde ishal veya kabızlık görülür, ancak çoğu zaman kabızlık dönemleri ishal dönemleri ile serpiştirilir.

iii. Daha dar dışkı: Bu genellikle tümörün bağırsağı daraltması ve dışkının normal şekilde geçişine izin vermemesi nedeniyle oluşur.

iv. Tenesmus veya eksik tahliye hissi: Genellikle rektumda veya sol kolonda bulunan tümörlerde görülür.

v. Karın ağrısı: Genellikle sık görülen bir semptom olmakla birlikte genellikle spesifik olmayan bir ağrıdır. Tümör bağırsak tüpünün çapını kısmen kapattığında kolik benzeri bir karın ağrısı üretilir. Kapatma tamamlandığında kabızlık ve kusma eşlik eder.

vi. Belirgin bir neden olmaksızın aşırı yorgunluk veya kilo kaybı: Bunlar, aralarında tümörlerin de bulunduğu belirli hastalıklarda sıklıkla ortaya çıkan genel ve spesifik olmayan semptomlardır.

2.4.4 Kolorektal kanser tanı

Kolon veya rektumda olası bir yaralanma şüphesine yol açabilecek semptomlar olduğunda, doktor teşhisi belirlemek için bir dizi test istemektedir.

Öncelikle hastadan verilerin toplandığı bir klinik öykü hazırlanıp ve daha sonra kişinin genel durumunu değerlendireceği bir fizik muayene yapılmaktadır. Dijital rektal muayeneyi içeren bu muayene, genellikle hasta yukarıda açıklanan semptomlardan herhangi birini bildirdiğinde yapılır.

Parmakla rektal muayene, anüsün ve rektumun bir kısmının manuel muayenesini içerir. Doktor bir eldiven giyer ve parmağı nazikçe anüsten kaydırmak ve bölgeyi keşfetmek için kayganlaştırıcı kullanır.

Rahatsız edici bir test olmasına rağmen, genel olarak ağrılı olmadığını bilmeniz önemlidir. Başlamadan önce derin bir nefes alıp ve dikkatinizi olanlardan uzaklaştırmaya çalışmak gerekmektedir. Kaslarınıza sahip olmak için ne kadar rahatlarsanız, test daha hızlı ve kolay olmaktadır.

Ancak dijital rektal muayene doğru tanıya ulaşmak için yetersizdir, bu nedenle kolonoskopi yapılması gerekir:

Kolonoskopi, anüsten sokulan uzun, esnek bir tüp (endoskop) aracılığıyla tüm kolonun ve rektumun mukozasını görmenizi sağlayan bir testtir. Aynı performans için kişinin en az 2-3 gün ve testten bir gün önce müshil kullanması için özel bir diyet uygulaması gerekir, böylece hem kolon hem de rektum dışkı içermez ve mukozayı engel olmaksızın gözlemleyebilir.

Kolonoskopi sırasında bir kitle veya değiştirilmiş bir alan gözlenirse, o bölgeden bir numune alınacak (biyopsi) ve daha sonra mikroskop altında incelenecektir;

Anormalliğin kanserden mi yoksa başka herhangi bir iyi huylu süreçten mi kaynaklandığını belirlenecektir.

Kolonoskopi sedasyon altında bir hastanede (hasta uykuda değil, rahatlamış hissediyor ve ağrı algılamıyor), sindirim kanalının şişmesinden kaynaklanan rahatsızlıkların endoskop içine sokulmasıyla önlenecek şekilde yapılmaktadır. Sedasyon kullanımı daha sık hale gelse de sedasyon yapılamayabilir. Bu durumda, testin neden olduğu rahatsızlığı azaltan bir dizi gevşeme egzersizine başlanması önerilmektedir.



Şekil 2. 7 Kolonoskopi Aleti

2.4.5 Kolorektal kanser tipleri

Kötü huylu kolorektal tümörlerin büyük çoğunluğu, polipler veya iltihaplı hastalıklar gibi mukozalarında mevcut lezyonlar üzerinde gelişir. Sağlıklı mukozada görülen kanser olağan üstü olarak kabul edilmektedir. Kötü huylu hücrelere mikroskop altında bakarsak, kolorektal kanserler çeşitli tiplerde olabilir. Bunlar arasında kolon ve rektumun içini örten bezlerde meydana gelen adenokarsinom görülme sıklığı ile öne çıkmaktadır. Vakaların% 90-95'inde görüldüğü için en sık görülen kanser türüdür.

Çok daha az sıklıkta da olsa ortaya çıkabilecek diğer tümörler şunlardır:

i. Sarkomlar: Sindirim sisteminin bağ dokusunun tümörleri.

ii. Lenfomalar: mide ve bağırsak savunma hücrelerinin kanseri.

iii. Karsinoid tümörler: sindirim sistemindeki hormon üreten hücreler.

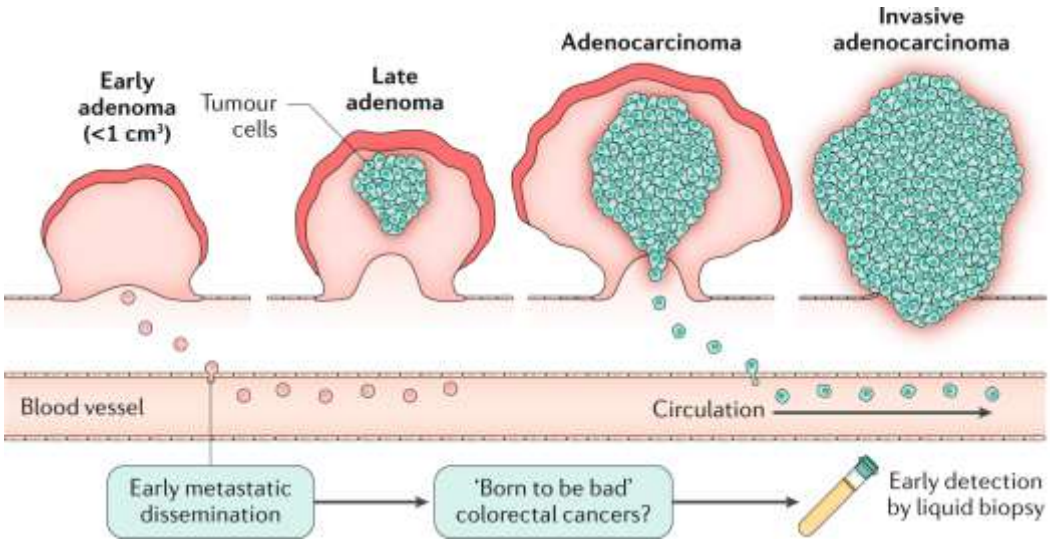
iv. Melanomlar.

2.4.6 Kolon kanseri evrimi

Kanserin ortaya çıkmasının ilk adımı, çoğu durumda ve diğer bölümlerde tartıştığımız gibi, bir polipin varlığıdır.

Bu polipin malignizasyonu, yerinde karsinomaya ilerlemek için daha önemli değişikliklere (orta ve şiddetli displazi) ilerleyebilen minimal bir hücre değişikliği (hafif displazi) ile başlayan iyi tanımlanmış adımları takip eder,(değişen hücreler mukozanın en yüzeysel kısmında bulunur) ve daha sonra kolon veya rektumun (invazif karsinom) duvarını istila eder.

Bu süreç yavaştır ve 10 ila 15 yıl sürebilir.



Şekil 2.8 Kolon Kanseri Evrimi (Magri et al. 2019)

Kolorektal kanser 3 şekilde büyür veya yayılır:

Lokal büyüme: Tümörün lokal uzantısı, esas olarak, derinlemesine büyüdüğü, sindirim sisteminin duvarını oluşturan tüm katmanları istila ettiği, yani mukozadan serozaya, submukoza ve kas katmanlarından geçerek büyüdüğü için oluşur. Tümör bağırsağın tüm duvarından geçtikten sonra, karın içinde bulunan herhangi bir organı istila edebilir. Rektal tümörlerde cinsiyete, sakral kemiğe ve onu çevreleyen yağa bağlı olarak mesaneyi, prostatı veya vajinayı etkileyebilir.

Lenf düğümü yayılması: Kolorektal kanser bölgedeki lenf düğümlerine lenf yoluyla yayılabilir. Bu yayılma büyük ölçüde tümörün bağırsak duvarına nüfuz etmesine, büyüme hızına ve hastalığın gelişme süresine bağlıdır.

Hematojen yayılma: Tümör hücreleri kan dolaşımına geçer ve kan yoluyla sindirim sisteminden uzaktaki diğer organlara ulaşabilir. Bu süreç tümörün penetrasyonuna, lenf nodu tutulumuna ve saldırganlığına bağlıdır.

Kolorektal kanserde en çok etkilenen organ karaciğerdir ve oradan akciğer, kemik ve beyne yayılabilir.

Kolon veya rektal kanser teşhisi konduğunda, hastalığın diğer organlara yayılıp yayılmadığını veya tersine, sindirim sisteminin sadece o kısmını etkileyip etkilemediğini belirlemek için başka testler yapılmalıdır.

Bu çalışma, mümkün olan en iyi yaşam kalitesi ile yeterli tümör kontrolünü sağlayan tedavi dizisinin doğru bir şekilde planlanmasına izin verir.

Genellikle gerçekleştirilen testler:

- Kan testleri: Böbrek veya karaciğer gibi farklı organların işleyişini değerlendirmeye yardımcı olur. Aynı şekilde tümör belirteçlerinin (tümör aktifken kanda artabilen maddeler) değerleri ölçülebilir.

Bu belirteçler (CEA ve Ca.19. 9) genellikle tedaviden sonra tümörün izlenmesine yardımcı olan testler olarak kullanılır. Yükseldiklerinde, yeniden ortaya çıkıp çıkmadığını değerlendirmek için tam bir çalışma yapılması tavsiye edilir.

- Göğüs radyografisi: Amacı, akciğerleri incelemek ve metastatik tutulumu dışlamaktır.

- Abdominal, pelvik ve torasik bilgisayarlı aksiyal tomografi (CAT veya Scan): Tümör bölgesinin ve akciğerlerin durumunu doğru bir şekilde değerlendirmeye izin verir.

- Abdominal ultrason: Ultrason, esas olarak karaciğerin durumunu değerlendirmek için kullanılan ağrısız, uygulaması kolay bir testtir.

Genellikle cerrahi müdahale sırasında cerrah karaciğeri inceler ve böylece çalışmasını tamamlar. Rektum kanseri durumunda, bir endorektal ultrason gerçekleştirilebilir (rektum içinde yapılan ultrason), bu da tümörün boyutunun, derinlikteki tutulumunun ve tümörün diğer yakın organlara olası genişlemesinin görselleştirilmesini sağlar.

2.5 Biyokimyasal İşaretçiler

2.5.1 Tümör belirteçleri

Tümör belirteçleri (TM), kanserin varlığına yanıt olarak veya bazı iyi huylu durumlar ve patolojilerde kanser hücreleri tarafından veya vücudun diğer hücreleri tarafından üretilen maddelerdir. Çoğu TM, kanser olduğunda çok daha yüksek seviyelerde üretilmesine rağmen, hem normal hücreler hem de tümör hücreleri tarafından üretilir. Bu maddeler kanserli hastalarda diğerlerinin yanı sıra kanda, idrarda ve assit veya plevral sıvıda bulunabilir. Bunların çoğu proteindir. Klinik kullanım için birçok TM olmasına rağmen, burada en iyi bilinen ve ortamımızda en yaygın kullanılanlara atıfta bulunacağız. Bu bölüm, ana onkolojik kılavuzlar (dışkı, doku ve serolojide) tarafından önerilen ana tümör belirteçlerinin tıbbi literatürünün (PubMed) gözden geçirilmesi olmayı amaçlamaktadır. Şu terimlerle bir araştırma yapıldı: Tümör belirteçleri veya tümör biyobelirteçleri ve kolorektal kanser veya kolon kanseri.

2.5.2 Tümör belirtecinin tanımı

Bir TM, tümör hücreleri tarafından veya tümöre yanıt olarak vücudun kendisi tarafından üretilen, varlığı serumda veya diğer biyolojik sıvılarda tespit edilebilen ve tümör

büyümesini veya aktivitesini yansıtan ve varlığın bilinmesine, evrimine veya gelişimine ve kötü huylu bir tümörün terapötik yanıtına izin veren herhangi bir maddedir (Koga *et al.* 2010).

Bu nedenle, TM'ler bir neoplazm varlığının uzak göstergeleri veya işaretleri olarak davranır. Ne yazık ki, bu belirteçler neoplazmalara özgü değildir ve çok sayıda tümör dışı fizyolojik veya patolojik durumda kayda değer konsantrasyonlar bulunabilir. Bu nedenle, dikkate alınacak ana veriler TM'deki nicel değişiklik olacaktır. Alarm sinyali, konsantrasyonlarında anormal artışlar olduğunda görünür (Duffy MJ 2001). Bir yandan, belirteçlerin çoğu bir tümör türüne özgü değildir; İkinci olarak, aynı kanser türüne sahip tüm hastalar, o tümörle ilişkili belirli bir markörün yüksek seviyesini göstermez. Son olarak, bilinen tümör belirteçlerinin herhangi birinin yükselebileceği bazı kanser dışı durumlar vardır. Uzun bir süredir, çeşitli klinik durumlarda TM'nin sistematik olarak belirlenmesinin endikasyonları ve sonuçları hakkında literatürde çok fazla tartışma olmuştur: Ailesinde tümör patolojisi öyküsü olan hastalar, belirli bir yaştan belirli yaygın kanserler için popülasyon taraması veya genellikle yapısal sendrom olarak bildiğimiz klinik süreçleri olan hastalar (asteni, anoreksi, kilo kaybı). Ancak tüm araştırmalara ve bu konuda yayınlanan tüm araştırmalara rağmen tartışma henüz kapanmamış ve bazı tümör türlerinde olanlar dışında TM kullanımı için endikasyonları toplayan klinik kılavuzlar hazırlanmamıştır.

Bu derlemede, klinik uygulamamızda kullanılan belirteçleri ve belirli tümörler için üzerinde mutabık kalınan bazı önerileri gözden geçirmeyi öneriyoruz. Son 25 yılın literatürünü gözden geçirdiğimizde, bu konuda üzerinde çalışılan her şeye rağmen, ana tavsiyelerin değişmediğini görmek şaşırtıcı.

Tıbbın diğer pek çok alanında olduğu gibi, sihirli bir reçete yoktur ve bazı tümör türlerinin saptanması, teşhisi ve tedavisine yardımcı olabilmesine rağmen, her durumda, bunu unutmadan, bireyselleştirmek gerekecektir. Ve asla kendi başlarına kanseri teşhis edemezler; endoskopik radyolojik testler ve biyopsiler her zaman gerekli olacaktır.

Tümör belirteci belirlemeleri için gelişigüzel ve sistematik talebin sahip olması gereken sınırlamalar dikkate alındığında, sadece ekonomik çıkarımlar nedeniyle değil, aynı zamanda bir yandan kaygı ve endişeyi artırabileceği için çok önemlidir. Diğer yandan

gereksiz tamamlayıcı testlerin yapılması daha fazla masrafa, bazı önemli yan etkilere ve doğru tanı ve tedavide gecikmelere neden olabilir.

2.5.3 Kolorektal kanserde tümör belirteçleri

Dışkı belirteçleri: Kolorektal kanserde, dışkı tümörü belirteçlerinin incelenmesi, son derece tanısal bir işleve sahiptir. En çok kullanılan tayin, guaiac testi veya immünolojik testlerle dışkıda saklı kandır. NCCN'ye (Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı) göre, dışkıda gizli kanın kantifikasyonu, önceden belirlenmiş bir diyetin tamamlanması sırasında elde edilen üç ardışık numunede gerçekleştirilmelidir (Lim et al. 2009). Kolorektal neoplastik lezyonlarda miR-21 ve miR-106a'nın aşırı ifadesi ve miR-promoterinin hipermetilasyonu gibi dışkıdaki farklı mikroRNA'ların değerlerini ölçmek için dışkı DNA'sının belirlenmesi için farklı çalışmalar yapılmıştır. Dışkıda 34b / c, kolorektal kanserli hastaların %75'ine kadar mevcut tümör evresi ile korelasyon gösterdi. MiR-20a, miR-21, miR-92'nin aşırı ifadesi de dışkıda kanıtlanmıştır. miR-96, miR-106a, miR-203 ve miR-326 ve düşük seviyelerde miR-16, miR-125b, miR-126, miR-143, miR-144, miR-145, miR-320 ve miR 484 -5p.10 Koga et al. Tarafından yapılan çalışmada miR-17-92 ve miR-135 için,% 81 ve% 95 özgüllük ile sırasıyla% 70 ve% 46 duyarlılık değerleri belirlenmiştir (Páramo *et al.* 2006).

2.5.4 Doku belirteçleri

Doku belirteçleri temel olarak kolorektal neoplastik hastalığın prognozunu belirlemeyi amaçlamaktadır; bunlar şunları içerir: prognozu belirlemek ve farklı sitotoksik ajanların hedefi olarak terapötik tepkiyi tahmin etmek için ölçülen, DNA sentezinde rol oynayan bir enzim olan timidilat sentaz; bu nedenle timidilat sentazın aşırı ekspresyonu, 5-florasil tedavisine daha fazla dirençle sonuçlanır.5-florasil metabolizmasına katılan bir enzim olan dihidropirimidin dehidrojenaz ve timidin fosforilaz, kolorektal kanserde terapötik cevabın belirlenmesinde incelenmiştir (Al-Bayati *et al.* 2009).

Karsinoembriyonik antijen ilk olarak 1965'te kolorektal tümörlerin yaklaşık %90'ında eksprese edilen bir hücre içi glikoprotein olarak tanımlandı. Karsinoembriyonik antijen, fetal kolonda olduğu kadar kolon adenokarsinomunda da bulunur, ancak sağlıklı yetişkinlerin kolonunda bulunmaz, bu da bu yapıyı kolon kanserinde en yaygın kullanılan tümör belirteci haline getirmiştir (Compton *et al.*2000).

Antijen seviyeleri Karsinoembriyonal tümörler, mide, akciğer, pankreas, meme neoplazmaları veya medüller tiroid karsinomu gibi diğer patolojik durumlarda ve siroz, ülseratif kolit, pankreatit ve sigara içenler gibi tümör olmayan durumlarda yükselebilir (Gil-Bazo *et al.* 2006)

2.5.5 Diğer tümör belirteçleri

Lewis sialized antijen olan karbonhidrat antijen 19-9 (CA 19-9), karsinoembriyonik antijenden daha düşük bir duyarlılığa sahiptir. CA 19-9 konsantrasyonlarının, karsinoembriyonik antijen ve CA 19-9'un değerlerini, hastalığın ilerlemesi yeniden ortaya çıkana kadar geçen süre ve genel hayatta kalma ile ilişkilendirerek, kolorektal kanserde prognostik bir değere sahip olduğu belirlenmiştir. ASCO ve NACB, popülasyon taraması, erken tanı, evreleme, takip veya tedavinin izlenmesinde rutin çalışmalarını önermek için yeterli kanıt olmadığını ortaya koymaktadır.Benzer şekilde, CA 242, karsinoembriyonik antijeni tamamlayabilmesine rağmen rutin olarak önerilmemektedir (Perlis .2011)

2.5.6 Prognostik belirteçler

Kolorektal kanserde, hastalığın hayatta kalmasını artırmaya yardımcı olan yeni belirteçler bulma amacıyla çok çeşitli tümör belirteçleri tanımlanmıştır. Hem hastalıksız dönem hem de hayatta kalma ile ilişkili olan prognostik belirteçler ve ayrıca spesifik bir tedaviye yanıtı oluşturmak için öngörücü belirteçler tarif edilmiştir. Amerikan Ortak Kanser Komitesi'nin (AJCC) ilk sınıflandırması, hastalığın boyutunu ifade etmek, bu

hastaların tedavisinde faydalı bir yöntem sağlamak, bir prognoz oluşturmak ve sonuçları ölçme imkânı vermek için TNM sınıflandırmasını oluşturdur (Agostini *et al.* 2010)

2.5.7 Anjiyojenik belirteçler

Anjiyogenez, hastalığın prognozunda yer alan ana patofizyolojik süreçlerden biridir. Kolorektal kanser ve anjiyogenez ile koagülasyon, fibrinoliz ve plazminojen sistemi arasındaki prognostik-öngörücü ilişkiyi araştıran çalışmalar vardır (Marusyk *et al.* 2012).

2.5.8 Biyobelirteçler -CRC

Biyobelirteç çalışması yeni olmaktan çok uzak, Aslında ve 1847'de İngiliz doktor ve kimyager Henry Bence-Jones, monoklonal gammopatili hastaların idrarında Valdenström hastalıkları olarak da adlandırılan hafif bir immünoglobulin zincirinin bulunduğunu gösterdi. Böylece idrarda bu proteinin varlığı tanısal bir unsur teşkil etmekte ve oranı tedavinin etkinliğinin izlenmesini mümkün kılmaktadır. Biyobelirteçler, belirli hastalıklarla ilişkili olarak ortaya çıkan belirli proteinlerin miktarındaki değişiklikler gibi, belirli bir hastalık için ölçülebilir biyolojik göstergelerdir. Bu biyobelirteçler, doktorların bir hastalığı teşhis etmesine, evresini belirlemesine ve bir hastada nüks riskini belirlemesine ve bu nedenle en uygun tedaviyi seçmesine yardımcı olur. Kolorektal kanser durumunda, erken teşhis ve sınıflandırma özellikle önemlidir, çünkü örneğin, tüm evre II hastalar kemoterapiye ihtiyaç duymaz. Özellikle hastalığın başlangıcında nüks riski taşıyan hastaların belirlenmesi doktorlara yardımcı olabilir. Bununla birlikte, kolorektal kanser için hala çok az bilinen prognostik belirteç vardır. Kemoterapinin faydalarından yararlanmadan yan etkilerinden hala çok fazla hasta gereksiz bir şekilde muzdariptir.

Ulusal Sağlık Enstitüsüne (NIH) göre ve daha doğrusu biyobelirteçler konusunda çalışan gruba göre, bu objektif olarak ölçülebilen ve belirli bir tedaviye fizyolojik, patolojik durumu veya farmakolojik yanıtı yansıtan bir özelliktir.

NIH Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) kanserle ilgili kelimeler sözlüğünde şu tanımı veriyor:

Biyobelirteç: Kanda veya başka herhangi bir biyolojik sıvı veya dokuda bulunan, normal veya patolojik bir sürecin veya bir durumun veya bir hastalığın yansıması olan biyolojik bir molekül. Belirli bir patoloji veya durum için tedaviye yanıtın ilerlemesini izlemek için bir biyobelirteç kullanılabilir. Ayrıca moleküler belirteçler veya imza moleküller olarak da adlandırılırlar.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) onları vücutta veya ürünlerinde veya etkilerinde ölçülebilen ve bir hastalığın seyrini veya sadece varlığını tahmin etmeyi mümkün kılan herhangi bir madde, yapı veya süreç olarak tanımlar.

Klinik alanda biyobelirteçlerin uygulamaları konusunda uzun süredir çalışan bir psikiyatrist olan Roy Perlis, bir biyobelirteci, belirli bir patoloji için bir risk faktörünü veya gelişimini izlemenin bir yolunu yansıtan ölçülebilir bir bireysel özellik olarak tanımlar. Bu özellik, bir ilacın olası toksisitesini izlemek için de kullanılabilir. Her durumda, büyük bir özgüllük (ideal olarak, bir patoloji için bir belirteç) ve büyük bir hassasiyet (ölçümün gerçekleştirilmesi kolay olmalıdır) göstermelidir. Farklı uluslararası kuruluşlardan veya biyobelirteçler konusundaki uzmanlardan kaynaklanan tüm bu tanımlar, aynı konular etrafında döner ve birbirini tamamlar. Yakın zamanda doğal dergisinde (Pinsky *et al.* 1978) yayınlanan bir derlemede yazar, aşağıdaki satırlarda sunacağımız biyobelirteçlerin farklı özelliklerini gözden geçiriyor.

Teşhis biyobelirteçleri

Bu biyobelirteçler şüphesiz en çok arananlardır. Aslında bunlar, varlıkları veya yoklukları ile belirli bir patolojinin kesin teşhisini mümkün kılan biyobelirteçlerdir. Medüller tip tiroid tümörleri çok azdır, tümör gelişiminin erken evrelerinde önemli miktarda kalsitonin eksprese eder (C Faivre-Finn *et al* 2002). Benzer şekilde, bazı insanlar, Kanserli lezyonların% 90'ından fazlasında mevcut olduğu için, İnsan Papilloma Virüsünün (HPV) varlığını rahim ağzı kanseri için tanısal bir belirteç olarak kabul etmektedir. Yakın zamanda Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan bir

başka örnek, OVA1 tanı testi, proteomikler tarafından keşfedilen ve yumurtalık tümörlerinin malignitesi hakkında bilgi sağlayan beş proteinden oluşan bir panelin saptanmasına dayanır (Abdulhadi Alrubaie *et al.* 2019).

Tıbbi görüntüleme ile ilişkili biyobelirteçler

Son yıllarda, tıbbi görüntüleme hastaya daha iyi tedaviye uyum sağlamak için bir patlama yaşadı. Daha sonra anatomik, fonksiyonel ve hatta moleküler görüntüleme olabilir. Bu bağlamda başlıca iki teknoloji kullanılmaktadır: Pozitron emisyonu (PET) ve rezonans manyetik (MRI) ile görüntüleme. Böylelikle proliferasyon markörleri, örneğin, 18 F'lik bir atoma bağlanmış timidin gibi yüksek aktiviteye sahip proliferatif hücreleri işaretleyebilecek proliferasyon markörlerinin kullanılması mümkündür. Ölü hücre, bir difüzyon katsayısı (Görünen Difüzyon Katsayısı) olan ADC'nin belirlenmesinde MRI tarafından da takip edilebilir. Başkaları da var, ancak bu yaklaşımlar bu senaryoda daha ayrıntılı olarak tartışılmayacaktır.

2.5.9 CRC'lerin farklı tümör biyobelirteçleri

Kanserler, bir hastadan diğerine ve tümörün içinde özellikle heterojendir (Vilar *et al.* 2010). Öte yandan, mevcut tedavilerin çoğunun hastalarda önemli yan etkileri vardır. Ayrıca, hastaya gereksiz yere ağır komplikasyonlara neden olmamak için tedaviyi olabildiğince iyi uyarlamak gerekir. Bu bağlamda, prognostik biyolojik belirteçler devreye girerek tümörleri saldırganlıklarına göre sınıflandırmayı mümkün kılar. Kolon kanseri ile ilgili olarak, karsinoembriyonik antijenin (CEA) iyi bir nüks "vaizi" olduğu gösterilmiştir.

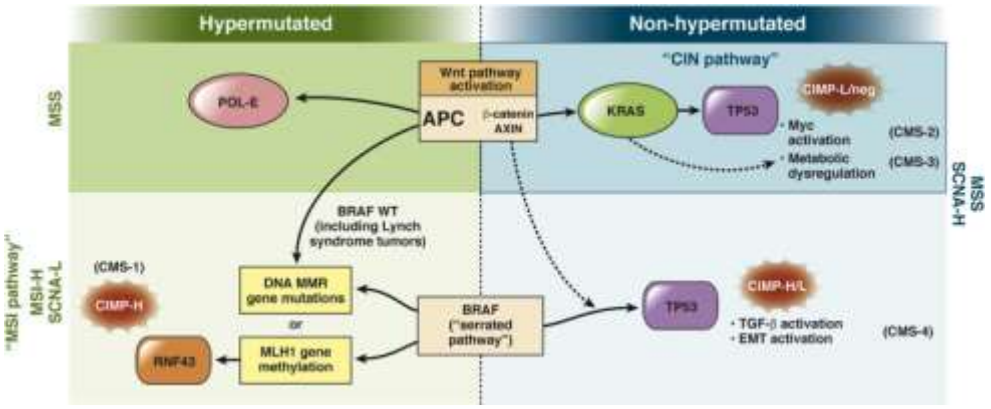
1978'de yayınlanan 358 hastayı içeren bir çalışmada, 2. ve 3. evre tümörleri olan ve ameliyat öncesi CEA seviyesi 5 ng / ml'den yüksek olanların daha yüksek bir nüks riskine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca evre 3 tümörü olan hastalar, ameliyat öncesi CEA düzeyinin 5 ng / ml'den büyük olduğu durumlarda ortalama 13 aylık nüks süresine sahipken, bu oranın bu preoperatif eşik değerden düşük olduğu ortalama 28 aydır (Roth

et al. 2012). Daha yakın zamanda yayınlanan bir çalışma, bu biyobelirtecin 2000 ile 2000 yılları arasında 1.361 hastada kullanımının değerlendirilmesini amaçlamaktadır (Popat *et al.* 2005).

Bu analizden CEA'nın kolorektal kanser için ilgili bir prognostik faktör olduğunu ortaya koydular. Ameliyat sonrası yüksek CEA seviyesine sahip hastalar daha yüksek nüks riskine sahiptir ve düzenli olarak izlenmelidir. Ayrıca önemli karaciğer metastazları geliştirme eğilimindedirler.

Göğüs kanseri için, klinisyenin karşılaştıkları tümör türü hakkında fikir edinmesini sağlayan bir kit var. Dolayısıyla bunlar, tümörün davranışını ve nasıl gelişebileceğini anlamamıza izin veren biyobelirteçlerdir.

Mikrosatellit istikrarsızlığı (IMS): IMS (veya Mikro Uydu İstikrarsızlığı için MSI), karsinojenezin 2 ana yolundan birini karakterize eder (Şekil 1.6).



Şekil 2.9 Kolorektal karsinojenezin 2 ana yolu (Vilar *et al.* 2010).

En sık dâhil olan diğer yol (CRC'lerin yaklaşık% 80'i), kromozomal instabilite yoludur (CIN veya LOH).17 ve 8 numaralı kromozomların kısa kolunda ve 18, 5 ve 22 numaralı kromozomların uzun kolunda alelik kayıplarla karakterizedir. Bu allelik kayıplar, tümör baskılayıcı genlerdeki (TP53, APC, SMAD4, vb.) Sık mutasyonlarla ilişkilidir. Böylece bu genlerin bialelik inaktivasyonuna katılır.

IMS yolu, "mikro uydu" kararsızlığının varlığı ile karakterize edilir. Mikrosatellitler, DNA replikasyonu sırasında özellikle uyumsuzluk hatalarına eğilimli, tekrarlanan DNA dizileridir. Normalde bu hatalar, MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 proteinlerini içeren MMR sistemine (Uyumsuzluk Onarımı) ait bir protein kompleksi tarafından onarılır. IMS, replikasyon sırasında meydana gelen DNA uyuşmazlıklarının onarılamamasıyla bağlantılıdır. Bu onarım kusuru, MMR sistem geninin (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 genleri) bi-allelik inaktivasyonuyla bağlantılıdır. Bu inaktivasyon, çoğunlukla MLH1 geninin promoter bölgesinin hipermetilasyonundan kaynaklanmaktadır. Onarım sistemindeki bu eksiklik, tümör kontrolünde yer alan genler (TGFßRII, BAX, TCF-4, vb.) İçinde ikincil mutasyonların birikmesine neden olur.

IMS yolu, sporadik CRC'lerin% 12 ila 15'inin oluşumunda rol oynar (Ban Jasim *et al.* 2015). Kararlı mikrosatellitli (MSS) tümörlerin aksine tümör fenotipi daha sonra IMS veya dMMR (eksik Yanlış Eşleşme Onarımı) olarak adlandırılır.

Bu karsinogenez mekanizması, bir MMR geninde yapısal bir mutasyonun varlığı ile tanımlanan bir Lynch sendromunun parçası olarak geliştirilen tümörlerde de rol oynar. Lynch sendromunun bir parçası olarak geliştirilen hemen hemen tüm tümörlerde bir SMI vardır.

2.5.10 Biyobelirteçlerin kaynakları

Literatürde salgılanan proteinler farklı kaynaklardan incelenmiştir. Varsayım, hücreler arası iletişimde veya hala büyümede hücre-hücre temaslarındaki rollerinden dolayı, bu proteinlerin verilen bir patolojinin gelişme düzeyini yansıttığını düşünmektir (Sakr *et al.* 2006). Sunumun ilerleyen bölümlerinde tekrar geleceğimiz kütle spektrometresi teknikleriyle analiz edilirler.

İlk amaçta, çabalar öncelikle kan, plazma, idrar gibi biyolojik sıvılarda doğrudan analiz yapılacaktır, ancak amniyotik sıvı, anne sütü, sperm veya tükürükten de bahsedebiliriz (Al-Jenabi *et al.* 2019).

Son günlerde, yeni araştırma kaynakları ortaya çıktı. Ekipler, bu kadar ilgilendikten sonra doğrudan ekzozomları ve zar vezikülünü proteomik olarak incelemek zorunda kaldılar. Ayrıca bazıları insanlarda veya farelerde tümör interstisyel sıvıları üzerinde çalıştı. Tümörlerin kültürel parçalarını yerleştirmek ve salgılanan proteinleri kurtarmak için neler yapabiliriz? Bir mikrodiyaliz eşdeğeri bir teknik, intratümöral bir çalışmaya izin vermek için geliştirilmiştir (Campbell *et al.* 2010). Bu çalışmaların esas olarak meme tümörleri için yapıldığı görülmektedir. Birçok yazar, kültürdeki hücreler tarafından koşullandırılan medyaya da ilgi duymaktadır. Dowling ve Clynes tarafından 2011 yılında yayınlanan bir inceleme, perakendede bu yaklaşımları sunmaktadır (Shahbaa A Al-Bayati *et al* 2019). Çalışmaların çoğunda, hücreler normal koşullarda, yani serum fetal buzağı ile bir süre yetiştirilir, daha sonra bunlar birkaç kez yıkanır ve kültür için genellikle 24 saat boyunca dana serumu tüketilir. Bu bekleme süresinin sonunda hücre kültürü süpernatanı analiz edilir.

2.5.11 Biyobelirteçlerin özellikleri

Doğru / yanlış negatifler ve doğru / yanlış pozitifler hakkında hatırlatıcılar: Biyobelirteçler, ilk bakışta ilgi ve etkinliklerini gösteren nesnel verilerle karakterize edilir. Bu veriler arasında, bir biyobelirtecin duyarlılığı ve özgüllüğü olan iki ana veriye değinmek mümkündür. Aşağıdaki satırlarda bu verilerin basit bir tanımını vermeye çalışacağız, ancak ondan önce bazı kavramlara geri dönmemiz gerekiyor.

İlk olarak, bir biyobelirteç iki tür yanıt verebilir:

Kişi hastalık olma riski altındadır.

- Kişi hastalık olma riski yoktur.

Sonra gerçeklik bizi iki koşulu da düşünmeye götürür:

- Kişi hastadır.

- Kişi hasta değildir.

Ve tüm kombinasyonlar mümkündür. Bu bizi aşağıdaki dört kavramı tanımlamaya götürür:

- Gerçek negatifler (VN);

- Yanlış negatifler (FN);

- Gerçek pozitifler (VP);

- Yanlış pozitifler (FP)

Çizelge 2.1 Doğru / yanlış negatifler ve doğru / yanlış pozitifler kavramları

Biyobelirteç Durumu	**Gerçeklik**	
	Pozitif	Negatif
Pozitif	gerçek pozitif (VP)	yanlış pozitif (FP)
Negatif	yanlış negatif (FN)	gerçek negatif (VN)

Hassasiyet: Bir testin veya biyobelirtecin hassasiyeti, doğru şekilde tanımlanan pozitif vakaların yüzdesine karşılık gelir.

$$\textbf{Hassasiyet} = \frac{\boldsymbol{VP}}{(\boldsymbol{VP} + \boldsymbol{FN})}$$

Bu şekilde, yanlış negatiflerin sayısı ne kadar düşükse, gerçek pozitiflerin yüzdesi o kadar yakın olur ve testin hassasiyeti o kadar yüksek olur.

Özgünlük: Bir testin veya bir biyobelirtecin spesifikasyonu, doğru şekilde tanımlanmış olumsuz durumların yüzdesine karşılık gelir. Bu nasıl :

$$\text{Özgünlük} = \frac{\boldsymbol{VN}}{(\boldsymbol{VN} + \boldsymbol{FP})}$$

Doğruluk: Bazı durumlarda, bir testin veya bir biyobelirtecin olumsuz ve pozitif durumları doğru bir şekilde tanımlama yeteneğine karşılık gelen farklı bir veriye gitmek ilginç olabilir. Bu verilere doğruluk diyoruz ve şu şekilde tanımlanıyor:

$$doğruluk = \frac{VN + VP}{(V\,N + V\,P + FP + FN)}$$

Bu şekilde, yanlış pozitiflerin sayısı ne kadar düşükse, gerçek negatiflerin yüzdesi o kadar yakın ve testin spesifikliği o kadar yüksek olacaktır.

2.6 Biomarker Çalışmasındaki Akademik Hedefler

• Klinikte KRK'nin tanı ve yönetiminde kullanılan biyobelirteçlerin bilinmesi

• Biyobelirteçlerin tanısal, prognostik ve terapötik etkisinin bilinmesi

• JRC biyobelirteçlerinin araştırılmasını ne zaman, hangi materyalde ve kimden talep edeceğinizin bilinmesi

• Sonuçları klinik duruma göre nasıl yorumlayacağınızın bilinmesi

Terapötik yönetimi etkileyen biyolojik belirteçler olan kolorektal kanser biyobelirteçleri (CRC) adı altında tanımlıyoruz. Bunlar serum (örn: ACE, dolaşımdaki tümör hücreleri, dolaşımdaki DNA), tümör (örn: IMS, RAS, BRAF) veya yapısal (örn: DPD, UGT1A1, FcgRIIA) olabilir. Burada sadece tümör belirteçlerini tartışacağız, bunlar JRC biyobelirteçleri içinde bugün klinik uygulamada yararlı olan baskın bir yere sahiptir.

Bu biyolojik belirteçler, kolorektal karsinojenezde yer alan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasından kaynaklanmaktadır. Aslında, CRC'ler anatomik olarak patolojik olarak homojen tümörler olmasına rağmen, moleküler biyolojideki son gelişmeler, kolorektal karsinojenezin farklı moleküler mekanizmalarını kişiselleştirmeyi mümkün kılmıştır. Günümüzde kolorektal karsinojenezin iki ana mekanizması vardır: (Yang *et al.* 2011).

• CRC'lerin yaklaşık% 80'inde kromozom dengesizliği (CIN: Kromozomal kararsızlığı veya LOH: Heterozigotluk Kaybı);

• Mikrosatellit kararsızlığı (IMS), RCC'lerin% 12 ila 15'inde rol oynamaktadır.

Yakın zamanlarda, üçüncü bir mekanizma tanımlanmıştır: birkaç genin belirli promoter bölgeleri seviyesinde DNA hipermetilasyonu ile ilişkili epigenetik kararsızlık CIMP: CpG Ada Metilasyon Fenotipi, tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel inaktivasyonunu indükler. Ancak bu 3. grup, diğer 2 gruptan tamamen özerk değildir.

Bu moleküler heterojenliğe rağmen, sinyal yollarının değiştirilmesi açısından sonuçlar yaygındır. İlgili ana sinyalleme yolları şunlardır:

• RAS / RAF / MAP Kinase rotası,

• PI3K / AKT kanalı.

Ana tümör biyobelirteçlerini, prognostik ve prediktif değerlerini ve bugün klinik uygulamadaki tanısal ve / veya terapötik uygulamalarını tanımlayarak sunuyoruz. Prognostik değer ile, herhangi bir tedaviden (hastalığın doğal seyri) bağımsız olarak biyobelirtecin etkisi kastedilirken, öngörü değeri, biyobelirtecin belirli bir tedavinin etkinliği üzerindeki etkisiyle ilgilidir.

2.6.1 Tek başına 5FU kullanarak yardımcı kemoterapi

IMS fenotip evre II-III CRC'ler, MSS CRC'lerin aksine, tek başına 5FU ile adjuvan kemoterapinin hayatta kalmasından fayda sağlamıyor gibi görünmektedir. Başlangıçta Ribic çalışması tarafından bildirilen bu veriler, hem rekürrenssiz sağkalım hem de genel sağkalım açısından, çeşitli çalışmalarda, havuzlanmış analizlerde ve meta-analizde açıkça bulundu (Thiel *et al.* 2013). Aşama II IMS CRC'lerinin tek başına 5FU ile adjuvan kemoterapisinin sadece etkisiz olamayacağı, ayrıca zararlı olabileceği ve bunun 5FU'ya direnç mekanizmalarından birinin timidilat sentaz ekspresyonunda yer alacağı öne sürülmüştür. IMS tümörlerinde MSS'den daha yüksek olabilir. Bu veriler teyit edilmeyi bekliyor. Son olarak, IMS'nin 5FU ile adjuvan kemoterapinin etkisizliği üzerindeki öngörücü değerinin IMS mekanizmasına bağlı olması da mümkündür: Sporadik IMS CRC'leri (MLH1 hipermetilasyon ile) ilgilendirir ve Lynch sendromunun

bir parçası olarak IMS CRC'leri ilgilendirmez. Bununla birlikte, klinik veriler sınırlıdır ve doğrulanması gerekir (Safaee Ardekani *et al.* 2012).

2.7 FOLFOX ile Adjuvan Kemoterapi

IMS durumunun aşağılayıcı prediktif değeri, tek başına 5FU ile adjuvan kemoterapi ile sınırlı görünmektedir ve FOLFOX ile kemoterapi ile ilgili değildir. Aslında, bir yandan FUFOL ± Oksaliplatini değerlendiren NSABP-C07 çalışması sırasında IMS durumu ile oksaliplatinin yararı arasında etkileşim yoktuve diğer yandan MOSAIC çalışmasının IMS hasta alt grubunun analizi, FOLFOX'un yararının LV2FU2'ye kıyasla devam ettiğini göstermektedir. (Flejou JF, ASCO 2013). Bununla birlikte, bu veriler incelenen az sayı ile sınırlıdır ve doğrulanması gerekir.

2.8 Klinik Sonuçlar

Bu nedenle IMS statüsü, lokalize CRC'ler alanında ve özellikle de adjuvan kemoterapinin endikasyonunun tartışıldığı, yani "yüksek risk" olarak bilinen II. Aşamaların tartışıldığı aşama II CRC'ler alanında bir etkiye sahiptir. IMS durumu çok iyi bir prognoz sağladığından (en azından BRAF mutasyonu olmayan tümörler için), IMS CRC'ler için adjuvan kemoterapi uygulanması önerilmez. Bu nedenle, TNCD açıkça şunu belirtir: "Tümörün stabil mikro uydu (MSS) veya kararsız (IMS) durumunun belirlenmesi, kötü prognoz faktörleri olan evre II kanser için ameliyat edilen bir hasta için adjuvan kemoterapi endikasyonunun belirlenmesi için gerekli hale gelmiştir".

2.8.1 IMS'yi belirleme yöntemleri

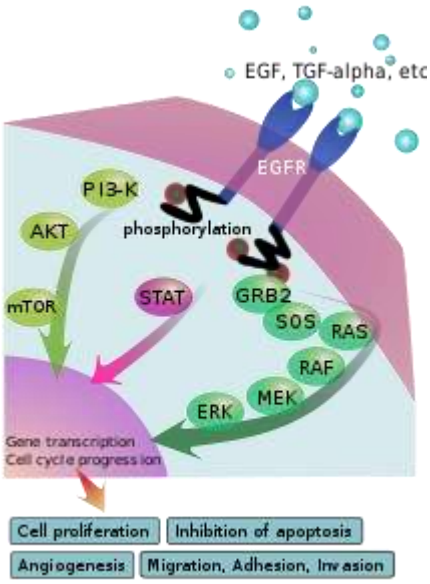
Bir tümörün IMS durumunu analiz etmek için iki olası yöntem vardır. Bu iki yöntem hem tamamlayıcıdır hem de çok iyi ilişkilidir:

- Moleküler biyoloji (PCR) ile: Bir IMS için araştırma, 5 mononükleotid yarı-monomorfik mikro uydu dizileri çalışılarak tümör DNA'sı üzerinde gerçekleştirilir. Bir IMS'nin varlığı, normal DNA ile karşılaştırıldığında tümör DNA'sının mikro uydu dizilerinin boyutunda bir farka neden olacaktır.
- •Parafin kesitlerinde immünohistokimya ile: amaç MMR sistemindeki proteinlerin ekspresyon kaybını aramaktır. MMR proteininin tümör ekspresyonundaki bir kayıp, karşılık gelen MMR genindeki bir genetik tümör değişikliğini yansıtır. Bu nedenle, moleküler biyoloji ile görselleştirilmiş IMS'den sorumlu olanla aynı MMR hatasını yansıtan bir testtir.

2.9 Sinyal kanalları

2.9.1 EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) yolu

EGF reseptörü (EGF-R) veya HER1, tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler sınıfından ve HER reseptör ailesinden (HER1, HER2 veya ErbB2, HER3 ve HER4) bir transmembran proteindir. Ligand sabitlemesini sağlayan hücre dışı bir alan, bir transmembran alan ve bir hücre içi tirozin kinaz efektör alanından oluşur (Şekil 1.7).



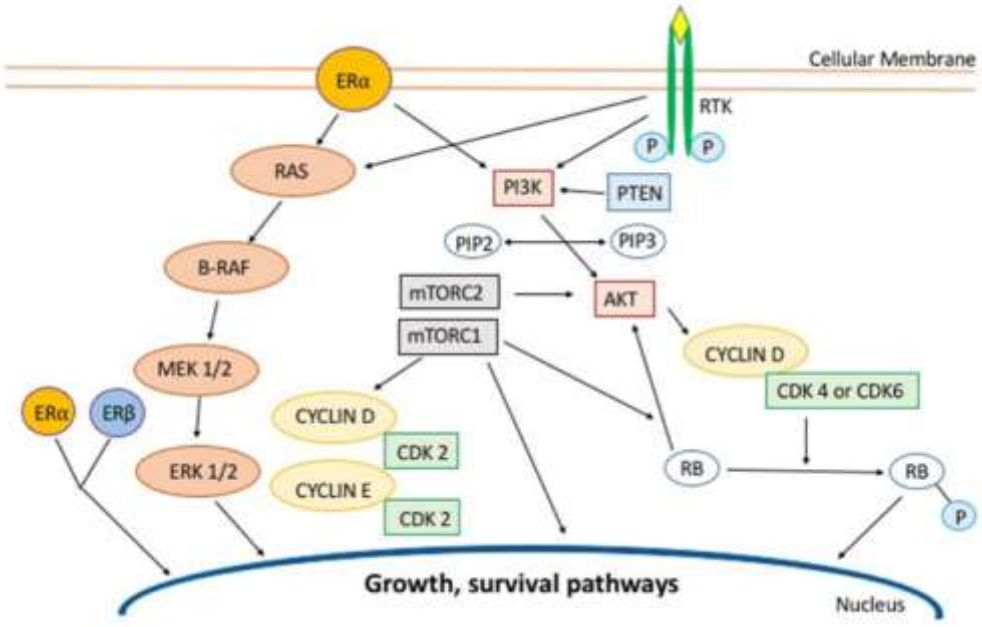
Şekil 2. 10 Reseptör EGF-R

EGF, TGFa, amfiregulin ve epiregulin dâhil olmak üzere birkaç ligand vardır. Ligandın bağlanması, reseptörün, dimerizasyonundan sonra, hücre içi alanında bulunan spesifik tirozin kalıntılarının otofosforilasyonuyla aktivasyonuna yol açar. Bu fosforilasyon, iki hücre içi aşağı akış sinyal yolunun aktivasyonunu tetikler: RAS / RAF / MEK / MAPK yolu ve PI3K / AKT / m-Tor yoludur. Bu yollar sonunda proliferasyon, göç, yapışma ve hücre farklılaşmasında ve ayrıca apoptoz ve anjiyojenez direncinde rol oynayan genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Şekil 1. 7).EGF yolunun aşırı aktivasyonu, çok sayıda CRC'de rol oynamaktadır ve bu yolun tıkanması, etkili bir hedefli terapötik silah haline gelmiştir. Bu aşırı aktivasyonu birkaç mekanizma açıklayabilir: esasen hücre yüzeyindeki reseptörlerin ekspresyonunda bir artış (vakaların % 30 ile % 80'i) ve / veya ligand miktarında bir artış ve kesinlikle çok daha az sıklıkla vediğer kanser türlerine göre CRC'ler, reseptörün konstitütif aktivasyonu veya RAS / RAF / MEK / MAPK veya PI3K / AKT yolları.

EGF yolunu bloke etmenin terapötik etkinliği, 2004 yılından bu yana, CRC'lerin yönetiminde EGF-R'yi hedefleyen iki monoklonal antikorun pazarlama ruhsatına götürmüştür: Setuksimab (kimerik IgG1) ve Panitumumab (insan IgG2), her ikisi de ligand ile rekabet halinde EGF-R'nin hücre dışı bağlanma alanına karşı antagonist olarak görev yapar. Bu terapötik ilerlemeler, şu anda 24 ile 34 ay arasında tahmin edilen, rezeke edilemeyen metastatik hastaların medyan sağ kalımındaki net artışa katkıda bulunmuştur. Anti-EGFR antikorlarının reçetesi başlangıçta, immünohistokimyada tümörü EGFR eksprese eden hastalarla sınırlıydı. Bununla birlikte, bu şekilde ölçülen proteinin ekspresyonu, bir yanıt elde etme veya hayatta kalma ile ilişkili değildi; bu nedenle bu parametre 2008'de terk edilmiştir. Benzer şekilde, ne EGF-R geninin amplifikasyonunun in situ hibridizasyon ile değerlendirilmesi ne de amfi- ve epiregulin gibi ligand ekspresyonunun değerlendirilmesi, klinik uygulamada biyobelirteçler olarak bir yer bulamamıştır (Barbot *et al.* 1997). Öte yandan, 2006'dan itibaren, anti-EGFR'ye yanıtta anahtar faktörün, RAS proteinlerini kodlayan genlerin mutasyon durumu olduğu ortaya çıktı. Bu keşif, anti-EGFR tedavilerinin hedeflenmesi açısından dikkate değer ilerlemelere yol açmıştır.

2.9.2 RAS yolu

RAS proteinleri, GTPase ailesinin bir parçasıdır. Üç farklı gen tarafından kodlanan 4 izoform vardır: KRAS (Kirsten RAS), HRAS (Harvey RAS) ve NRAS (Neuroblastoma RAS).EGF-R dâhil membran reseptörlerinden hücre dışı sinyallerin çekirdeğine iletilmesinde önemli bir rol oynarlar. RAS, hücre zarının iç tarafındaki translokasyonlarının aktive edilmesini gerektiren sitozolik proteinlerdir. Aktivasyonları esas olarak EGF-R dâhil tirozin kinaz membran reseptörleri tarafından tetiklenir. Aktive edildikten sonra, bunlar sırasıyla proliferasyona, istilaya, migrasyona vb. Yol açan aşağı akış sinyal yollarını etkinleştirir. RAS bir "anahtar" olarak hareket eder ve bir aktif durum ile bir inaktif durum arasında salınım yapar. Aktif formunda, RAS, 2 ana EGFR sinyal yolunu toplar ve etkinleştirir: MAP kinazlarının (RAS / RAF / MEK / MAPK) proteini RAF ve PI3K / AKT'ninki (ikinci yol ayrıca RAS aracısı olmadan EGFR tarafından aktive edilebilir) (Şekil 1.8).



Şekil 2.11 RAS / RAF / MAK / MAPK ve PI3K / AKT kanalları

CRC'lerde KRAS geni sıklıkla mutasyona uğrar (vakaların% 40 ile 50'si); mutasyonların çoğu (% 40) KRAS geninin ekson 2'sinde, çoğunlukla 12 ve 13 kodonlarında bulunur. Vakaların% 10'undan azında, ekson 3 (kodonlar 61 ve 59) ve ekson 4 (kodonlar 117 ve 146) ile ilgilidirler. NRAS geni çok daha nadiren bir

mutasyon taşıyıcısıdır (vakaların yaklaşık % 5 ile 8'i). Son olarak, RCC'ler sırasında HRAS genindeki bir mutasyonun açıklaması yoktur. Toplamda, RCC'lerin yaklaşık % 50 ile 60'ında bir RAS mutasyonu vardır. Bu mutasyonlar, aktif fazda bloke edilmiş bir RAS formuyla sonuçlanan yanlış duyu mutasyonlardır. Sürekli aktive edildiğinden, proliferasyonu, hayatta kalmayı, farklılaşmayı, hücre göçünü ve anjiyogenezi uyaran aşağı akım sinyal yollarını aktive eder (Desimone *et al.* 2011).

2.9.3 BRAF

RAF proteinleri serin / treonin proteinleridir - Kinazlar. Üç farklı gen tarafından kodlanan 3 izoform vardır: -RAF, B-RAF ve C-RAF. BRAF proteini, EGF-R'nin aktivasyonunda yer alan RAS / RAF / MEK / MAPK sinyal yoluna aittir. Rolü kolorektal karsinogenezde iyice yerleşmiştir: RAS'ın "akış aşağısında" bulunur. BRAF proteini, RAS tarafından aktive edilir ve karşılığında MEK'i aktive eder, bu da translokasyondan sonra proliferasyon ve apoptozda yer alan genlerin ekspresyonunu indükleyen ERK'yi aktive eder (Şekil 2. 3). BRAF genindeki mutasyonlar, RCC'lerin %5 ila 10'unda bulunur. Vakaların %95'inden fazlasında, genellikle BRAF V600E mutasyonu olarak adlandırılan T> A transversiyon tipi bir mutasyondur (bir timinin bir adenin ile değiştirilmesi).Bu mutasyon aktive edince: BRAF proteininin aktive edilmiş bir formuna yol açıyor. BRAF V600E mutasyonu, RAS genindeki mutasyonları karşılıklı olarak dışlar; bu, her birinin aynı sinyalleme yolunu aktive eden bir "sürücü" mutasyonu olarak ima edilmesiyle açıklanabilir. Proksimal yerleşimli tümörlerde (% 25-30) distale göre (% 5'ten az) daha sıktır ve sporadik IMS kanserlerinde MSS tümörlerine göre çok daha sık görülür (sırasıyla% 50-80 ve% 5-10) (Doroudgar ve Glembotski 2011).

2.9.4 Hedeflenen anti-BRAF tedavileri

Erken faz çalışmalarında monoterapi olarak kullanılan özel olarak hedeflenmiş anti-BRAF tedavileri (vemurafenib, dabrafenib, vb.). Şimdiye kadar CRC'lerin BRAF

mutasyonu ile tedavisinde, pazarlama izni aldıkları mutasyona uğramış BRAF melanomlarının (% 50'den fazlası) tedavisi için kullanılan aynı tedavilere kıyasla oldukça hayal kırıklığı yaratan sonuçlar vermiştir. Aynı şekilde, BRAF (ve anti-anjiyojen) içeren çok hedefli bir terâpi olan sorafenib, faz II'de hayal kırıklığı yaratan sonuçlar verdi.

Bununla birlikte, klinik öncesi veriler ve teşvik edici faz I çalışmaları ışığında, özellikle MEK, EGFR veya AKT inhibitörleri ile kombinasyon halinde çalışmalar devam etmelidir.

2.10 Uygulamada CRC Tümör Biyobelirteçlerin Araştırılması

Yukarıda bahsedilen biyobelirteçlerin tümü moleküler biyoloji tekniği ile belirlenir. Biyobelirteç analizi, çoğunlukla sabitlenmiş ve parafine dahil edilmiş ve anatomik-patolojik bir laboratuvarda saklanmış bir tümör parçası üzerinde gerçekleştirilir. Irak'ta, çeşitli kurumlar tarafından kurulan ve Irak'a dağıtılan 28 hastane moleküler kanser genetiği platformundan birinde tanısal, terapötik veya prognostik amaçlı biyobelirteçlerin analizleri yapılıyor.

Bununla birlikte, platformlar tümör materyalini tutmaz ve bu nedenle biyomarker analizi talebi, temas detayları genellikle anatomo-patoloji raporlarına kaydedilen tümör materyalini tutan anatomo-patoloğa yöneltilmelidir. Bunun için, reçete edilen araştırma türünden (RAS mutasyonları, IMS testi, BRAF mutasyonu, vb.). Bahseden özel reçete sayfaları kullanılmalıdır. Bu sayfalar genetik platformlar veya ilaç firmaları tarafından sunulmaktadır. Bir de standartlaştırılma avantajına sahiptirler ve analizin doğru şekilde yürütülmesi için gerekli unsurları sağlamayı mümkün kılarlar. Hastanın kimliği, tarihi ve numunenin türüne ek olarak, sonucun kendisine gönderilebilmesi için reçete yazan klinisyenin iletişim bilgilerinin doğru şekilde girilmesi de önemlidir. Patolog, bu talebi aldıktan sonra ve analiz için en uygun tümör bloğunu seçtikten sonra, tümör materyalini en kısa sürede tamamlayacağı reçete kâğıdı ile platforma göndermelidir.

Bu nedenle analiz devresi aşağıdaki gibidir:

1) Klinisyen tarafından moleküler analizin reçetesi ve bu reçetenin tümör materyalini tutan anatomo-patoloğa gönderilmesi.
2) Tümör materyalinin eşlik ettiği reçete kağıdının patolog tarafından tümör genetiği platformuna aktarılması.
3) Analizin platform üzerinde yapılması ve sonucun reçete yazan klinisyene ve patoloğa (tümör bloğu ile birlikte) geri gönderilmesi.

Şu anda klinik uygulamada kullanılan biyobelirteçler, bir yandan IMS ve diğer yandan EGFR yolu, bununla ilgili yollar ve anti-EGFR'lere yanıtın tahmini ile ilgilidir. Bununla birlikte, anti-anjiyojenik yaklaşım ve özellikle bevacizumab (anti-VEGF Ab), 10 yıldır metastatik CRC'nin terapötik cephaneliğinin bir parçası olsa da, klinik uygulamada hala etkililik veya kullanılabilir direnç için bir ön gösterge bulunmamaktadır.

Şu anda, ilgilenilen proteinlerin ekspresyon seviyesinde tümör biyobelirteçlerinin belirlenmesi veya karşılık gelen genlerin sekansının veya amplifikasyonunun incelenmesidir. Yeni yaklaşımlar hızla gelişmekte ve tümör biyobelirteçleri alanını genişletmektedir; küçük karışan RNA (veya küçük karışan RNA için siRNA) ve gen ekspresyon imzaları veya mikrodiziler örneklerdir. Yarının onkolojisi, biyobelirteçlerin gelişiminden ayrılamaz. Bu alandaki araştırmalar büyüyor ve daha iyi hasta ve tedavi seçimi yoluyla önemli gelişmeler sağlamada başarısız olmayacak. Biyobelirteçlerin ilerlemesi için tümör biyolojik mekanizmalarının daha iyi anlaşılması esastır.

3. MATERYAL METOD

Kolorektal kanser sıklığı giderek artan Irak nüfusunda gerçek bir sağlık sorununu temsil ediyor. Bu patolojinin riskleri yaş, cinsiyet, kalıtım, diyet, sigara ve alkol gibi çeşitli faktörlerle bağlantılıdır. Mevcut çalışma, Irak Bağdat eğitim hastanesine başvuran kolorektal kanser vakalarının belirlenmesi amacıyla geriye dönük ve ileriye dönük bir çalışmaya dayanmaktadır.

3.1 Çalışma Materyali

İki aşamalı olarak gerçekleştirilen kesitsel bir çalışmadır. İlk, Radyoterapi bölümünde (Bağdat Eğitim Hastanesi laboratuvarı, Bağdat, Irak) toplanan 70 numune (tedavinin cerrahi ve kemoterapiye dayalı olduğu kolon kanserinden farklı olarak, tedavisi cerrahi ve radyoterapiye dayalı bir kolorektal kanserler olan rektal kanserli hasta örnekleri) dâhil olmak üzere verilerin toplanmasından oluşmaktadır.

3.2 Çalışma Metodolojisi

3.2.1 Verilerin toplanması

Bu işin gerçekleştirilmesi için yararlanılan kaynaklar şunlardır; Hastane kayıtları, Radyoterapi bölümünün tıbbi kayıtları, Bilgisayar sistemi.

3.2.2 Dâhil edilme kriterleri

Tanı anında cinsiyet, yaş ve yaşa bakılmaksızın rektal kanserli herhangi hastalar seçilmiştir.

3.2.3 İncelenen değişkenler

Aşağıdakilerle ilgili olarak toplanan çeşitli veriler:

• Hasta kimliği: Adı ve soyadı, cinsiyeti, yaşı, tarihi ve hastanede kalış süresi

• Yaşam boyu tütün tüketimi (pasif veya aktif)

• Boş zaman veya profesyonel fiziksel aktiviteler

• Beslenme alışkanlıkları

• Hazırlayıcı koşullar, kişisel geçmiş ve ilişkili komorbiditeler, aile öyküsü.

• Tümör belirteçleri bulunması

• Farklı tedaviler.

3.2.4 Numunelerin toplanması ve saklanması

Tümör belirteçlerinin analizi için amaçlanan kan numunesi, antikoagülan içermeyen bir tüp üzerinde toplanır. Alınacak kan miktarı, analizi gerçekleştirmek için ve bu çalışma için tasarlanmış serum bankasında bir karşılaştırma veya daha sonra doğrulamaya izin veren bir alikot tutmak için yeterli olmalıdır.



Şekil 3.1 Depolama serum kitaplığı

Kanda ölçülen tüm TM'ler için, numune almadan önce aç karnına olmanın faydası yoktur. Bununla birlikte, numune almadan önceki 24 saat içinde sigara içmemek önemlidir çünkü tütün, çoğu tümör belirtecinin kan seviyesini arttırır.

Numunelerimiz 3000 rpm'de 10 dakika boyunca olabildiğince hızlı santrifüj edildi, sonra 24 saat içinde analiz edildikleri takdirde 4 ° C'de saklandı ve tahlilin 24 saatten fazla ertelenmesi gerekiyorsa -20 ° C'de dondurulmuştur.

3.2.5 MALDI TOF / TOF kütle spektrometresi ile analiz

MALDI plakalarının analizleri, iki kütle spektrometresi üzerinde gerçekleştirilebilir; MALDI TOF / TOF 4 800 ve Protein Pilot yazılımının 3. 5 sürümü ve aynı yazılımın 4.0 sürümü ile birlikte 5800 (Applied biosystem / ABsciex) .

Pozitif durumda kullanıldılar ve plakalar bir kalibrasyon kiti (ABsciex) kullanılarak dışarıda kalibre edildi. Lazer gücü SM için 2,800 ila 3,400 ve SM / SM edinimi için 3,600 ila 4,200 arasında değişiyordu.

Spektrum başına 1.500 lazer atışı oranında SM spektrumunu elde ettikten sonra, en yoğun 12 iyon (12'den büyük bir sinyal / gürültü oranına sahip) otomatik olarak seçildi ve parçalanma gazı olarak hava kullanılarak çarpışma odasında SM / SM'ye parçalandı. Çarpışma odası enerjisi 1 kV'de tutuldu ve buradaki vakum yaklaşık 2 x 10-6 Torr idi. SM / SM spektrumlarının her biri 2.000 lazer atışının elde edilmesinden kaynaklanmıştır. Matriste 30 fmol / spot. konsantrasyonunda bulunan 1570.677 Da kütleye sahip Glu-1 fibrinopeptit iyonu kullanılarak dahili bir kalibrasyon da kullanıldı.

Tanımlama, Protein Pilot yazılımının Paragon algoritması kullanılarak gerçekleştirildi. Bu tanımlama için parametreler, sonuçlarda aksi belirtilmedikçe, en az iki peptitle, 50 μm'lik bir kütle kesinliği ve% 95'e eşit veya daha büyük bir güven puanı ile gerçekleştirildi. "Kullanılmayan puan" olarak adlandırılan bir güven endeksi,% 95 güvene ulaşmak için 1. 3'ten büyük olması gerektiği şeklinde tanımlanmıştır. Her SM / SM spektrumu, Homo Sapiens türü seçilerek Uniprot / Swissprot veritabanıyla karşılaştırıldı. MMTS grubunun sisteinlere eklenmesi, triptik bölünmelerin özgüllüğü

gibi modifikasyonlar, yazılımla analiz edilerek aranmıştır. Tanımlanan proteinler, fazlalığı sınırlamak için yazılımın Progroup algoritması ile havuzlandı ve Önyargı düzeltmesi de yapıldı. Bu kriterlerden kaynaklanan yanlış pozitif oranı % 2 civarındadır.

Kantitatif proteomik analiz bağlamında tekrar eden bir soru ortaya çıkar. Bir proteinin hangi varyasyon eşiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştiği düşünülebilir? Bu sorunu önlemek için, 2009 yılında John Schwacke tarafından yayınlanan iQuantitator yazılımının özelleştirilmiş bir sürümünü kullandık. Bu yazılımın amacı, bir deneydeki proteinlerin tüm iTRAQ raporlarını normalleştirmek ve proteinin ekspresyon seviyesindeki varyasyonun şans'a bağlı değil, gerçekten de önemli bir farklılık olduğunu düşünmenin mümkün olduğu bir güven aralığı tanımlamaktır (bkz. şekil 3.20 s. 75). Bu nedenle, güven aralığının iki sınırı 1'den büyük olduğunda, protein önemli ölçüde fazla ifade edilir ve aksine, iki sınır 1'den küçük olduğunda protein önemli ölçüde yetersiz ifade edilir. Diğer yandan, bir proteinin tanımlanmasını ve ölçülmesini mümkün kılan her peptide güven aralıkları da uygulanır. Bu nedenle protein için güven aralığı, proteinin tanımlanmasını mümkün kılan her bir peptit için güven aralıklarını hesaba katar. Bu nedenle, bu şekilde elde edilen istatistiksel değer özellikle sağlamdır ve aynı zamanda varyasyonları küçük ama önemli olan düzensiz proteinleri vurgulamayı da mümkün kılar.

3.2.6 İstatistiksel analiz

• **Aritmetik ortalama:** Merkezi eğilim parametresidir, bir dağılımın merkezini belirleyen ölçülerden biridir. Ortalama, bir istatistiksel seriyi tamamen karakterize etmek için kullanılır, ortalama aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$\overline{x} = \frac{\sum_{i=1}^{N} x_i}{N} \quad \text{if N≤30}$$

xi = i^{th} variable

N = Number of Variables in the data set

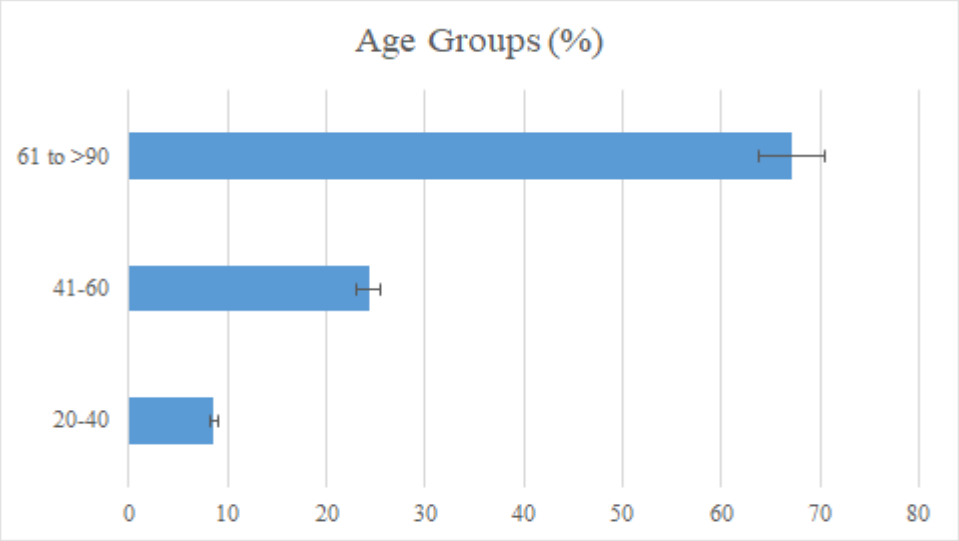
• Cinsiyet oranı: Kadın sayısı / erkek sayısı

• Excel 2010 kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Epidemiyolojik Veriler

4.1(a) Yaş:



Şekil 4.1 Hastaların yaşa göre dağılımı

Bu çalışmada hastaların ortalama yaşı 66'dır ve ekstremler 23 ile> 90 yaş arasında değişmektedir.

En çok etkilenen yaş grubu % 67,14 ile ([60-90)grubudur. Sonra (41-60) yaş grubu % 24.28 ve son olarak (23-40) yaş grubu % 8.57'dir.

Kolorektal kanser 40 yaşından önce nadirdir. Yaşla birlikte görülme sıklığı artar, tanı konulan vaka sayısı kadın ve erkeklerde 40 ila 70 yaş arasında her on yılda iki katına çıkmaktadır (Kam *et al.* 2004).

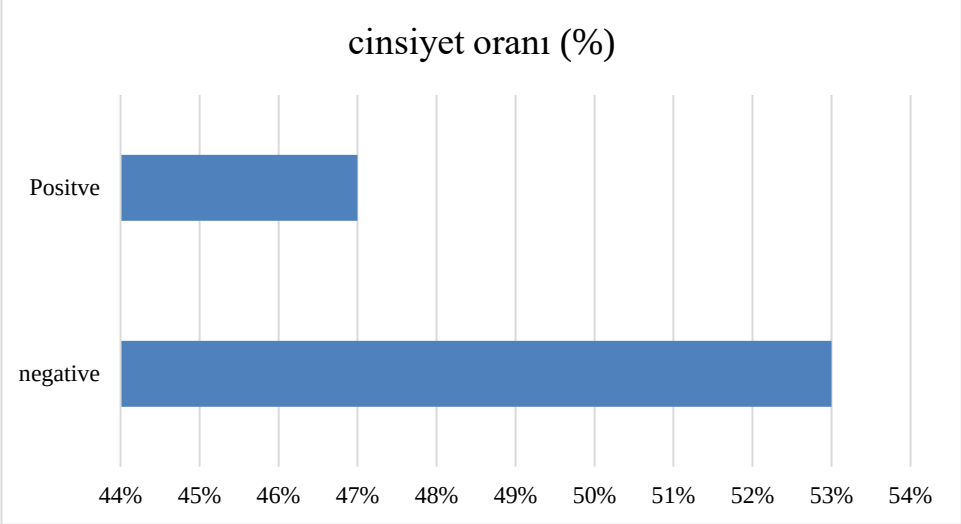
Almanya, Fransa gibi Batı ülkelerinde gençlerde kolorektal kanser görülme sıklığı düşük, Côte-d'Or bölgesinde bir çalışma yapıldı ve Frances, hastaların yalnızca % 4,2'sinin 40 yaşın altında olduğunu göstermektedir.

Irak'ta kanserlerin% 90'ından fazlası 50 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır. Ortalama tanı yaşı kadınlarda 72, erkeklerde 69'dur.

Yaşla birlikte sıklıktaki bu artış, risk faktörlerine artan maruz kalma ile açıklanmaktadır. Tanımlayıcı epidemiyoloji verileri, genel olarak risk altındaki popülasyonu tanımlamayı mümkün kılmıştır; bunlar 50 yaşın üzerinde, hafif bir erkek ağırlıklı deneklerdir (Al Dahhan *et al*. 2008). Bu, kanserojen faktörlerin zamanla artan birikiminden ve yaşla birlikte vücudun savunmalarının, özellikle bağışıklık savunmalarının, yatkın hastalıkların, genetik yatkınlığın azalmasından kaynaklanıyor olabilir. Bazı araştırmacıların araştırmalarına göre yaşlı bir denekte kolorektal kanserin ortaya çıkması, müdahalenin geç bir aşamasındaki keşfi ile açıklanabilecek kötü bir prognoz faktörüdür (Al-Jenabi et al. 2019; Hebels et al. 2012).

Yaşlı bir denekte kolorektal kanserin ortaya çıkması kötü prognoz faktörüdür. Al-Jenabi NA ve diğerlerinin (2019) araştırmalarına göre bu, müdahalenin geç bir aşamasındaki keşfi ile açıklanabilir.

4.1 (b) Cinsiyet



Şekil 4.2 Hastaların cinsiyete göre dağılımı

Bu seride erkek sayısı% 53 ve kadın sayısı% 47.14'tür. Cinsiyet oranı 1. 1. Kolorektal kanser insidansı erkeklerde daha yaygındır. Irak'ta CRC erkeklerde daha sık görülüyor,

bu fark yaşla birlikte artıyor; erkeklerde% 40, kadınlarda% 30'dur. CRC Vakalarının çoğu sporadik olarak ortaya çıkar (Zur Hausen 2011).

Erkeklerde kolorektal kanser insidansını birkaç faktör açıklamaktadır (Magalhaes *et al.* 2012).

• Sigara içmek: tütün tüketimi aynı zamanda kanseri uyaran oksidatif stresi artırır

• Alkollü içeceklerin tüketimi

• Obezite

• Yağ yönünden zengin besinler

4.2 Hastaların Kökeni

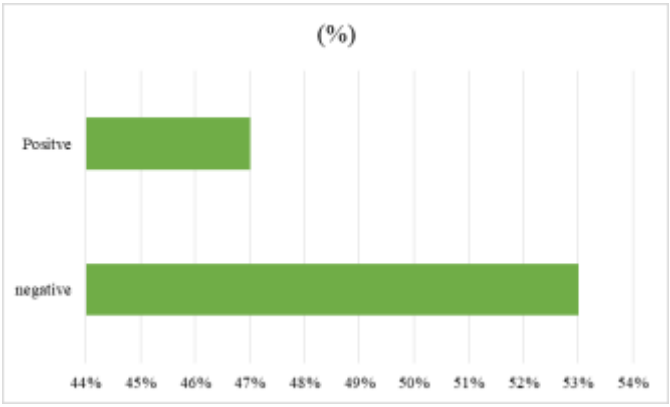
Çizelge 4.1 Hastaların kökenlerine göre dağılımı

Hastanın Irak'taki Yeri	Toplam Hasta Sayısı	hastaların yüzdesi
Baghdad	22	31.42
Karbala	18	25.71
Diyala	11	15.71
Samarra	8	11.42
Najaf	3	4.28
Kirkuk	8	11.42

Serimizde tüm hastalar Bağdat'ın altı ilçelerinden ve büyük sayıları ise Diyala, Kerbela ve Kerkük'ten geldi, vakaların yaklaşık%72'si ve bu kanserle mücadele merkezi ve bu anti kanser merkezi ve bu bölgede bu kanser türünü destekleyen tek merkez (Bağdat Tıp Şehri) olmasıyla açıklanmaktadır.

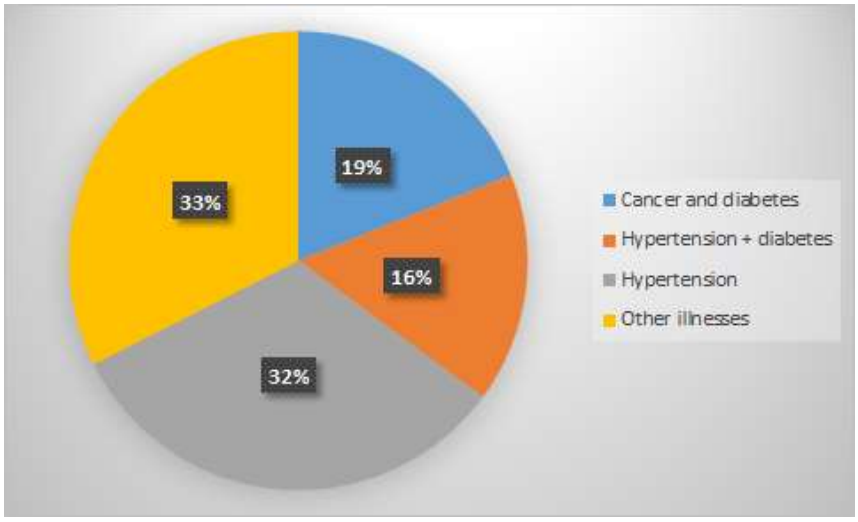
4.3 Genel Hasta Durumu

4.3.1 Tıbbi geçmiş



Şekil 4.3 Hastaların tıbbi geçmişe göre dağılımı

Hastalarımızın%47'sinin en azından tıbbi geçmişi bulunmaktadır.



Şekil 4.4 Tıbbi ATCD'ye göre hastaların dağılımı

Tıbbi geçmiş, vakaların%54,54'ünde yüksek tansiyon ve%39,39'unda diyabet hâkimdir.

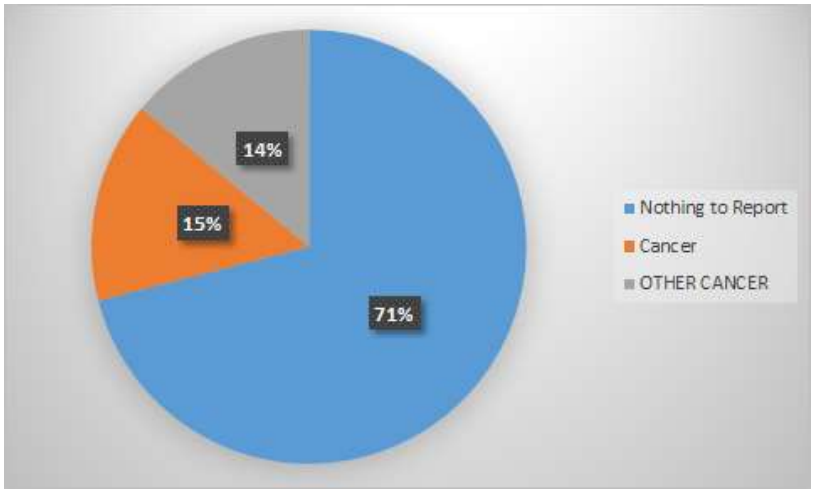
4.3.2 Kanser ve diyabet

Son çalışmalar ve meta-analiz serilerine göre diyabetik hastalarda pankreas, karaciğer, kolon, göğüs, idrar yolu ve endometriumu etkileyen kanserler daha sık görülmektedir.

Diyabette kolorektal kanser geliştirme riski artar ve bu sadece hiperinsülinemi ile değil, aynı zamanda bağırsak mukozası için potansiyel olarak kanserojen ajanlara daha uzun süre maruz kalmaya neden olan ve daha uzun bağırsak geçiş süresi ile açıklanır.

Diyabetik hastalarda, bağırsak lümeninde onkogenezi teşvik edebilen önemli safra asitlerinin konsantrasyonları da gözlenmiştir (Kabouri 2000).

4.3.3 Aile öyküsü



Şekil 4.5 Hastaların Aile ATCD'sine göre dağılımı

Hastaların%15'inin en az bir aile öyküsü bulunmaktadır (ailede kolorektal kanserin%7'si dâhil). Bu tür kanser geliştirme riski, birinci derece bir aile üyesi (ebeveyn, erkek kardeş, kız kardeş veya çocuk) daha önce kolorektal kanser geçirdiğinde iki ile iki buçuk kat daha yüksektir. Bu artan riskin nedeni net değildir, ancak bazı hipotezlerde tanımlanamayan bir genetik riskin varlığına atfedilir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre,

ATCDF'li hastaların popülasyonun %15'ini temsil ettiği, bu nedenle, sporadik forma ek olarak kalıtsal kolorektal kanser formunun nadir olduğu bulunmuştur. Irak araştırmasına göre, Kolorektal kanserin çoğunlukla sporadik olarak ortaya çıktığını ve vakaların yaklaşık %5'inde kalıtsal bir durum olduğunu bulunmuştur (Liu et al. 2011).

Kohort veya vaka kontrollü epidemiyolojik çalışmaların tümü, birinci dereceden akrabası bu hastalıktan etkilenen bir denek için kolorektal kanser geliştirme riskinin arttığını göstermiştir. Dolayısıyla risk, etkilenen bir deneğin birinci derece akrabası için 2 ile 3 arasındadır. Bu risk, başvuru sahibinde kanserin başlama yaşı ile ters orantılıdır ve ailede etkilenen hasta sayısı ile ilişkilidir. Kolorektal kanserlerin yaklaşık % 10 ile 15'i, ailesinde kolorektal kanser, yani yakın ailede birkaç kolon veya rektum kanseri vakası olan kişilerde görülür. Bu artan riskin nedeni belirsizdir, ancak bazı durumlarda tanımlanamayan bir genetik riskin varlığına atfedilir (Shatha&Sheikha *et al.* 2012)

4.3.4 Toksik alışkanlıklar

Çizelge 4.2 Toksik Alışkanlıklara Göre Hastaların Dağılımı

Toksik alışkanlıklar	Hasta sayısı
Tütün	17
Çiğnemelik tütün	6
Alkol	3
kanser	42
Diğerleri	2

Araştırmanın bu bölümünde, sigara içenler sadece erkek olduğu için kadın cinsiyeti ihmal edilmiştir, vakaların %25,71'i sigara içen,%7,14'ü çiğneme tütün tüketicisidir. Tütün tüketimine göre kolorektal kanser riskinin arttığını, günde tüketilen sigara sayısı arttıkça, CRC riskinin de arttığını, bir günde tüketilen sigara sayısının ve yılların süresinin iki ana faktör olduğunu gösteren birkaç çalışma ile uyumlu olarak fark edilebilir. Tütünün bir risk faktörü olarak rolü iyi tespit edilmiştir,tütün dumanı 50'den fazla potansiyel olarak kanserojen molekül içerir, bunlardan en az 20'si insanlarda

kanserlerin indüksiyonunda doğrudan rol oynar, bunlardan birincisi katran içinde bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), DNA seviyesinde büyük eklentiler oluşturur. Hacimli eklentilerin önünde, DNA polimeraz durabilir veya öğretici olmayan bölgenin karşısına yetersiz bir baz yerleştirebilir. P53 mutasyonları seviyesindeki G → T trans versiyonlarının prevalansı, sigara içmeyenlerde 10'a kıyasla sigara içenlerde %40'tır ve nikotinden türetilen nitrozaminler, nükleofilik bir DNA bölgesine bir alkil radikalinin ($R\text{-}CH_2^+$) eklenmesine yol açar ve moleküldeki alifatik karbonun hidroksilasyonu ile üretilen, uzun süreli sigara kötüye kullanımının (20 paket-yıl) büyük kolorektal adenom riskini 2 ile 3 kat artırdığını göstermiştir. Haider Saadoon Qasim Al hilfia (2019) tarafından yapılan araştırmaya göre 30 ile 40 paket-yıl sigara içen erkeklerde kolon veya rektum kanseri gelişme riskinin arttığı artık gösterildi (Liu *et al.* 2011).

4.3.5 Beslenme alışkanlıkları

Çizelge 4.3 Yemek Alışkanlıklarına Göre Hastaların Dağılımı

Beslenme alışkanlıkları	Hasta sayısı (%)
kırmızı et	38.57
Baharat	40.00
Biberler	4.29
Sebze	8.57
Dengeli	15.71
Diğer	18.57

Hastaların çoğunda kırmızı et ve baharat tüketimi olgusu bildirildi; ancak birkaç hastada dengeli olduğu düşünülen bir diyet uygulanmıştır. Bu sonuçlara göre, yüksek yağlı diyet arasındaki neden-sonuç ilişkisi; Düşük lif ve rektal kanser yaygın olarak fark edilmiştir.

4.4 Et ve CRC (55)

Kohort çalışmalarından elde edilen verilerin meta-analizleri, günlük tüketim için CRC riskinde %43 ve haftalık 50 gr kırmızı et tüketiminde %15 artış olduğunu

göstermektedir. Kırmızı etlerde bulunan sitotoksik ve genotoksik aldehitler oluşturmak için lipit peroksidasyonunu katalize etmektedir. Ayrıca kırmızı et tüketimi dışkıda "Görünür Toplam Nitroso Bileşikleri" oluşumunu artırmaktadır. Bu bileşikler, mutajenik ajanlardır ve kolonik mukozanın hücreleri düzeyinde nitroso bileşiklerine özgü DNA eklentileri oluşturur. Ek olarak, kırmızı etin kuvvetli pişirilmesi, heterosiklik aminlerin ve polisiklik aromatik hidrokarbonların oluşumuna neden olur. Bu bileşikler mutajenik ve kanserojendir ve kolon mukozası üzerinde etkili olabilir.

Kırmızı et tüketimi ile CRC riski arasındaki ilişki birkaç tamamlayıcı mekanizma ile açıklanabilir: Birincisi, kırmızı et, kolon bakterileri tarafından kanserojen N-nitroso bileşiklerinin oluşumunun yanı sıra pro-enflamatuar sitokinlerin, serbest radikallerin ve gelişim tümörlerini destekleyen diğer maddelerin üretimini destekleyebilen hem içerir. Daha sonra, yüksek sıcaklıklarda pişirilen kırmızı et, özellikle genetik olarak yatkın kişilerde kolon kanserinin gelişimini teşvik edebilen heterosiklik aminlerin ve polisiklik aromatik hidrokarbonların üretimine yol açar. Etin pişme derecesinin CRC ile ilişkisi, özellikle heterosiklik aminlerin asetilasyon hızı ile ilişkili genetik polimorfizme göre değişebilir. Kırmızı et, hücre çoğalmasını destekleyen insülin salgılanmasını da uyarabilir. Son olarak, daha az doğrulanmış bir teori ile ilişki sığır virüslerinden gelebilir (Hebels et al. 2012).

4.4.1 Dengeli beslenme

"A posteriori" yöntemlerine dayanan çalışmalara göre, meyve ve sebzeler, tahıl ürünlerinde, yağ oranı düşük, kırmızı ve işlenmiş etler açısından zengin ve az alkol içeren bir gıda profili, CRC riskinin azalmasıyla ilişkilidir. Sekiz kohort çalışmasının ve sekiz vaka / Kontrol çalışmasının bir meta analizi, yüksek meyve ve sebze tüketimi ile karakterize edilen "ihtiyatlı" tipte bir diyetin CRC riskinde % 17 azalma ile ilişkili olduğunu ve tersine "Batı" tipi bir diyetin % 19 oranında artan bir riskle ilişkili olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, Akdeniz tipi ve DASH tipi bir diyetin yanı sıra meyve ve sebzeler, tahıl ürünleri, yağ ve kırmızı ve işlenmiş etler bakımından zengin ve az alkol içeren bir gıda profili, CRC riskinde azalma ile ilişkilidir. Bu gözlemler, bağımsız olarak değerlendirilen gruplarla ilişkileri doğrulamaktadır (Kabouri 2000).

4.5 Sosyo-Ekonomik Düzey

Hastaların neredeyse tamamı (% 97) orta sosyo-ekonomik düzeydedir; Sosyo-ekonomik düzey, sağlıkla ilgili eşitsizliklerin önemli bir faktörüdür. Epidemiyolojik veriler, diğer kanser türlerinden farklı olarak yüksek sosyo-ekonomik düzeyin kolorektal kanserler için prognostik bir faktör olduğunu ve ayrıcalıklı hastalar ile dezavantajlı hastalar arasında bir şans eşitsizliği olduğunu göstermektedir.

4.6 Teşhis (Laboratuvar incelemeleri)

Biyokimyasal analizleri, belirli organların işleyiş kalitesini değerlendirmeyi ve ayrıca anormallikleri tespit etmeyi mümkün kılar. Kan biyokimyasal analizi, kolorektal kanserin evresini belirlemek için de kullanılır, çünkü yüksek seviyeler kanserin böbreklere veya karaciğere yayıldığını gösterebilir.

4.6.1 Radyolojik incelemeler

Rekto-sigmoidoskopi: Rekto-sigmoidoskopi, rektumun ve sol kolonun sindirim mukozasını görselleştirmek için endoskopik bir incelemedir. Ucuna anüs tarafından yerleştirilen bir kamera (endoskop) takılmış küçük, uzun ve esnek bir tüp kullanılarak yapılan görsel incelemedir. Muayene, rektumun dijital muayenesi ve ardından bir anoskopi (anal kanalın görsel muayenesi) ile başlar, ardından endoskopu dikkatlice anüsten kolonun son kısmına (kalın bağırsak) yerleştirilir. Böylece muayene eden kişi kolon yüzeyindeki olası anormallikleri görebilir ve biyopsiler (mikroskop altında analiz edilen doku örnekleri) veya polip varlığını tespit edebilir. Bu müdahalede gösterilen tüm özene rağmen poliplerin%5-10'u keşfedilmemiştir. Bu test ağrıya neden olmaz ancak rahatsızlık edici olabilir. Görmeyi iyileştirmek ve sindirim sistemi boyunca ilerlemek için muayene sırasında hava verilmektedir. Test ortalama 15 ile 30 dakika sürer. Bağırsağın ön yıkamasından sonra gerçekleştirilir (Şekil 4. 6).



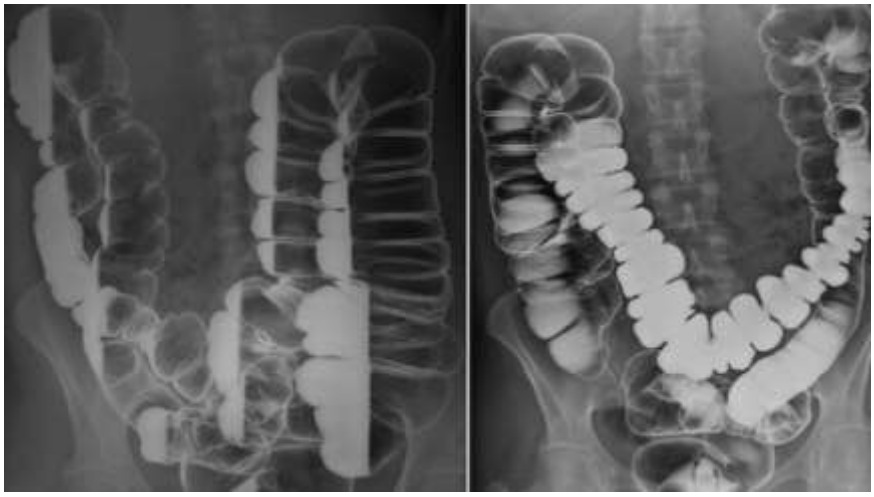
Şekil 4.6 Rektumun ve kalın bağırsağın son kısmının endoskopik muayenesi

Baryum ve hava her iki ürün de bir kanül (Kolonoskopi ve Koloscanner veya Sanal Kolonoskopi) kullanılarak rektal olarak bağırsağa verilir.

Kolonoskopi sigmoidoskopiye benzer, ancak tüm kolonu incelemesidir, kolonun daha kapsamlı bir şekilde incelenmesine izin verdiği için kanser için en etkili tarama yöntemi olarak kabul edilir. Ayrıca, kolon mukozasını görselleştiren ve kanser öncesi lezyonların saptanmasına izin veren, kolosanner adı verilen daha az invaziv yeni bir teknik veya sanal kolonoskopi de var, günümüzde kolorektal kanser riski taşıyan lezyonların saptanmasında güvenilir ve invazif olmayan bir keşif oluşturmaktadır. Sanal kolonoskopi, çok dedektörlü bir tarayıcı kullanarak, hava veya karbondioksit ile şişirilmiş bir kolon ile yüzüstü ve sırtüstü pozisyonda ince abdominal kesitlerin alınmasından oluşur.

Poliplerle karıştırılabilecek dışkı kalıntısının varlığını ortadan kaldırmak için kolonun dikkatli bir şekilde hazırlanmasını gerektirir. Muayene süresi on dakikayı geçmez ve hastalar için rahatlık kabul edilebilir. Testin okunması her zaman iki veya üç boyutlu olarak yapılır.

Çift kontrastlı baryum lavmanı: Çift Kontrastlı Baryum Lavmanı (DC), iki kontrastlı küçük medyum tüpünün kullanımına dayalı olarak kalın bağırsağı (kolon) araştıran bir X-ışını muayenesidir. Bu muayeneyi yapmak için radyoskopi (X ışınları sayesinde hareket halindeki organların görselleştirilmesi) ve standart radyografiler kullanıyoruz. (Şekil 4. 7)



Şekil 4.7 Çift kontrastlı baryum lavmanını takiben kalın bağırsak röntgeni

DC baryum lavmanına sahip olmak için, hasta muayeneden bir gün önce başlayan çok sıkı bir diyet uygulamalıdır. Bu diyetin amacı, bağırsak duvarının iyi görüntülenmesini sağlamak için kolonu boşaltmaktır.

Muayene sabahında hasta oruç tutmalıdır. Ancak ilaçlarını biraz su ile alabilir. Uygun olmayan hazırlık muayenenin yeniden başlatılmasını gerektirebilir. Bununla birlikte, standart bir röntgen, bağırsağın iç veya mukoza duvarında bulunan lezyonları gösteremez. Mukoza, poliplerin ve kanserlerin doğduğu yerdir. Bunun incelenebilmesi için mukozanın opak bir röntgen kontrast ortamı ile astarlanması gerekir. Son olarak kalın bağırsağın tüm kısımlarını incelemek için farklı pozisyonlarda görüntüler alınır.

4.7 Patolojik inceleme

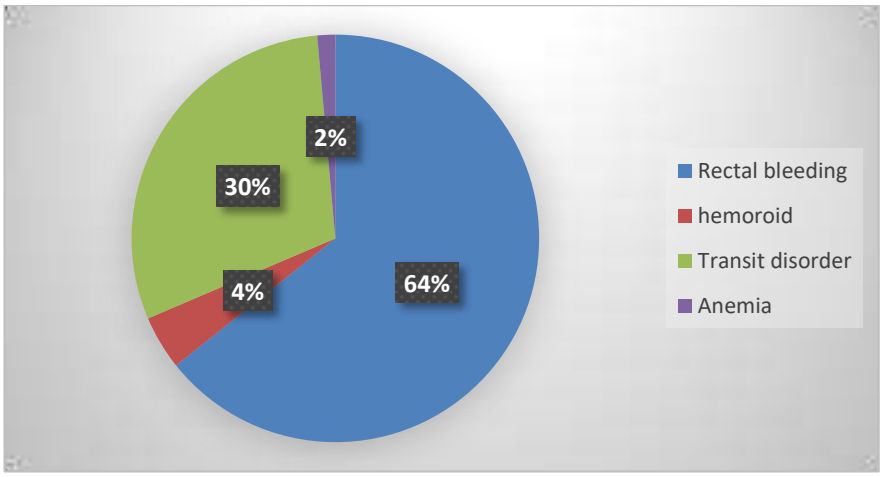
4.7.1 Patoloji incelemesi

Biyopsi, analiz için doku örneklerinin alınmasını içerir. Kolonoskopi veya rektoskopi sırasında, endoskopa yerleştirilen küçük forsepsler kullanılarak kolon veya rektum biyopsisi yapılır. Biyopsi sırasında alınan her şey daha sonra analiz için patoloji laboratuvarına gönderilir. Sadece patolojik inceleme, çıkarılan lezyonların kanserli olup olmadığına kesin olarak karar vermeyi mümkün kılmaktadır.

Kanser teşhisi konulan durumlarda, çıkarılan hücrelerin ve dokuların incelenmesi de söz konusu kanserin türünü belirlemeyi ve ayrıca kolon veya rektum kanseri hücrelerinin hangi katmanlarında büyüdüğünü belirlemeyi amaçlamaktadır. Buna derin uzatma denir. Bu, hastalığın derecesinin ilk göstergesini verir ve kanserin evresini tanımlamaya yardımcı olur. Biyopsi sonrası patoloji incelemesi, yalnızca küçük bir doku örneğinin analiz edilmesine izin verir. Kanserli bir lezyon olduğu ortaya çıkarsa, Cerrahi operasyondan sonra tümörün tamamını ve çıkarılan lenf düğümlerini incelemek ve kanserin boyutunu daha kesin olarak değerlendirmek için ikinci bir anatomopatolojik inceleme yapılacaktır.

4.7.2 Serimizde bulunan ana klinik belirtiler

Kolorektal kanser teşhisi, vakaların neredeyse %71'inde rektal kanama, karın ağrısı ve geçiş bozuklukları gibi semptomlardan önce getirilir. Çeşitli çalışmalardaki ilk sunum şekli, önemli ölçüde iki semptomun baskınlığı ile karakterize edilir: Bunlar rektorraji ve karın ağrısıdır. Transit bozukluklar, dikkate değer olmayan bir sıklıkta ikinci sırada gelir.



Şekil 4.8 Hastaların klinik belirtilere göre dağılımı

Çalışmamızın sonuçları, vakaların %75'inde rektal kanama, %50'sinde transit bozukluk, %59,37'sinde kilo kaybı ve %28'inde karın ağrısı varlığı ile literatürde anlatılanlara uymaktadır. Bu, doktorları, özellikle ailede CRC öyküsü varsa, herhangi bir rektorragiya veya transit bozukluğu olan veya olmayan kalıcı karın ağrısı karşısında daha dikkatli hale getirmelidir. Rektörriler: Literatüre göre KRK olgularının %70'inde bu belirti bulunur, demir eksikliği anemisinin gösterdiği gizli kanama nadirdir. Kansere işaret eden bazı kanamalar genellikle antikoagülan tedavi sırasında ortaya çıkar.

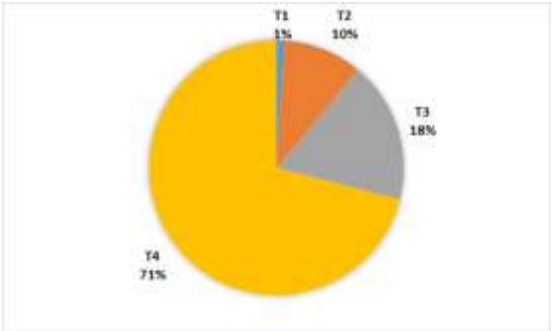
1. Bağırsak geçiş bozuklukları: Sık görülür ve çeşitli yönleri olabilir: isyankâr ishal, olağandışı kabızlık veya değişen ishal-kabızlık, vakaların %17 ile 40'ında rektal kanseri ortaya çıkarabilirler.

Serimizde vakâların %30' unda bulundu. Kabouri serisinde, vakaların %70'inde bulundu (QasimAlhilfia *et al.* 2019).

2. Çok faktörlü anemi: Tümörden kanama, yetersiz beslenme ve kronik iltihaplanma nedeniyleoluşmaktadır. Literatüre göre KRK vakalarının %8'inde anemi bulunmuştur.
3. Diğer işaretler olarak karın ağrısı vardır. Belirsizdirler, kolonik çerçevede lokalize olurlar veya ilerleyen şiddetlenme ataklarıyla gelişirler ve dışkı veya gaz fiyaskosu ile ortaya çıkarlar.

4.8 TNM Sınıflandırması

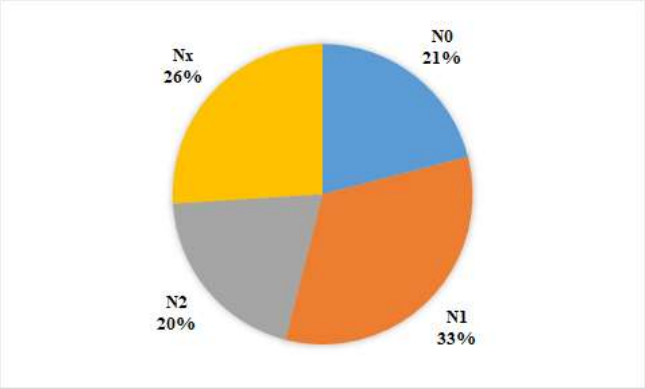
4.8.1 Parietal uzantı T



Şekil 4.9 Parietal uzantıya (T) göre hastaların dağılımı

Parietal uzantı T, hastalarda belirlendi ve bu MRG'ye dayalı radyolojik tanı anında. % 1'i T1 evresinde, hastaların % 10'u T2 evresinde ve bu çalışmadaki hastaların % 71'i T3 evresinde ve son olarak % 14'ü T4 evresinde idi. Bu sonuç, hastaların çoğunun tanı anında derin bir duvar uzantısına sahip olmasıyla açıklanmaktadır.

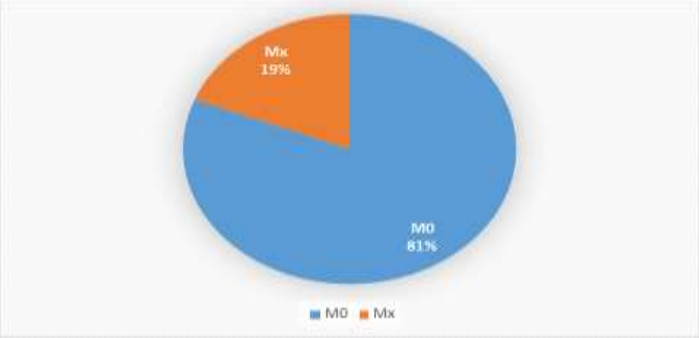
4.8.2 Locoregional lenfadenopatiler (Le) (N)



Şekil 4.10 Le N'ye göre hastaların dağılımı

Tanı anında hastaların % 53'ünde en az bir lenfadenopati vardı Hastalarımızın % 21'i N0 evresinde,% 33'ü N1 evresinde, % 20'si N2 evresinde ve % 26'sı Nx evresinde idi.

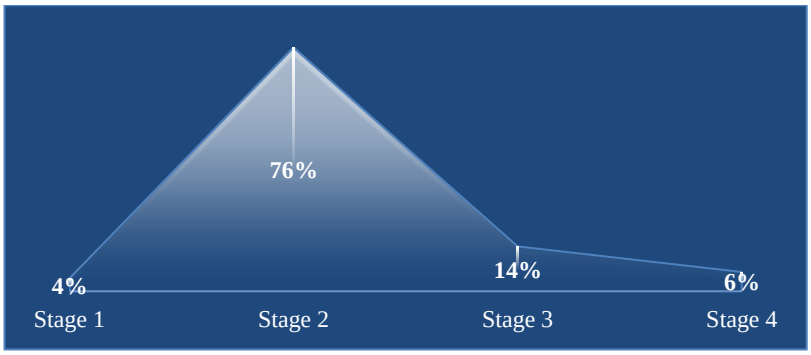
4.8.3 Uzaktan metastazlar (M)



Şekil 4.11 Hastaların M'ye göre dağılımı

Bu seride hastaların% 81'i tanı anında metastatik değildi (M0) ve durumubilinmeyen% 19'u metastatik değildi ve hemen diğer bölümlere sevk edildikleri için metastatik hasta yoktu.

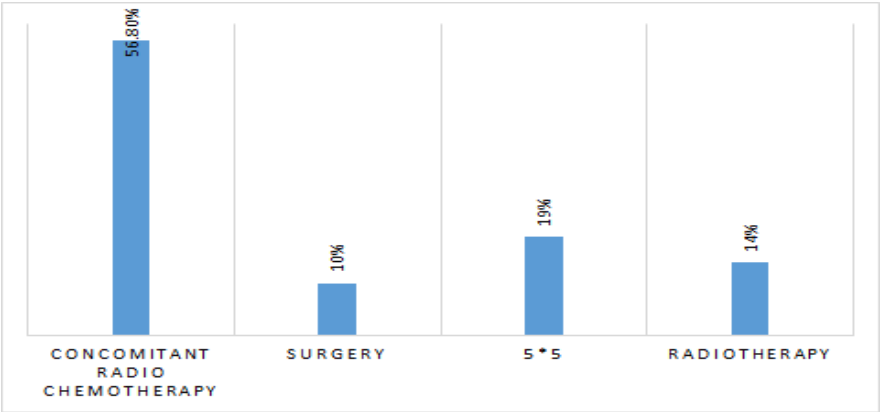
4.8.4 Rektal kanserin farklı aşamaları



Şekil 4.12 Vakaların aşamalara göre dağılımı

Aşama III ve IV, bu serideki baskın aşamalardı ve bu, önemsiz kabul edilen sindirim bulguları önünde böyle bir teşhisi kaçıran hastaların veya doktorların ihmal edilmesiyle geç teşhisin sonucudur.

4.8.5 Tedavi



Şekil 4. 13. Hastaların tedavi türüne göre dağılımı

Hastaların% 57'si RCC (eşzamanlı radyo kemoterapi) ile tedavi edildi çünkü bu hastalar genç veya iyi klinik durumda ve tedavi küratif amaçlıdır; Yaşlı hastalar veya eşlik eden komorbiditeleri olan hastalar için 5 * 5 ile %19 (5 günde hızlandırılmış radyoterapi); Kemoterapi kontrendikasyonu olan hastalar için özel radyoterapi ile %14 ve küçük tümörler için tek başına cerrahi ile %10'dur.Fransa'da ve diğer Avrupa ülkelerinde, eşzamanlı preoperatif radyo kemoterapi, alt ve orta rektum T3-T4 ve / veya N + kanserleri için standart bir tedavi olarak kabul edilir. Bir araştırmaya göre, RCC, alt ve orta rektum kanseri vakalarının% 88'inde uygulandı. Serimizde alt ve orta rektum kanserli hastaların % 70,7'sine KRK uygulandı.

4.9 Kolorektal Kanser Tümörü Biyokimyasal Belirteç Çalışmaları

Tümör belirteçleri, bir belirtecin tanısal etkinliğinin duyarlılığı ve özgüllüğü ile ilişkili olduğunu bilerek, semptomatik deneklerde tanı koymada yardımcı olur. Bir belirteç, kanser hastalarının çoğunda ve iyi huylu veya sağlıklı denekte diğer kötü huylu patolojilerde az sayıda gözlenirse yararlıdır. Tümör kütlesi ve hastalığın ciddiyeti ile ilişkili ise artışı ilginçtir. Kansere yol açan mekanizmaların giderek daha ayrıntılı olarak anlaşılması, her tümörün aynı doku lokalizasyonu da dâhil olmak üzere kendi özelliklerine sahip olduğu gerçeğini vurgulamaya yol açar. İşte bu bağlamda kişiselleştirilmiş tıp kavramı ortaya çıktı ve son yıllarda gerçek bir patlama yaşadı. Günümüzde bu yaklaşım günlük bir gerçeklik haline gelmeye başlıyor. Ek olarak, patofizyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılması, ilaç seçiminin yanı sıra dozajın da optimize edilmesini mümkün kılar. Bu optimizasyon sonuçsuz değildir ve bir bütün olarak toplum için faydalıdır. Aslında, bir ilacın uygulanmasının, göz ardı edilemeyecek bir maliyeti vardır, bu nedenle, bir hastada etkisiz olacağı önceden tahmin edilebilecek bir ilacın kullanılması, sınırlandırılmaya değer bir israf teşkil eder. Biyobelirteçlerin katkısı, kesin moleküler tanılamayı mümkün kılması bu nedenle büyük bir zorluktur. Bu, sonuçları aşağıdaki satırlarda sunulan çalışmamızın çerçevesidir.

Bunun için, potansiyel erken biyobelirteçleri ve ayrıca KRAS ontogenisinin aktivasyonu ile ilgili biyobelirteçleri vurgulamak amacıyla kolon tümörünün kapsamlı bir proteomik çalışmasını gerçekleştirmek istedik. Bu çalışmayı genişletmek için, hücre dizilerinin yanı sıra bazıları için ilgili sekretomu da analiz ettik. Ayrıca tümörü değil, tümör stromasını analiz ederek tümörlerin sekretomunu incelemek istedik. Son olarak, hastaların kanında ölçülebilen aday biyobelirteçleri belirlemek için glikoproteomu analiz etmek için bir yaklaşım geliştirmek istedik.

Bu çalışmanın ardından, potansiyel biyobelirteçler için bir araştırma veritabanı oluşturabilecek tümörler veya kolorektal çizgiler tarafından salgılanan proteinlerin bir listesini önerdik. Bu çalışmanın ilk kısmı, potansiyel erken biyobelirteçleri araştırmak için kolorektal tümörlerin küresel proteomunu histolojik aşamalarına göre incelememize yol açtı. Bu bizi, biyokimyasal işaretleyicilerinden biri, OLFM4 olan birkaç potansiyel belirteci tanımlamaya götürdü. Ayrıca, ilgilendiğimiz proteinin KRAS'ta mutasyona

uğramış tümörlerde gerçekten arttığını bulmak için iTRAQTM deneyimlerimizi hastaların KRAS durumuna göre yeniden hesapladık. Daha sonra herhangi bir analizden önce bu proteinin hastanın serumunda tespit edilip edilemeyeceğini bilmek istedik. Bu çalışmanın bir başka ilgisi, biyobelirteçler bağlamında salgılanan proteinlere daha derin bir ilgi göstermemize neden oldu. Bunun için, tümörün salgıladığı proteinlerin muhtemelen büyük bir kısmının bulunduğu tümör stroması olan tümörün acil hücresel ortamını analiz ettik. Amaç, potansiyel biyobelirteçler olabilecek ve tümörlerin ve çevrelerinin analizinden kaçabilecek salgılanan proteinleri tespit etmekti. Diğer bir ilgi, kolorektal tümörlerde bulunan glikosile proteinlerdir. Bu proteinler, biyolojik ortamda stabilite açısından, hastaların kanında birikmeye yetecek kadar bir yarı ömür sağlayan ve ELISA gibi rutin yöntemlerle saptanan önemli avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, proteomik araştırmanın devam ettirilmesi önemlidir çünkü kesinlikle, CRC taramasında güvenilir biyobelirteçlerle doldurulması gereken bir alan vardır (Shatha&Sheikha *et al.* 2012) .

Biomarker/Regulation	Technique	Sample
- Actin beta-like 2 (ACTBL2)	Two-dimensional gel electrophoresis coupled to mass spectrometry (2DE-MS)	CRC tissue
- Dipeptidase 1 (DPEP1)	Fourier transform mass spectrometry (FTMS)	CRC tissue
- Olfamectomedin-4 (OLFM4) - Kininogen-1 (KNG1) - Transport protein Sec-24 (Sec-24)	Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). Further immunohistochemistry validation.	FFPE CRC tissue
- Cyclophilin A - Annexin A2 - Aldolase A	LC-MS	FFPE CRC tissue
- Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1Epidermal growth - factor receptor - Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy-chain family member 4 - Hemopexin - Superoxide dismutase 3	Targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry	Serum
- Mannan binding lectin serine protease 1 - Osteopontin - Serum paraoxonase lactonase 3 - Transferrin receptor protein 1 - Amphiregulin	Liquid chromatography/multiple reaction monitoring-mass spectrometry and proximity extension assay	Plasma
- Serine/threonine kinase 4 (STK4 or MST1)	Mass spectrometry (MS/MS). Also verified with Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).	Serum
- Macrophage mannose receptor 1 (MRC1) - S100 calcium-binding protein A9 (S100A9)	High-performance liquid chromatography (HPLC) and Western blotting.	Serum
- Alpha-1-antitrypsin (SERPINA 1) - Alpha-1 antichymotrypsin (SERPINA 3) - Antithrombin-3 (SERPINC1)	Multiplexed quantification with isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ)	Serum

Biomarker	Relevance	Technique	Sample
- Poly (C)-binding protein 1 (PCBP1)	Oxaliplatin resistance	2D gel electrophoresis followed by MALDI TOF/TOF mass spectrometry	Cell lines and tumoural tissue
- Apolipoprotein E 180 (APOE) - Angiotensinogen (AGT) - Vitamin D binding protein (DBP)	Survival outcomes in patients treated with bevacizumab	Gel electrophoresis (2D-DIGE), followed by LC-MS/MS	Serum
- Phosphorylated EGFR (pEGFR)	Response to Cetuximab	Quantitative proteomic analysis	Plasma
- Proteasome subunit alpha type 1 (PSA1 - Leucine aminopeptidase 3 (LAP3) - Annexin A3 (ANXA3) - Maspin (serpin B5)	Proteomic profiling of antibody-inducing cancer-associated immunogens	Mass spectrometry to evaluated antibody-reactive proteins. Western blotting and immunohistochemistry validation	Serum and CRC tissue
- Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1) - FAST Kinase Domains 2 (FASTKD2) - Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type-2 beta (PIP4K2B) - AT-rich interactive domain-containing protein 1B (ARID1B) - Solute carrier family 25 member 33 (SLC25A33) - Caldesmon 1 (CALD1) - Carboxypeptidase A3 (CPA3) - Beta-1,3-galactosyltransferase 5 (B3GALT5) - CD177 - Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1)	Response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer	Mass spectrometry	FFPE CRC tissue

Mevcut araştırma ilgi alanı, CRC analiz deneyleri sırasında tespit şansımızı artırmak için daha spesifik olarak çalışmalarına izin veren yeni bir analiz yöntemi oluşturmaktır.

4.9.1 Tümörler

Bu çalışmayı gerçekleştirmek için Bölgesel Kanser Kontrol Merkezi (CRLCC) Paul Papin'in tümör bankasında bulunan doku parçaları kullanıldı. Çalışma protokolü ve hasta onam formu Angers Hastanesi ve Paul Papin Batı Kanser Enstitüsü etik komitesi tarafından onaylanmıştır. 1999-2004 yılları arasında toplanan bu dokular, cerrahlar tarafından çıkarıldıktan kısa bir süre sonra sıvı nitrojende -170˚C civarında depolanmakta ve enstitüye özel bir tümör bankası oluşturmaktadır. Tümörden en az 10 cm uzakta bir parça sağlıklı mukoza kesilerek sağlıklı doku elde edilir. Bu tümörlerin durumu, bu örneklerden alınan parantezli kesitlerin hematoksilen, eozin, safran (HES) boyamasını takiben en az iki anatomophatolog doktor tarafından değerlendirilmiştir.

4.9.2 Tümör kesitlerinin oluşturulması ve lazer mikrodiseksiyon

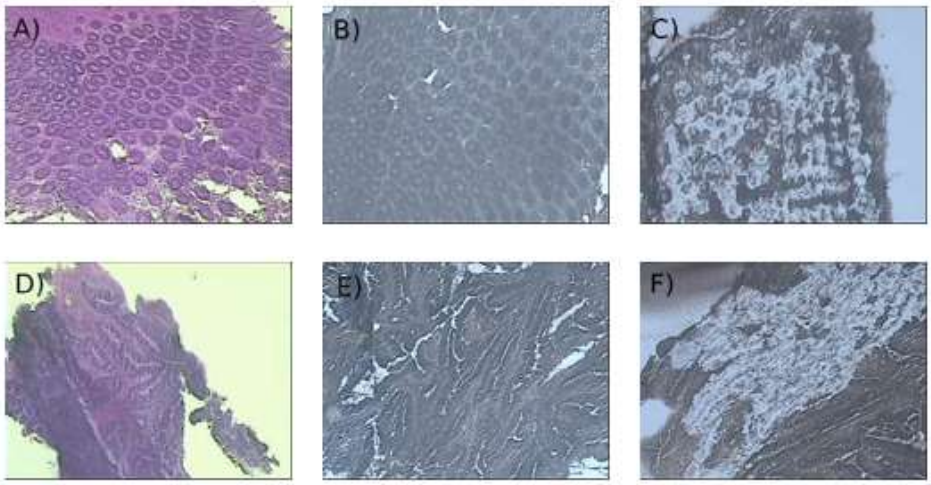
Bir kriyostat (Bright Instrument Co. Ltd.) kullanılarak, bu dokuların 12 μm'lik bölümleri yapıldı, bir slayt üzerine yerleştirildi, ardından kumaşın genel yapısı hakkında bir fikir edinmek için Toluidin mavisi ile boyandı. Bu aşamada, numunenin tümör karakterini sağlamak için anatomofatolog bir doktor tarafından bir okuma yapıldı. İkinci aşamada, artan konsantrasyonlarda birbirini izleyen etanol banyoları sayesinde diğer bölümler dehidrasyona uğradı. Kesimler üzerinde% 70 etanol içinde 30 saniyelik bir banyo,% 90 etanol içinde 30 saniyelik bir banyo ve mutlak etanol içinde iki adet 2 dakikalık banyo ve iki beş dakikalık ksilen banyosu gerçekleştirildi. Susuz kaldıktan sonra, kesitler bir lazer mikrodiseksiyon aşamasından geçerek sadece tümör hücrelerini kurtarmayı mümkün kıldı. Susuz kaldıktan sonra, kesitler bir lazer mikrodiseksiyon aşamasından geçerek sadece tümör hücrelerini kurtarmayı mümkün kılar. Kullanılan cihaz, PixCell II arşivleme görüntü yazılımıyla ilişkili bir PixCell II'dir (Arcturus Engineering, Mountain View, CA).Bu mikrodissektör, dalga boyu $\lambda = 810$ nm olan bir lazer ile donatılmıştır. Kullanılan mikrodiseksiyon parametreleri aşağıdaki gibidir:

- spot çapı: 7,5 μm;

- atış süresi: 70 ms;

- lazer gücü: 70 mW.

Mikrodiseksiyon kapsüllerinin (CapSure LCM kapakları - Moleküler Cihazlar Şirketi - genel olarak 5 adet), mikrodiseksiyonlu hücreleri (yaklaşık 30.000) içeren plastik filmleri, protein liziz tamponunun eklendiği tüplere yerleştirildi.



Şekil 4.14 Sağlıklı kolon dokusu ve tümör dokusu arasındaki karşılaştırma - A) Toluidin mavisi ile boyanmış sağlıklı doku bölümü, B) Susuz kalmış sağlıklı doku bölümü, C) Dehidrasyon sonrası sağlıklı doku bölümü, D) Toluidin mavisi ile renkli tümör dokusu kesiti, E) Susuz tümör dokusu kesiti, F) Mikrodiseksiyon sonrası tümör dokusu bölümü.

4.9.3 Protein ekstraksiyonu, triptik sindirim ve tahlil

Protein ekstraksiyonu, bir ekstraksiyon kiti (Expression Pathology Inc., Gaithersburg, MD) kullanılarak gerçekleştirildi. Sıvı Doku MS protein hazırlama adı verilen bu kit, tümör örneklerinden proteinlerin optimal ekstraksiyonunu sağlar. Kapsüllerin beş plastik filmi düşük adsorpsiyon kapasitesine sahip tüplere yerleştirildikten sonra kitten 20 ila 30 µL ekstraksiyon tamponu ilave edildi ve tamamı 95 ° C'de 90 dakika ısıtıldı.Tüpler daha sonra, numunenin sıcaklığı düşerken yaklaşık 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

4.9.4 Redüksiyon, alkilasyon, ıtraq markalama

Daha sonra, CaCl2 (AB SCIEX, Foster City, CA, ABD) varlığında L- (tosilamido-2-fenil) etil klorometil keton (TPCK, kontamine edici kimotriptik aktivitenin inhibitörü) ile işleme tabi tutulmuş 5 ila 10 µg tripsin - tüplere eklenmiş ve bunlar 37˚C'de yerleştirilmiştir. İlk bir saat çalkalama sırasında düzenli ve kuvvetli çalkalama sağlandı,

ardından gece boyunca gerçekleşen sindirim süresi boyunca hafif çalkalama sürdürüldü. Kalan kapsül kalıntılarını çıkarmak için santrifüjleme yapıldı ve süpernatan çıkarıldı ve yeni bir tüpe aktarıldı. İkincisi daha sonra bir speedvac cihazı kullanılarak tamamen kurutuldu.

Bu şekilde elde edilen kuru topak% 0.5 trifloroasetik asit (TFA) ve% 5 asetonitril (ACN) içeren 100 µL'lik bir çözelti içine alındı. Peptidler daha sonra Sep-Pak C18 kartuşlarında (Waters Corporation, Milford, MA, ABD) tuzu giderildi. Bunun için kolon, 3 mL %100 metanol kullanılarak aktive edildi, ardından 5 mL deiyonize su ile durulandı. Numune daha sonra kolon üzerine yerleştirildi, peptitler daha sonra karbon zincirlerine eklendi. Tuzları uzaklaştırmak için 5 mL su ile durulanmışlardır. Elüsyon daha sonra mL% 100 metanol kullanılarak gerçekleştirildi ve bu metanol speedvac cihazı ile buharlaştırıldı.

Peptidler daha sonra pH 8.5'te 30 µL trietilamonyum bikarbonat (TEAB) (Sigma Aldrich Corporation) içinde yeniden süspanse edildi ve microBCA tahlil kiti (Pierce) kullanılarak tahlil edildi.

Örnek daha sonra 33,3 µg / µL'lik bir konsantrasyona seyreltildi (100 µg peptit 30 µL TEAB içinde).

Tümörlerin her birinden 100 µg peptid daha sonra 60 °C'de bir saat boyunca son 5 mM tris- (2-karboksietil) fosfin (TCEP) eklenerek indirgenmiştir. Bu şekilde indirgenen tiol grupları daha sonra oda sıcaklığında 10 ile 15 dakika son 10 mM metil metan tiyosülfonat (MMTS) ilave edilerek alkile edildi. Her bir iTRAQTM etiketi daha sonra 4-pleks reaktif için 70 µL etanol veya 8-pleks reaktif için 50 µL izopropanol içine alındı. Bu etiketler daha sonra her numuneden 100 µg peptit ile karıştırıldı ve tamamı, oda sıcaklığında iki saat inkübe edildi. Bu etiketleme reaksiyonu, 200 µ L su ilave edilerek durduruldu. Her numuneden 5 µL alındı ve numunelerden peptit miktarlarının eşitliğini kontrol etmek için SM / SM tarafından analiz edilmek üzere karıştırıldı. Bu süre zarfında peptit / etiket karışımlarının geri kalanı speedvac cihazı ile buharlaştırıldı. Peletler daha sonra 100 µL% 0.1 TFA içine alındı ve daha sonra bir Sep-Pack C18(su) kartuşunda tuzu giderildi ve elüsyon için kullanılan metanol speedvac cihazı ile

buharlaştırılmıştır. Bu aşamada, farklı etiketlerle işaretlenmiş dört veya sekiz numune karıştırılmıştır.

4.9.5 OFFGEL izoelektrik odaklama

Peptitlerin ayrılmasının birinci boyutu, OFFGEL tekniği kullanılarak izoelektrik noktalarına göre gerçekleştirildi. Bunun için 24 kuyucuklu konfigürasyonda 3.100 OFFGEL Fraksiyonlayıcı (Agilent) kullandık. Böylece yirmi dört fraksiyon üretildi. Peptit topakları, 3.6 mL% 2.4 gliserol solüsyonu ve %1 IPG tamponu pH 3-10 (GE Healthcare) içinde yeniden çözündürülür. İçinde 3 ile 10 arasında değişen bir pH gradyanının oluştuğu bir akrilamid jeli içeren şerit, kuyucukların dibinde biriktirildi ve kuyucukların kapatılmasına izin vermek için 15 dakika boyunca bu aynı solüsyonla yeniden rehidre edildi. Daha sonra numuneleri içeren 150 µL çözelti kuyucuklara yerleştirildi. Elektrofokus daha sonra 20˚C ve 50 µA'da gerçekleştirildi. İzoelektrik odaklamadan sonra, 24 fraksiyon çıkarıldı, ardından kuyucuklar %50 metanol ve %1 formik asitten oluşan 200 µL'lik bir solüsyonla yıkandı.30 dakika sonra, kap yıkama çözeltisi karşılık gelen örneğe ilave edildi ve tamamı SpeedVac cihazı ile buharlaştırıldı. En fazla gliserol ve etiketli peptidler içeren peletler, ayırma adımı nano-RPLC üzerinde gerçekleştirilene kadar -20 ° C'de saklandı.

4.9.6 RPLC ile ayırma

Fraksiyonların her birinin peptitleri, Ultimate 3000 nano-LC sisteminin (Dionex, Sunnivale, CA) C18 kolonuna enjekte edilmeden önce 20 µL % 0.1 TFA solüsyonunda yeniden çözündürüldü.300 nL / dk'lık bir akışla PepMap100 tipi, 3 µm, 100 Å, 75 µm iç çapı 15 cm uzunluğunda (Dionex) bir C18 kolon kullandık. Çözücü A, % 0.05 TFA içeren suda % 2 ACN'den ve Çözücü B, % 0.04 TFA içeren suda % 80 ACN'den oluşuyordu. Peptidler, koruyucu kolon üzerinde çözücü A kullanılarak üç dakika süreyle tuzu giderildi, ardından 105 dakikalık bir ayırma aşaması gerçekleştirildi. Kullanılan gradyan aşağıdaki gibiydi:

4.9.7 MALDI TOF / TOF kütle spektrometrianalizi

-% 0'den % 20'e kadar B: 10 dak;

-% 20'den% 45'e kadar B: 85 dak;

-% 45'den % 100'e kadar B: 10 dak.

Bu programın on ikinci dakikasında Probot'a (Dionex) bir başlangıç sinyali gönderilerek numunenin doğrudan kütle spektrometresi (1,664 spots / plate; Applied Biosystems, Foster City, CA) ile uyumlu plakalar üzerinde toplanması ve depolanması sağlanır. Bu cihaz, numunenin önceden seçilmiş bir matris ile birlikte depolanmasını mümkün kılar. Burada numuneler,% 70 ACN ve% 0.1 TFA'dan oluşan bir karışım içinde 2 mg / mL konsantrasyonda α-siyano-4-hidroksisinnamik asit CHCA (LaserBioLabs, Sophia-Antipolis, France) ile birlikte depolanmıştır.İkincisi, Probot T sistemine sürekli olarak 1,2 µL / dk'lık bir akış hızında enjekte edilir, bu da 1 numuneye 4 matris oranında noktalar elde etmeyi mümkün kılar. Bu noktalar altı saniye süreyle toplandı.

4.9.8 Proteomik analiz araçları

İlgilenilen proteinlerin ontolojisi GoMiner yazılımı kullanılarak analiz edildi. İQuantitator analizi için seçilen tüm proteinler bir karşılaştırma listesi olarak kullanılmıştır. İstatistiksel hesaplama için 5'ten fazla proteini gruplayan ontolojik terimlerin her biri kullanıldı. Tam bir Fisher testi kullanılarak her terim için bir p değeri hesaplanabilir. Yanlış pozitif oranı, karşılaştırma listesi olarak rastgele seçilen 1000 proteinden oluşan havuzlar kullanılarak belirlendi.

4.9.9 İmmüno histokimya

Aday proteinlerin müdahale ettiği ağların analizi, MetaCore v4.7 yazılım paketi (GeneGo, Inc., St. Joseph, MI) kullanılarak gerçekleştirildi ve istatistiksel gösterge

olarak 0,01'den küçük p değerleri kullanılarak ifade varyasyonları karşılaştırılmıştır. İndirilen dosyalardaki gen tanımlayıcıları, MetaCore'daki fonksiyonel ontolojilerden gelenlerle eşleştirilmiştir. Kolorektal adenomalı veya adenokarsinomlu 126 hasta immünohistokimya ile çalışıldı. Tüm tümörler, Paul Papincenter ve Angers üniversite hastanesinin anatomopatoloji laboratuvarından elde edildi ve 2000 ile 2005 yılları arasında toplandı. Bazı örnekler, özellikle genç hastalar (40 yaş altı) veya kemoterapi almış tümörler hariç tutulmuştur. Bu tümörlerin neredeyse tamamı kolon veya üst rektumda lokalizeydi. Displazisi mimari ve sitolojik özelliklere göre sınıflandırılan 15 düşük dereceli adenom ve 15 yüksek dereceli adenomlu 30 adenom vardı. Ayrıca 72 kolorektal adenokarsinom vardı. Amerikan Ortak Kanser Komitesi'nin yedinci TNM sınıflandırma sistemine göre, karsinomların her birinde tümör istilasının derinliği beş gruba ayrılmıştır: T, yerinde veya mukoza ile sınırlı karsinomdur; T1 submukozayı istila eder; T2 muskularis istila eder; T3, subserosa'yı istila eder ve T4, serozanın ve bitişik organların ötesini istila eder. Bu nedenle lenf düğümü metastazlarının durumu, aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır: N0, lenf düğümlerinde bölgesel metastaz yokluğu;N1, lenf düğümlerinde bulunan bir ile üç bölgesel metastaz ve N2, lenf düğümlerinde bulunan dört veya daha fazla lenf düğümü metastazı. Ve uzak metastazların varlığı şu şekilde sınıflandırıldı: M0, uzak metastaz yokluğu; M1, uzak metastaz varlığı.

Her numune için tümörün ve sağlıklı mukozanın enine kesitini temsil eden bir kesit seçildi. İmmünohistokimya, OLFM4'e yönelik bir antikor (katalog numarası ab78496; Abcam, Cambridge, MA; 1:25) kullanılarak formalin ile sabitlenmiş 4µm kalınlığında formalinle sabitlenmiş kesitler üzerinde gerçekleştirildi. İmmün boyama tekniği, otomatik doku boyama (Ventana) ile ilgili bir sistem tarafından gerçekleştirildi.Etiketli hücreler - <% 10 ⇒ 0; % 10 ile% 30 arasında ⇒1; % 30 ile % 50 arasında ⇒2; arasında Görüntü analizi için,% 50 ve% 70 ⇒ 3'e dayalı bir puan verdik; >% 70 ⇒ 4 -. Daha sonra, etiketlenmiş hücrelerin etiketleme yoğunluğu değerlendirildi - hiçbiri ⇒ 0; düşük ⇒ 1; orta ⇒2; ve güçlü ⇒ 3 - daha sonra bu değerleri çarparak bu verilerden bir puan oluşturuldu - negatif ⇒ 0; zayıf pozitif ⇒ 1-3; pozitif 4-7; güçlü pozitif ⇒ 8-12 - ve sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildi.

Öznelliği dışlamak için tüm bölümler, hastanın kimliği veya klinik durumu hakkında hiçbir bilgisi olmayan iki patolog tarafından değerlendirildi. Uyumsuz vakalarda iki doktor bölümleri birlikte inceleyerek fikir birliğine vardı.

4.9.10 Western Blot

Normal ve tümör dokularından toplam tümör ekstreleri hazırlandı. Dondurulmuş doku örnekleri homojenize edildi ve tekerlek üzerinde 1 saat boyunca 4˚C'de 7 M üre, 2 M tiyoüre ve% 4 (w / v) CHAPS içeren bir tamponda parçalandı. Numunenin netleşmesi, buz üzerinde sonikasyon (5 saniyelik üç vuruş) ile gerçekleştirildi ve lizatlar, 14,000 g'de 4˚C'de 15 dakika santrifüjlendi. Protein konsantrasyonları, FluoroProjeli Protein Niceleme Kiti (Sigma) kullanılarak, aralık için sığır serum albümini BSA kullanılarak belirlendi ve eşit miktarlarda protein (şerit başına 50 µg), % 10 akril amid içeren bir SDS-PAGE jeli üzerinde ayrıldı. Proteinler daha sonra PVDF membranlarına aktarıldı. TBS (0.1 M, pH 7.4) içinde% 5 BSA ile bloke edildikten sonra membranlar, birincil antikorlar (seyreltme 1: 500) ile 4 ° C'de gece boyunca inkübe edildi. P-tubulin bolluğu bir yük kontrolü olarak kullanıldı ve bir tavşan anti-P-tubulin (H-235) poliklonal antikoru (sc-9104, Santa Cruz Biotechnology Inc.) ile belirlendi. Membranlar, birincil antikora karşılık gelen ikincil antikor ile inkübe edildi ve oda sıcaklığında % 1 BSA ile bir saat seyreltildi. Bu aşamadan sonra, zarlar TBS içinde% 0.05 Tween ile üç kez yıkandı. Membran, belirtilen antikorlarla araştırıldı ve ECL ile ortaya çıkarıldı.

4.9.11 ChIP

HT29 hücreleri,% 1 formaldehit ile sabitlendi.10 dakika sonra hücreler soğuk PBS ile yıkandı ve 500 µl ChIP tamponu (50 mMTris-HCl, pH 8.1,% 1 SDS, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg / mL aprotinin, 10 µg / mL leupeptin, 10 ug / mL pepstatin, 1 mM Na3VO4, 50 mMNaF).Kromatin, sonikasyon yoluyla ortalama 500 bp boyuta sahip parçalara parçalandı. Kromatin içeren çözelti 1 hacim seyreltme tamponu (2 mM EDTA, 20 mMTris-HCl, pH 8.1, 1% Triton X-100, 0.1% NP-40, 150 mMNaCl, 1 mM

PMSF, 10 µg / ml aprotinin, 10 µg / ml leupeptin, 10 µg / ml pepstatin, 1 mM Na3VO4, 50mM NaF) ile seyreltilir ve somon sperminden elde edilen DNA ile önceden işlenmiş protein A-agaroz ve protein G-Sepharose ile tekerlek üzerinde 4˚C'de bir saat inkübe edildi. Kromatin daha sonra 1 µg spesifik antikorlar veya bakteriyel protein GAL4'e yönelik antikorlar ile tekerlek üzerinde 4 ° C'de gece boyunca inkübe edildi. Protein A-agaroz ve protein G-Sepharose (somon sperm DNA'sı ile ön işleme tabi tutulmuş) ile çökeltildikten sonra kromatin, 65 VS'de 5 saat boyunca bir elüsyon tamponu (% 1 SDS, 100 mM NaHC03) ile ayrıştırıldı. DNA daha sonra fenol kloroform ile ekstrakte edildi ve sonra etanol ile çökeltildi. Peletler daha sonra hava ile kurutuldu ve 100 µl steril su içinde çözüldü. Daha sonra PCR reaksiyonlarını gerçekleştirmek için 4 µl kullanıldı.

4.9.12 Hücre modelleri

OLFM4'ün rollerini incelemek için birkaç hücresel model kullandık. İlk olarak, OLFM4 ekspresyonu doksisikline indüklenebilir bir promotere bağlı olan bir HCT116 kolorektal adenokarsinom hücre modeli (ATCC: CCL-247) oluşturduk. Bu hücreler, bazal seviyede OLFM4'ü eksprese etmez. Aksine, hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde OLFM4'ü kuvvetle ifade ettikleri başka bir kolorektal adenokarsinom hattı olan LS180'de (ATCC: CL-187) RNA girişim deneyleri gerçekleştirebildik.

OLFM4 ve Ras arasındaki bağlantının incelenmesi, onkojen H-RASV12 ekspresyonu doksisikline indüklenebilir bir promoterin bağımlılığı altında olan kolonik adenokarsinom hücreleri HT29 (ATCC: HTB-38) laboratuvarında bulunan bir model sayesinde gerçekleştirilebilir.

Büyük miktarlarda OLFM4 üretmek için ayrıca COS-7 hücreleri (ATCC: CRL-1651) kullandık. Onlar Cercopithecus aethiops böbreğinden gelirler ve önemli miktarda protein üretebilirler. Bu hücreler, OLFM4'ü kodlayan bir ifade vektörü ile transfekte edilmiş olabilir. Proteinin salgılanması, kültür süpernatanlarından önemli miktarları geri kazanmamızı sağladı. Ayrıca, proteomlarını incelemek için laboratuvarda sahip olduğumuz diğer hatları da kullandık. Bu nedenle LS174T hücrelerinin proteomunu

analiz ettik (ATCC: CL-188).Bunlar 58 yaşındaki bir hastanın kolorektal adenom hücreleridir. Bir kolon karsinomundan RKO hücreleri (ATCC: CRL-2577) inceledik.

SW48 hücreleri (ATCC: CCL-231) analiz edildi. Bunlar 79 yaşındaki bir hastanın adenokarsinomundan hücreler.

SW1417 hücreleri (ATCC: CCL-238) incelenmiştir. Bunlar 53 yaşındaki bir hastaya aittir.

SW1463 hücreleri (ATCC: CCL-234), 66 yaşındaki bir hastada bir adenokarsinomadandır.

SW480 (ATCC: CCL-228) ve SW620 (ATCC: CCL-227) hücreleri aynı hastadandır. SW620 hattı, bu hastanın bir metastatik bölgesinden üretildi.

4.9.13 Kültür şartları

Önceki paragrafta sunulan hücreler antibiyotik olmadan RPMI-1640 ortamında (Lonza) tutuldu ve %10 fetal buzağı serumu (SVF) ile desteklendi. Konsantrasyon yaklaşık %80'e ulaştığında hücreler geçirildi ve 1/6 oranında seyreltildi. Her haftanın başlangıcında, mikoplazma kontaminasyonunun olmadığı bir MycoAlert kiti (Lonza) kullanılarak kontrol edildi. Hücreler, % 5 CO2 içeren bir atmosferde ve 37˚C sıcaklıkta kültürlendi. Süpernatanların analizi durumunda, hücreler genellikle normal kültür koşulları altında 24 saat süreyle muhafaza edildi. Daha sonra % 10 FCS içeren RPMI-1640 ortamı elimine edildi. Daha sonra PBS ile iki yıkama gerçekleştirildi, daha sonra ortam, SVF içermeyen RPMI-1640 ile değiştirildi. Hücreler böylelikle 24 saat inkübatörde tutuldu ve daha sonra ortam geri kazanılabilir.

4.9.14 Hücresel protein ekstrelerininhazırlanması

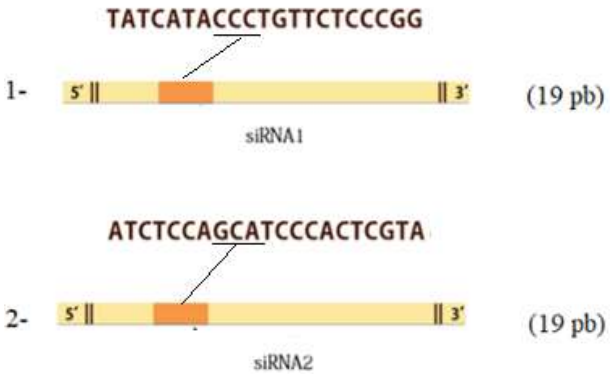
15 cm çapındaki kültür kaplarında 20 milyon hücre tohumlandı. Normal koşullarda 48 saat kültürden sonra tabaklar toplandı ve ortam aspire edildi. Bir PBS yıkaması

gerçekleştirildi ve ardından hücrelerin mekanik olarak kazındığı 10 ml eklendi.Daha sonra 15 mL'lik bir tüpe yerleştirildi, daha sonra santrifüjle peletlendi ve 1.5 mL'lik bir Eppendorf tüpüne aktarıldı.

Daha sonra hücreleri parçalamak için yaklaşık 300 uL FASP liziz tamponu (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M DTT, % 4 SDS pH 7.3) ilave edildi. Tüp 95 ° C'de 5 dakika ısıtıldı ve daha sonra her 20 saniyede, üç kez 20 saniyede sonike edildi. Daha sonra potansiyel döküntüyü peletlemek için 14,000 g'de santrifüj yapıldı. Süpernatan daha sonra FASP için hazırdı.

4.9.15 Girişim RNA

LS180 hücrelerinde OLFM4 ekspresyonunu inhibe etmek için, OLFM4'e yönelik iki siRNA'dan (her biri 20 pM) oluşan bir havuz, üreticinin talimatlarına göre transfeksiyon ajanı Dharmafect-4 (Dharmacon) ile transfekte edildi. RPMI-1640'ın ml'si başına 800,000 hücre içeren bir süspansiyon hazırlandı ve ikincisinden 800 µL kuyunun dibine bırakıldı. Bu arada, 4µL Dharmafect-4 ve iki siRNA'nın her birinden 2 µL içeren bir çözelti, 800 µL OptiMEM içinde oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Bu 800 µL daha sonra hücre süspansiyonu üzerine damla damla bırakıldı. 24 saatlik kültürden sonra ortam,% 10 FCS ile yeni RPMI-1640 ile değiştirildi. Bu siRNA'ların dizileri Şekil 4.14'deki gibidir:



Şekil 4.15 OLFM4'e yönelik iki siRNA'ların dizileri

4.9.16 Kürelerin Oluşumu

96 oyuklu bir plakada, oyukların dibinde 70 µL RPMI-1640% 2 sıcak agar biriktirildi. Bu oyuklar 100 µL RPMI-1640 ile doldurulduu. 2.000 hücre içeren 10 µL'lik damlalar, plakanın kapağına, oyukların her sınırlandırmasının tam ortasına yerleştirildi. Kapak daha sonra 48 saat süreyle nazikçe plaka üzerine yerleştirildi. Hücreler bir araya toplanan damlada çökeldi.

48 saat sonra, üretilen trimental yapıyı düşürmek için kuyulardaki içerikler boşaltıldı ve plaka tezgâha vuruldu.

Oyuklar daha sonra% 10 FCS içeren 100 uL RPMI-1640 ile doldurulduu.

Hücreler böylece 7 gün kültürlendi. Daha sonra her kuyunun fotoğrafları alındı ve ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edildi.

4.9.17 OLFM4 ELISA Testleri

OLFM4 ELISA testleri, hasta serumları üzerinde gerçekleştirildi. Üreticinin tavsiyelerine göre ticari bir kit kullanılarak yapılmıştır (SEA162Hu, USCN Life Science Inc. Wuhan, Çin). Erken bir biyobelirteç adayı olarak hipotezimizi test etmek için 60 sağlıklı hastada ve 14 polipli hastada OLFM4'ü ölçebildik. Tümörlerdeki KRAS mutasyonunu takiben düzensiz bir protein olarak OLFM4 hipotezini test etmek için 45 farklı hastada bu testleri de gerçekleştirdik. Serumlar, toplandıktan sonra doğrudan -80˚C'de saklandı ve test için yalnızca bir kez çözülmeleri için bölündü. Çözüldükten sonra serum, üreticinin tavsiyelerine göre PBS içinde 1/20 oranında seyreltildi.

4.9.18 Klonojenite Testleri

Hücreler, göz başına 300 hücre oranında 6 çukurlu plakalara ekildi. Hücrelerin plakanın tabanına yapışmasından sonra (yaklaşık 6 saat), OLFM4 ekspresyonunun indüksiyonu,

doksisiklin son olarak 200 ng / ml ilave edilerek sağlandı ve sn38 ile muamele, eşzamanlı olarak 0.5 ng / ml'lik bir konsantrasyonda gerçekleştirildi.

4.9.19 FASP

Numuneler, 100 mM DTT (ditiyotreitol), TRIS (tris (hidroksimetil) aminometan) ve% 4 SDS (Sodyum dodesil) içeren bir liziz tamponunda lize edildi.

4.9.20 Glikopeptit zenginleştirme

Lizis tamponunda DTT'nin varlığı, disülfür köprülerinin ilk liziz adımlarından indirgenmesini mümkün kılar.

Örnek, hücre çizgilerinin bir lizatı olduğunda, verimli liziz sağlamak için 95˚C'de 5 dakika ısıtıldı. Dondurulmuş dokudan elde edilen tümör numuneleri durumunda, parçalanan numune, dokunun yapısını tamamen denatüre etmek için 90 dakika süreyle ısıtıldı.

Numune daha sonra arıtma için sonikasyona tabi tutuldu, daha sonra lizat, moleküler ağırlığı seçilen bir hedef değerden daha düşük olan moleküllerin geçmesine izin verebilen bir membran içeren bir sentrikon içine yerleştirildi. Bizim durumumuzda, 30kDa (Millipore) hedef değeri seçtik çünkü Wisniewsky ekibi bunun glikopeptidlerin çalışması için en iyi çözüm olduğunu gösterdi (Wisniewski *et al.,* 2011b).

8M üre, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 içeren bir tamponla yıkamalar (6 kez 200 µL) ve bu nedenle yüksek kaotropik güç SDS'nin boşaltılmasını mümkün kılmıştırBu yıkamalara 14.000 g'de 6 dakika santrifüj ile izin verildi. Aynı zamanda üre tamponunda, serbest tiol gruplarının alkilasyonu, 50 mM iyodoasetamid (GE Healtcare) veya 10 mM metilmetantiyosülfonat (MMTS) (Sigma) ilavesiyle gerçekleşir. Daha sonra, üre içeren tampon kullanılarak alkilleyici kimyasal reaktifi çıkarmak için yıkamalar (6 kez 200 µL) tekrar gerçekleştirildi. Bu tampon daha sonra kademeli olarak (200 µL'lik 6 yıkama) pH 8'de 50 mM amonyum bikabonat veya TEAB (Sigma) 0.5 M pH 8.5

(Trietilamonyum bikarbonat) gibi tripsinin etkisiyle uyumlu bir tamponla değiştirildi. Daha sonra proteinler, tripsin (100 µg peptit başına 10 µg) ile sindirildi. Üretilen peptitler daha sonra filtreden geçebildi ve böylece yeni bir toplama tüpünde basit santrifüjleme ile geri kazanılabilir.

Peptidler daha sonra bir dizi BSA'ya kıyasla microBCA kiti (Pierce) kullanılarak analiz edildi.

4.10 Glikopeptitlerde zenginleştirme

4.10.1 Lektinlerde zenginleşme

FASP (800 µg) peptidleri bir C18 kolon (Waters) üzerinde Sep-Pack üzerinde tuzdan arındırıldı, ardından kuru topaklar 400 µL lektin fiksasyon tamponu (1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MnCl_2$ 0.5 M NaCl in 20 mMTris-HCl pH 7.3) içinde yeniden çözündürüldü. Daha sonra tüpe 800 µg konkanavalin A ve 800 µg WGA ilave edildi ve bu daha sonra gece boyunca 4˚C'ye yerleştirildi. Bu aşama, glikosile peptidlerin lektinlere bağlanmasına izin verir.

Tüpün tüm içeriği daha sonra durulamaya izin vermek için 30 kDa'lık bir centricon üzerine yerleştirildi. Sabitleme tamponu ile iki yıkama ve ağır su içinde alınan 50 mM amonyum bikarbonat PH 8 ile iki yıkama gerçekleştirildi. Daha sonra 3 birim PNGase F ilave edildi ve tamamı, glikosilasyona ve daha sonra santrifüj ile geri kazanılabilen glikosile peptitlerin salınmasına izin vermek için 37 ° C'de 4 saat süreyle inkübe edildi. Elde edilen peptitler, OFFGEL tekniği ile pH 3 ila pH 10 arasında değişen on iki fraksiyona ayrıldı.

4.10.2 Hidrazin boncuklarında zenginleştirme

İlk aşamada glikopeptidler, şeker kalıntıları üzerinde son 15 mM'de sodyum meta-periodat vasıtasıyla oksitlenir. Cis-diol fonksiyonları daha sonra aldehit fonksiyonları haline gelir. Serbest aldehit fonksiyonları son derece reaktiftir ve bir kovalent bağ

oluşturmak için hidrazinlerin (Bio-Rad) amin fonksiyonları (NH_2) üzerinde reaksiyona girerler. Bağlanmamış proteinler veya peptitler daha sonra sadece boncuklara bağlı olanı koruyarak yıkama yapılarak ayrıştırılabilir. PNGaseF (P7367, Sigma-Aldrich) gibi bir deglikosilasyon enziminin etkisi, daha sonra kütle spektrometresi ile analiz edilebilmeleri için sabit peptitlerin salınmasını mümkün kılar. Testlerimizde başlangıçta 100 µg peptid başına 3 birim enzim kullandık.

4.11 OLFM4'ün Yönlendirilmiş Mutagenezi

Elimizde OLFM4'ü (SC108914, Origene) kodlayan bir pCMV6-XL4 ekspresyon plazmidi vardı. Bu nedenle, mutasyonların bu plazmitlere (Applied biosystem) sokulmasını gerçekleştirmek için bölgeye yönelik bir mutajenez kiti kullandık. Tüm kuşkonmaz alanin ile değiştirilmiştir. Astar dizileri aşağıdaki gibidir:

Çizelge 4. 4 OLFM4'ü mutasyona uğratmak için kullanılan mutagenez primerleri

Site	Sense primer	Antisense primer
72	5'-TGTCCCAGTTGTTTTCCGCTTTCACCGGCTCCGTGG-3'	5'-CCACGGAGCCGGTGAAAGCGGAAAACAACTGGGACA-3'
253	5'-GTCATGGTGGTGTGGTGGCCATCAGCAAACCGTCTG-3'	5'-CAGACGGTTTGCTGATGGCCACCACACCACCATGAC-3'
352	5'-CGGGAATATTGCCAGAGTTGCCCTGACCACCAACACGA-3'	5'-TCGTGTTGGTGGTCAGGGCAACTCTGGCAATATTCCCG-3'
356	5'-CAGAGTTAACCTGACCACCGCCACGATTGCTGTGACTCAA-3'	5'-TTGAGTCACAGCAATCGTGGCGGTGGTCAGGTTAACTCTG-3'

4.12 Tümör Stromasının İncelenmesi

Bu çalışma için iki kolorektal tümörü analiz ettik. Kesitler, tümörlerin analizi ile aynı protokole göre dehidre edildi.Sadece tümör stromasına karşılık gelen alanları mikrodisekte ettiğimiz tümör başına 50 kapsül oluşturduk.Bu mikrodiseksiyon, tıbbi bir patolog gözetiminde yapıldı.Kapsüllere bağlanan hücreler daha sonra 500 uL FASP tamponu içinde lize edildi, 95 ° C'de 90 dakika ısıtıldı ve proteinleri içeren süpernatantı geri kazanmak için santrifüjlendi. FASP protokolü daha sonra uygulanabilir.

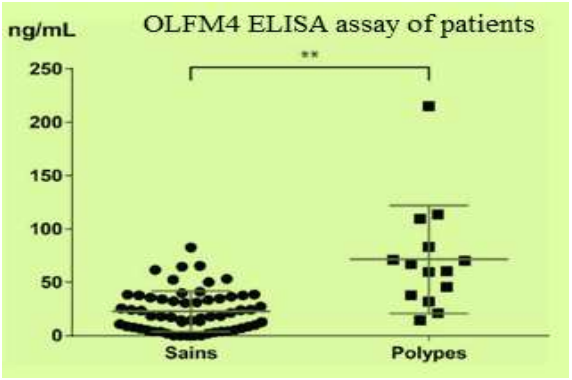
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1 OLFM4'ün Glikosile edilmesi

OLFM4 daha önce tarif ettiğimiz sonuçlara göre, sadece glikosile edilmiş form hücre tarafından salgılanabilir görünmektedir.OLFM4'ü kodlayan bir ifade vektörü ile transfekte edilmiş COS7 süpernatantları üzerindeki glikosile proteinleri analiz etmek için proteomik bir yaklaşım geliştirdik. Bu, OLFM4'te bulunan birkaç glikosilasyon bölgesini tanımlamamıza izin verdi. Tekniğin alaka düzeyini ve sağlamlığını doğrulamak için, vurgulanan bölgelerde OLFM4'ün mutantlarını da ürettik.

5.2 Erken Tümörlerin Saptanması İçin OLFM4'ün Belirteç Olarak Kullanılması

OLFM4, hasta serumlarında saptanabilen salgılanan bir proteindir ve erken tümörler için potansiyel bir belirteçtir. İlk adımda, sağlıklı hastalarda ve prekanseröz tümörlü (polipler) hastalarda OLFM4'ü ölçmek istedik. Sağlıklı hastalardan 60 serum ve polipli hastalardan 14 serum elde edebildik. Ticari bir ELISA kiti kullanarak bu hastaların serumlarında OLFM4'ü test ettik. OLFM4'ün bazal seviyesi 20 ± 6 ng / mL'dir. Sonuçlar Şekil 5.1'de sunulmuştur.

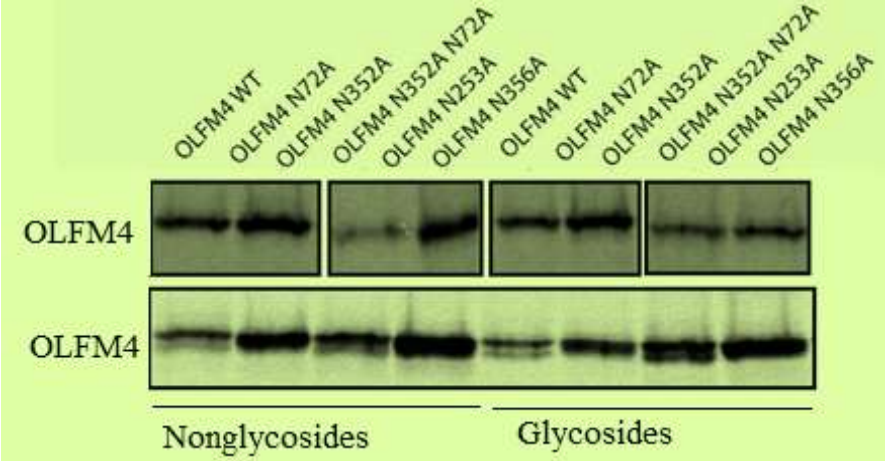


Şekil 5.1 Polipli hastalardan alınan serumlar üzerinde gerçekleştirilen ELISA testlerinin ön sonuçları

Başlangıç niteliğinde olmasına rağmen bu sonuçlar, OLFM4'ün polipli hastalarda önemli ölçüde aşırı ifade edildiğini göstermektedir. Testler için elde edilen değerler, kitin saptama sınırından en yüksek konsantrasyona sahip hasta için 215 ng / mL değerine kadar değişmiştir. Bazal oran yaklaşık 20 ng / mL ± 6 ng / mL'dir.

5.3 Siteye yönelik mutagenez ile glikosilasyon bölgelerinin doğrulanması

OLFM4'ün birkaç potansiyel glikosilasyon bölgesini analiz etmek için, 72, 352, 253 ve 356 pozisyonlarında bulunan asparaginler üzerinde mutantlar yapmayı seçtik çünkü bu pozisyonlar, fazlalıkları göz önüne alındığında, alaka düzeyinden en emin olduğumuz pozisyonlardır. Ayrıca 72 ve 352 pozisyonlarında bir çift mutant ürettik. OLFM4'ün vahşi sekansının asparaginleri, alaninlerle ikame edilmiştir. Mutasyonun gerçekten de ilk diziye entegre edildiğini doğrulamak için sıralama gerçekleştirildi. Bu glikosilasyon bölgelerini doğrulamak için Cos-7 hücrelerini bu mutantlarla transfekte ettik ve glikosilasyon ile bağlantılı protein boyutunda varyasyonlar gözlemleyip gözlemlemediğimizi görmek için bir western blot yaptık. Şekil 5.2'de gösterildiği gibi, farklı glikosilasyon bölgelerinin mutasyonunu takiben OLFM4'ün boyutunda gerçekten bir fark vardır. Bu, bu sitelerin aslında bu proteinin glikosile edilmiş siteleri olduğunu doğrular. Şekilde gösterildiği gibi, 72 ve 352 pozisyonlarında bir çift mutant da ürettik. Sekresyon, tekli mutantlara ve proteinin vahşi formunu içeren vektöre kıyasla çok belirgin şekilde azalır. Bu, OLFM4'ün glikosilasyonunun salgılanması için gerekli olduğunu doğruluyor gibi görünüyor. Son olarak, biyoinformatik tarafından tahmin edilmeyen ve bir konsensüs sekansının parçası olmayan bir glikosilasyon yeri belirleyebildik. Bu, konsensüs dizilerinin dışında N-glikosilasyonların olabileceğini gösterir.

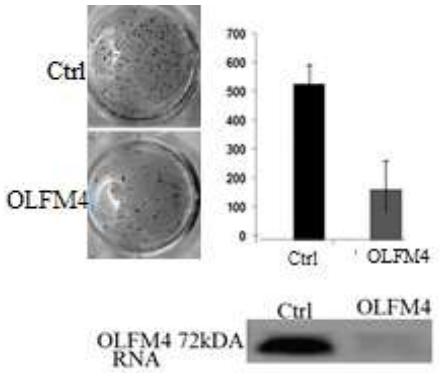


Şekil 5.2 Glikosilasyon bölgelerinin western blot ile doğrulanması - COS7 hücreleri ve HCT116 hücreleri, OLFM4'ün mutant formlarını kodlayan plazmitlerle transfekte edilmesi ve süpernatanlar western blot ile analizi

5.4. OLFM4: Hücrenin Hayatta Kalmasına Etkisi

Bu bölümde, OLFM4'ün tümöre hayatta kalma veya tedavilere direnç açısından ne gibi faydalar sağlayabileceğini bilmek istedik. Bunun için, indüklenebilir bir sistem sayesinde e ff ve doksisiklin altında OLFM4 ekspresyonunu indükleme kapasitesine sahip HCT116 hücreleri üzerinde klonojenisite testleri gerçekleştirdik. İlk olarak, indüklenebilir model, indüksiyondan sonra kültür süpernatantlarında OLFM4'ün varlığı açısından western blot ile bakılarak doğrulanmıştır. Daha sonra, etki altındaki kolonilerin sayısında ve hala önemli olan OLFM4 ekspresyonunun indüksiyonunda küçük bir artış gözlemledik. Ek olarak, bu artmış ifadenin HCT116 hücrelerine, metastatik kolorektal kanserler için ana tedavilerden biri olan Sn38'e hafif bir direnç verdiğini gözlemledik (Şekil 5. 3). Ayrıca, önemli bir bazal ekspresyon, LS180 olan hücrelerde RNA enterferansı ile OLFM4 ekspresyonunu inaktive ederek bunun tersini görmek istedik. Bu enterferans RNA deneylerini takiben klonojenisite testleri gerçekleştirilmiştir ve bu testler, test koşulunda oluşan koloni sayısında kontrol durumuna kıyasla önemli bir azalma (% 50) göstermektedir. Bu hücre ölümünü açıklayan mekanizmayı keşfetmek için tamamlayıcı akış sitometrisi deneyleri yapıldı. Bu sonuçlar, OLFM4'e yönelik girişim RNA'sının transfeksiyonunu takiben kaspaz 3'ün

bölünmesinde bir artışı gösterir ve bu ikincisinin hücreleri apoptozdan koruduğunu gösterir.LS180 hücrelerinde OLFM4'e yönelik bir enterferans RNA'sı, hücre dışı ortamda (n = 5) bulunan OLFM4 miktarını azaltmayı mümkün kılar. Bu azalma, RNA interferans kontrolü (n = 3) ile karşılaştırıldığında bu hücrelerin ölümünü artırma etkisine sahiptir.

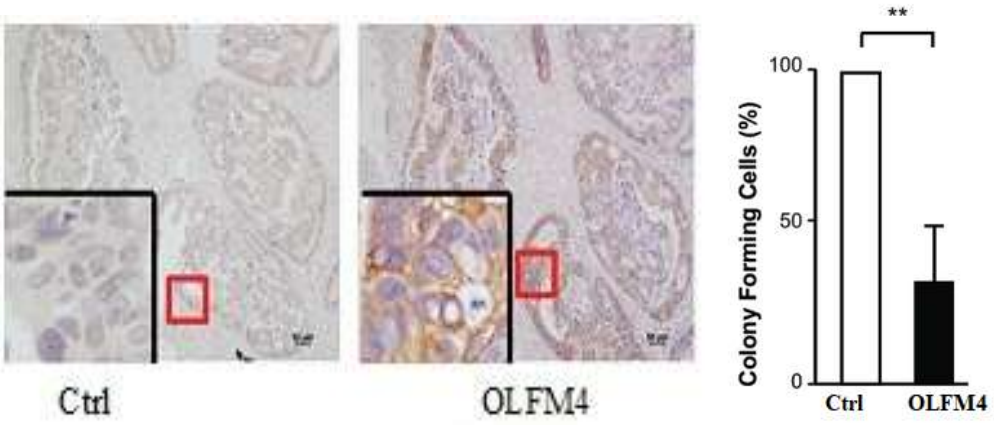


Şekil 5.3 LS180 hücrelerinde OLFM4'e yönelik bir enterferans RNA'sının transfeksiyonu

5.5. OLFM4: Hücrelerin Üç Boyutlu Yapılar Oluşturma Kapasitesine Etkisi

OLFM4, elastin, laminin ve hatta fibronektin gibi kolajen tip I veya IV ile aynı şekilde hücre-hücre temaslarında yer alan bir protein olduğu da bilinen bir proteindir. Ve bu hücrelerin belirli kültür koşulları altında üç boyutlu yapılar oluşturma kapasitesini test ettik (Kabouri 2000). Şaşırtıcı bir şekilde, olfaktomedin 4'ün HCT116 hücrelerinde indüksiyonu, 3D yapıların boyutunda bir azalmaya (hem oluşturulan yapıların alanı açısından hem de çapları bakımından) ve oluşan kürelerin sayısında bir artışa yol açar. Görüntü J yazılımında potansiyel olarak var olan hataları önlemek için otomatik parametreleri kullanmadık, ancak yüzeyi elde etmek istediğimiz alanları el ile sınırlandırarak analizler yaptık. Bu sonuçlar, bu proteinin muhtemelen hücre ayrışmasının düzenlenmesinde ve üç boyutlu yapıların oluşumunda rol oynadığını göstermektedir. Hücre-hücre temaslarını azaltmanın bu özelliklerinin, onu, potansiyel

olarak metastatik yayılma sürecine müdahale edebilecek bir protein haline getirdiği varsayılabilir. Ters deney, ayrıca, OLFM4 ekspresyonunun RNA interferansı tarafından inhibe edildiği veya inhibe edilmediği LS180 hücrelerinden küreler yapılarak gerçekleştirildi. Bu deneyde, kürelerin boyutlarının karşılaştırılması, ikincisinin hücre sayısı sayılarak gerçekleştirildi. Bu, her kuyuda birbirleriyle karşılaştırılmalarına izin veren yalnızca bir yapının mevcut olması gerçeğiyle mümkün olmuştur. Bu nedenle, LS180 hücrelerinde OLFM4 ekspresyonu azaldığında, oluşan kürelerin daha büyük göründüğü ve daha fazla hücre içeriyor gibi göründüğü belirtilmektedir. Tüm bu sonuçlar, OLFM4'ün ff ve hücre içi ve ff ve hücre dışı arasında ayrım yapılmadan elde edildi. Bu analizlerde daha ileri gitmeden önce, bu etkilerin OLFM4'ün bir reseptör üzerindeki etkisinin bir sonucu olup olmadığını veya bunun hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu olup olmadığını belirlemek için OLFM4'ün salgılanmasını önleyen glikosilasyon mutantlarını kullanmak uygun olabilir (Şekil 5.4).



Şekil 5.4 Bir kontrol girişim RNA'sı ile veya OLFM4'e yönelik iki girişim RNA havuzu ile transfekte edilmiş LS180 hücreleri ile elde edilen sferoidlerin görüntüleri./Küreleri oluşturan hücrelerin sayısı 10 günlük kültür ve triptik ayrışmadan sonra sayıldı (n = 3))

5.6 Kolorektal Tümörlerin Genetik Analizi

Burada elimizdeki tümörleri genetik bir bakış açısıyla karakterize etmeye çalıştık. Daha sonra, piroz dizileme yoluyla, KRAS, BRAF, P53 ve PI3KCA genlerinde kolorektal

kanserde tanımlanan önemli mutasyonları araştırdık. Çizelge 5.1, 70 hasta üzerinde gerçekleştirilen bu analizin sonuçlarını özetlemektedir.

Çizelge 5.1 70 kolon tümörü üzerindeki mutasyonların analizinin sonuçları

Gene (proportion of mutation)	Mutation	Number of patients
TP53 (20%)	R175H	5
	E282Q	4
	R273C	3
	C176T	2
	R248W	1
	R273H	1
PI3KCA (5%)	E545K	2
	E542K	2
KRAS (33%)	G12D	12
	G13D	7
	G12V	3
	G12C	2
	G12A	1
	Q61K	1
BRAF (8%)	V600E	6
Unmutated patients (44%)		35

Kolorektal tümörlerin % 20'sinin TP53 tümör baskılayıcı gen üzerinde mutasyona uğradığını, % 5'inin PI3KCA geninde mutasyona uğradığını,% 8'inin BRAF geninde mutasyona uğradığını ve % 33'ünün 'KRAS onkojeninde mutasyona uğradığını vurguladık. Ek olarak, tümörlerin% 44'ünde bu genler üzerinde bilinen bir mutasyon yoktu. Dikkatimizi KRAS onkojeninde mutasyona uğramış tümörler üzerinde yoğunlaştırmaya karar verdik çünkü bu, kolorektal kanserdeki en yaygın mutasyondur ve bu onkojenin mutasyonu, hedeflenen kemoterapi tedavilerine direnç anlamına gelir. Bu nedenle, potansiyel olarak tümörler tarafından salgılanan ve mutasyonun bir belirteci olabilecek bir biyobelirteci vurgulamayı umduk. Sonuçta, kütle spektrometresi ile analiz ettiğimiz tümörlerin sekizi, RAS'ın vahşi formlarını ve on üç mutasyona uğramış formu eksprese etti. Pyrosequencing analizi bize bir G12D mutasyonlu altı tümör, iki G12V, bir G12A ve bir G12C verdi. Üç tümör, G13D tipi bir mutasyon taşıyordu. Bu 21 tümörde kodon 61'de mutasyon tespit edilmedi.

5.7 RAS Onkojeninde Mutasyona Uğramış veya Mutasyona Uğramayan Tümörlerin Proteomik Analizi

Bu analiz, en az iki peptit içeren 2.692 proteini tanımlamamıza ve ölçmemize izin verdi. Bu yaklaşımı kullanarak, ekspresyonu RAS onkojeninin vahşi formu ve sağlıklı doku ile tümörler arasında önemli ölçüde değişen 256 protein saptadık. Benzer şekilde, 253 protein KRAS mutasyona uğramış tümörler ve sağlıklı doku havuzu arasında istatistiksel olarak önemli ölçüde farklılık gösterir. Aşırı eksprese edilen ve yetersiz eksprese edilen proteinlerin ayrıntıları Çizelge 5.2'de sunulmuştur.

Çizelge 5.2 KRAS'ta mutasyona uğramış ve mutasyona uğramamış tümörlerin sağlıklı doku havuzuna kıyasla proteomik analizinin sonucu

	KRAS WT	KRAS Mutation
Over expressed proteins	107	113
Under-expressed proteins	149	140

Ayrıntılı olarak, bu veriler, [1.35; 2.10] istatistiksel güven aralığı ile ilişkili 1.68 iTRAQTM oranı ile RAS onkojeninde mutasyona uğramış tümörlerde OLFM4'ün aşırı ekspresyonunu göstermektedir. Bu arada, ALDH1B1 gibi diğer önemli proteinlerin varyasyonunu da not edebiliriz. Bu protein, 1.9' luk bir iTRAQTM oranı ve [1.59; 2.28] 'lik bir aralık ile sağlıklı dokuya kıyasla neredeyse iki kat artmıştır. Ayrıca, kolorektal kanserin nüksü için bir belirteç olduğu bilinen CEACAM5 proteininin, (1.46; 1.95) güven aralığı için 1.69'luk bir iTRAQTM oranı ile KRAS'ta mutasyona uğramış tümörlerde de büyük ölçüde arttığını gözlemleyebiliriz. Hücre-hücre etkileşimlerinin modülasyonunda yer alan TGFBi proteininin tanımlanmasından da bahsedebiliriz. İkincisi, bu etkileşimleri azaltmada bir role sahip olacaktır. (1.59, 2.08) güvenirlik aralığı için 1.82 oranıyla fazla ifade edilir. Sorbitol dehidrojenaz proteini ayrıca, [1.26; 2.00] güvenlik aralığı ile ilişkili 1.59'luk bir iTRAQTM oranı ile KRAS onkojeninde mutasyona uğramış tümörlerde aşırı eksprese edilir. Bu protein aynı zamanda

tümörlerin klinik aşamalarına göre analizinden elde edilen dört biyobelirteç adayından biriydi. Bu veriler, kolorektal tümörler üzerinde gerçekleştirilen OLFM4'ün immünohistokimyasal markörleri ile doğrulanabilir. Aslında, bir KRAS mutasyonuna sahip tümörler, aynı zamanda, proteinin önemli bir ekspresyonunu düşündüren, OLFM4'ün önemli immünohistokimyasal etiketlemesini de sergiler. Öte yandan, RAS onkojeni durumlarına göre tümör ekstraktları üzerinde western blotlar yapıldı. Aslında, 29 tümör sonunda western blot ile analiz edildi ve farklı formlara karşılık gelen bant yoğunluğu oranları hesaplanabildi. Her tümör için, piksel sayısını belirleyerek bantların yoğunluğunu ölçtük. Her seferinde, üst glikosile edilmiş bant (72 kDa), alt glikosile edilmemiş bant (55kDa) ile karşılaştırıldı. Bu tümörler arasında, RAS onkogeninde mutasyona uğramış 12 tümör vardı, bunlar aşama 2'nin 5'i, Aşama 3'ün 3'ü ve Aşama 4'ün 4'ü – ve 17 mutasyona uğramamış tümör vardı, bunlar - 2. evrenin 5., 3. evrenin 6. ve 4. evrenin 6. evresi - histolojik aşamalarına göre nispeten eşit dağılmış. Bununla birlikte, tüm aşamaların tam bir analizini yapmak için elimizde 1. evre tümörler yoktu. Mutasyon, OLFM4 ekspresyonunda ve özellikle glikosile edilmiş formda (72 kDa) güçlü bir artış anlamına gelir.

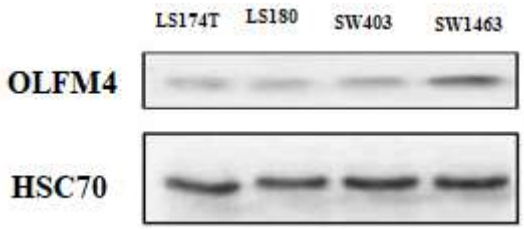
5.8 OLFM4 ve KRAS Arasındaki Bağlantının Doğrulanması

OLFM4'ün ekspresyonu ile RAS onkogeninin ekspresyonu arasındaki bağı doğrulamak için hücresel modeller kullandık. Bu nedenle, doksisiklin ile indüklenebilen bir promoterin bağımlılığı altında H-RASV12 proteininin ekspresyonunu indükleme kapasitesine sahip olacak şekilde transforme edilen HT29 kolorektal adenokarsinoma hücreleri kullanıldı. Bu hücreler, Ras proteininin ekspresyonunu indüklemek için 48 ve 72 saat doksisiklin ile uyarıldı. Bu ifade, 48 saatte western blot ile teyit edilir. Örnekleri toplamadan yirmi dört saat önce, kültür ortamı fetal buzağı serumu içermeyen ortam ile değiştirildi. İkincisi, çok yüksek protein konsantrasyonu nedeniyle aslında western blot analizi ile uyumsuzdur. Ras proteininin ekspresyonunun önceden indüklenmesinin ardından 24 saatlik serum yoksunluğu, 10 kDa'lık bir eşik değerine sahip merkezler üzerinde eşdeğer bir konsantrasyondan sonra, Kontrol indüklenmemişken kültür süpernatanlarında OLFM4'ün varlığı bir tane içermez.OLFM4 mRNA'nın ekspresyon

seviyesi, laboratuvarda bulunan kolorektal adenokarsinom hatlarında da analiz edildi. Bu sonuçlar, RAS üzerinde mutasyona uğramış tüm çizgilerin mutlaka OLFM4'ü ifade etmediğini, ancak diğer yandan ikincisini ifade eden tüm çizgilerin RAS üzerinde mutasyona uğradığını göstermektedir.

Çizelge 5.3 RAS durumuna göre kolorektal hücre çizgilerinde OLMF4 mRNA ekspresyon seviyesi.

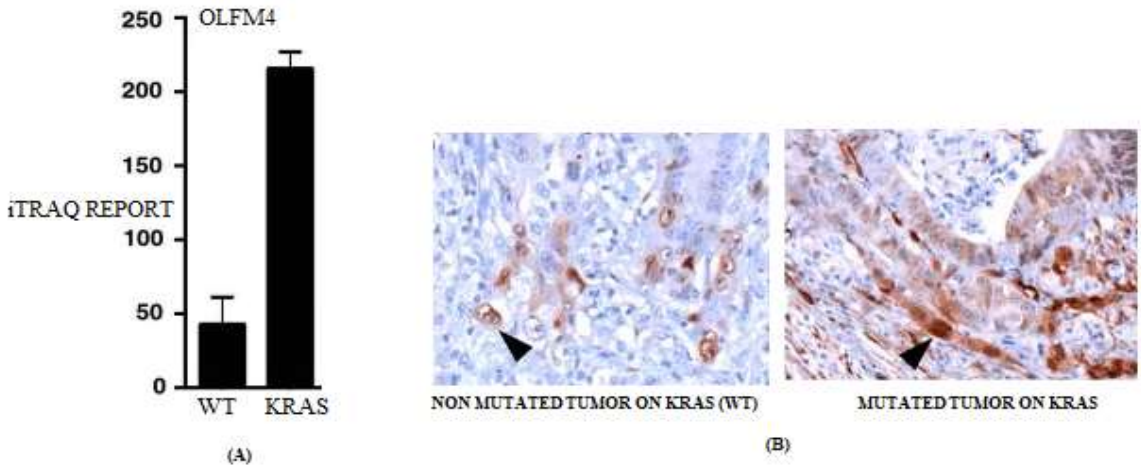
Hücre çizgisi	HT29	SW48	RKO	SW1417	WIDr	Caco-2	Colo320	HCT116	HCT15	SW480	SW620	DLD-1	LS174T	SW403	SW1463	LS180
RAS transferi	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	G13D	G13D	G12V	G12V	G13D	G12D	G12V	G12C	G12D
OLFM4 ifadesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++
yer	colon	colon	colon	colon	colon	colon	colon	colon	colon	colon	colon	colon	colon	colon	Rectum	colon
Klinik aşama	3	3	0	2	0	0	4	4	1	5	3	1	3	4	4	2



Şekil 5.5 LS174t, LS180, SW1463 ve SW403 satırlarında OLFM4 ifadesinin doğrulanması için Western blot

5.9 KRAS Mutasyonu İçin Bir Belirteç Olarak OLFM4'ün Doğrulanması

Ticari bir ELISA kiti kullanarak test ettiğimiz 45 hastadan örnekler alabildik. Veriler Şekil 5.6 A'da sunulmuştur ve seralarda OLFM4'ü tespit etmenin oldukça mümkün olduğunu göstermektedir (Şekil 5.6 B).Mevcut değerler, ELISA saptama eşiğinin altındaki oranlardan 225 ng / mL'ye kadar değişir. Bazal oran 20 ng / mL ± 6 ng / mL civarında görünmektedir. Bu ön sonuçların daha büyük bir hasta kohortunda doğrulanması gerekir. Ancak elimizdeki ilk sonuçlar, bu proteinin hastaların kanında basitçe ölçme olasılığını gösteriyor gibi görünür ve dozajlar, mutasyona uğramamış hastalar ile KRAS ve mutasyona uğramış tümörü olanlar arasında bir varyasyon ortaya koymaktadır. OLFM4'ün kolorektal kanser gelişimi için erken bir biyobelirteç adayı olarak veya KRAS mutasyonu için bir biyobelirteç adayı olarak kullanımı patentlenmiştir.



Şekil 5.6 (A) RAS onkogeni için tümörlerin genetik durumuna göre OLFM4 ekspresyon seviyesindeki varyasyonun iTRAQ raporu.(B) RAS üzerinde mutasyona uğramamış bir tümörün ve OLFM4'e yönelik bir antikor ile mutasyona uğramış bir tümörün immünohistokimyasal etiketlemesi.

Sonuç olarak şöyle özetleyebiliriz:

Kanser ve son yıllarda 9 milyon ölümden sorumlu çok faktörlü bir patoloji bu patoloji vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilir. Rektum kanseri Irak'ta çok yaygın bir kanser olmaya devam ediyor, kolorektal kanserlerin % 30 ile 40'ını temsil eder. Teşhisi genellikle geç, dolayısıyla ileri evrelerin oranı yüksektir. Çalışmamızın amaçlarından biri, rektal kanser tedavisinin kalitesini değerlendirildi.

1. Hastalarımızın ortalama yaşı 66 olup, yaşları 23 ile 90 arasın da değişmekte olup, 1.1 cinsiyet oranı ile serimizde erkek egemenliği saptanmıştır.
2. Klinik semptomatolojinin hiçbir özelliği yoktu, rektal kanama, geçiş bozuklukları, rektal kitlenin palpasyonu ve karın ağrısı baskındı.
3. Bu çalışma, CRC'nin ihlaliyle bağlantılı olması muhtemel risk faktörlerini ve koruyucu faktörleri belirlemeyi amaçlayan bir yaklaşıma öncülük etmemizi sağladı. Bunun için araştırmacı, kolorektal kanser ile ilişkisi olan maksimum elementi kapsamaya çalıştı.70 rektum kanseri vakasını içeren çalışmamızın sonuçlarından şu sonuca varıldı:

a. Kolorektal kanser oluşumunda rol oynayan çeşitli faktörler şunlardır: yaş, alkol ve tütün tüketimi, aşırı kilo ve obezite, diyabet hipertansiyonu, ailede CRC öyküsü, dolayısıyla kırmızı et açısından zengin bir diyet.

Bu mütevazı çalışma birkaç perspektif açıyor:

• Her kanser türü için belirli belirteçlerin testine dayalı erken teşhis

• Bu sorunu şu tavsiyelerde bulunarak çözmeliyiz: Özellikle hedef popülasyondaki risk faktörlerini değerlendirmek için önceki bir epidemiyolojik araştırmaya dayalı tarama.

- iyi bir yaşam tarzı,
- sağlıklı bir diyet,
- hareketsiz bir yaşam tarzından kaçmak,
- fiziksel aktivite yapmak,

- Karında rahatsızlık olması veya dışkıda kan olması durumunda doktorunuza danışmak.

• Tüm bu faktörler kolorektal kansere karşı koruyucu faktörlerdir

• Tüm bu veriler, birkaç veri tabanı önermeye öncülük etti.

Analizlerimizde, yaklaşımımızın uygunluğunu gösteren literatürde daha önce tanımlanmış aday biyobelirteçlerin bir vurgusu vardır.

• Daha sonra OLFM4'ü kanser kolorektalinin erken teşhisi için aday biyobelirteç potansiyeli olarak önerdik. Ek olarak, ifade seviyesinin en güçlü şekilde onkojen KRAS üzerindeki mutasyona uğramış tümörlerde düzensizleştirildiğini kaydettik.

• ELISA ile hastalara yönelik ön çalışmalarımız, bu biyobelirtecin kanser kolorektalinin erken teşhisinde bir ilgisini gösteriyor gibi görünmektedir. KRAS'ta mutasyona uğramış tümörlü hastalarda plazma seviyesi de daha yüksektir.

KRAS'ta mutasyona uğramış tümörlü hastalarda plazma seviyesi de daha yüksektir Ve ifadesi, transkripsiyon faktörü NF-κB tarafından düzenleniyor gibi görünmektedir.

• Ayrıca, hücre temaslarının düzenlenmesine onları azaltarak müdahale ediyor gibi görünüyor, bu da muhtemelen tümör yayılmasını teşvik eder. Glikosilasyon bölgelerini de analiz ederek, salgılanması için gerekli olduklarını göstermemizi sağladı.

• Bilinen konsensüs sekansına karşılık gelen bölgelerde glikosilasyon olabileceğini de gösterdik.

• Analizlerimizdeki diğer proteinler de iyi biyobelirteç adayları oluşturabilir ve bu bağlamda çalışılmayı hak edebilir. Bu, özellikle, ekspresyonu analizlerimizde çok sık değiştirilen TGFBi proteini için geçerlidir. Bu çalışmanın devamı, alaka düzeylerini belirlemeye çalışmak için bu belirteçlerin hasta ve hasta olmayanların kanında tahlillerini yapmaktan oluşabilir.Bu belirteçler, ilgili oldukları kanıtlanırsa, tanısal bir yardım ve klinisyenler için prognostik sağlamak için birleştirilebilir.

KAYNAKLAR

Alrubaie, A., Alkhalidi N., Summar, A. 2019. A clinical study of newly-diagnosed colorectal cancer over 2 years in a gastroenterology center in Iraq. Journal of Coloproctology, 39(3); 217-222

Al-Bahrani, ZR., Al-Khateeb, AK., Degayi, O, Butrous, GS. 1980. Cancer of colon and rectum in Iraq. Am J ProctolGastroenterol Colon Rectal Surg, 31;20-2

Al-Bayati, SM., Jasim, F. 2009. Colorectal cancer in a group of Iraqi patients. MMJ, 8(1); 36-9

Al Dahhan, S., Faris, L. 2018. Epidemiology of Colorectal Cancer in Iraq, The Gulf journal of oncology, 1;23-26.

Alhilfi, H.S.Q., Almohammadawi, K.O., Mohsin, A., Rasha, K.A.A., Nyaz, A., Aliedani, B.K.A., Aldubaisi, H.J.I., Alshewered, A. S.H. 2019. Colorectal cancer epidemiology and clinical study in Misan. Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro), 39(2);159-162.

Al-Jenabi, N.A., Kadhem, A.A., Abbas H.F. 2019. Proportion of colorectal cancer proved by a histopathological study on patients who underwent colonoscopy. Med J Babylon, 16;141-4.

Ambartsumian N., Sandelin, K., Rank, F., and Gromova, I. 2004. Proteomic Characterization of the Interstitial Fluid Perfusing the Breast Tumor Microenvironment. Molecular & Cellular Proteomics, 3: 327.

Ban, J.M, Faeza, A.Z., 2019. Interleukin-6 Expression in Colorectal Tumors in Iraqi Patients, International Journal of Medical Research & Health Sciences, 8(4);1-8.

Campbell, P.T., Deka, A., Jacobs, E.J., Newton, C.C., Hildebrand, J.S., McCullough, M.L., Limburg, P.J., Gapstur, S.M. 2010. Prospective study reveals association between colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus or insulin use in men. Gastroentology. doi: 10.1053/j.gastro.2010.06.072

Faivre-Finn, C., Bouvier-Benhamiche, A.M., Phelip, J.M., Manfredi, S., Dancourt, V. and Faivre, J., 2002. Colon cancer in France: evidence for improvement in management and survival, Gut. Jul; 51(1);: 60–64.

Compton, C., Fenoglio-Preiser, C.M., Pettigrew, N., Fielding, L.P. 2000. American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference: Colorectal Working Group. Cancer, 88(7);1739-1757.

Devolx, B. 1997. Interest of routine measurement of serum calcitonin : study in a large series of thyroidectomized patients, Journal of Clinical Endocrinology &Metabolism , 82 (2); 338–341.

Doroudgar, S. and Glembotski, C.C. 2011. The cardiokine story unfolds: ischemic stress-induced protein secretion in the heart. Trends in molecular medicine, 17 (4); 207–214.

Dowling, P. and Clynes, M. 2011. Conditioned media from cell lines : A complementary model to clinical specime ns for the discovery of disease-speci fi c biomarkers. PROTEOMICS, 11 (4); 794–804.

Duffy, M.J., van Dalen. A., Haglund, C., Hansson, L., Holinski-Feder, E., Klapdor, R., et al. 2007. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. Eur J Cancer, 43(9);1348-1360.

Duffy, M.J. 2001. Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful? ClinChem;47(4);624-630.

Fernández Suárez, A., Martínez Peinado, A., Gaspar, M.J., Filella, X., Molina. R., Ballesta, A.M. 2007. Serological tumor markers.Clinical Chemistry, 26(2);77-85.

Gavin, P.G., Colangelo, L.H., Fumagalli, D., Tanaka, N., Remillard, M.Y., Yothers, G., Kim, C., Taniyama, Y., Kim, S.I., Choi, H.J., Blackmon, N.L., Lipchik, C., Petrelli, N.J., O'Connell, M.J., Wolmark, N., Paik, S., Pogue-Geile, K.L. 2012. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. Clin Cancer Res, 18(23);6531-41.

Gil-Bazo, I., Páramo, J.A., García-Foncillas, J. 2006. New prognostic and predictive factors in advanced colorectal cancer. Med Clin (Barc), 126(14);541-548.

Haider, S.Q.A., Khalid O.M. A., Rasha, K.A. A., et al., 2019. Colorectal cancer epidemiology and clinical study in Misan, J. Coloproctol. (Rio J.) 39(2); Rio de Janeiro

Hebels, D.G., Sveje, K.M., Kok, M.C., Van Herwijnen, M.H., Kuhnle, G.G., Engels, L.G.,Vleugels-Simon, C., Mares, W.G.,Pierik, M., Masclee, A.A., KleinjansJc., De Kok, T.M., (2012). Red meat intake-induced increases in fecal water genotoxicity correlate with pro carcinogenic gene expression changes in the human colon. Food ChemToxicol

https://uae.bumrungrad.com/en/about-us/news-media/colonoscopy

https://doi.org/10.1016/j.jcol.2018.12.001

https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.01284/full

Iraqi Cancer Registry., Annual Report. Iraqi Cancer Registry Board, Ministry Of Health and Environment. Baghdad, Iraq.(2015),

Iraqi Cancer Board.Results of the Iraqi Cancer Registry 2012. Baghdad, Iraq: Iraqi Cancer Registry Center, Ministry of Health, 2015

Kabouri, K. 2000. CCR in young people under 40 for 110 cases.doctoral thesis in medicine, Rabat, N. 80.

Koga, Y,, Yasunaga, M,., Takahashi, A., Kuroda, J., Moriya, Y., Akasu, T., et al. 2010. MicroRNA Expression Profiling of Exfoliated Colonocytes Isolated From Feces for Colorectal Cancer Screening. Cancer Prev Res (Phila), 3(11);1435-1442.

Laurent-Puig, P. Agostini, J., Maley, K., 2010. Colorectal oncogenesis. Cancer Bulletin; 97(11);1311-21.

Lim, Y.K., Kam, M.H., Eu, K.W., 2009. Carcinoembryonic antigen screening: how far should we go? Singapore Med J, 50(9);862-865.

Lin, J.K., Lin, C.C., Yang, et al., 2011. Early postoperative CEA level is a better prognostic indicator than is preoperative CEA level in predicting p rognosis of patients with curable colorectal cancer. International journal of colorectal disease , 26 (9);1135–41.

Liu, K., Kaffes, A.J., 2011. The diagnosis and investigation of obscure gastrointestinal bleeding. Aliment Pharmacol Ther, 34;416-23.

Magalhaes, B., Peleteiro, B., Lunet, N., 2012. Dietary patterns and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. Eur J Cancer Prev,21(1);15—23.

Magrì, A., Bardelli, A. 2019. Does early metastatic seeding occur in colorectal cancer?. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 16;651–653.

Marusyk, A., Almendro, V., and Polyak, K., 2012. Intra-tumor heterogeneity: a looking glass for cancer? Nature Reviews Cancer

Mohamad, B.J., et al. 2015. Assessment the Immunohistochemical Expression of Cathepsin D in Iraqi Patients with Colorectal Carcinoma." Iraqi Journal of Science, Vol. 56(4); 3337-45.

Niccoli,P.,WionBarbot,N.,Caron,P., Henry,J.F.,deMicco,C.,SaintAndre,J.P., Bigorgne,J. C., Modigliani, E., and Conte- Perlis, RH. 2011. Translating biomarkers to clinical practice.Mol Psychiatry, Online pub: 1–12.

Popat, S., Hubner, R., Houlston, RS., 2005. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis, J ClinOncol 23(3);609-18.

Raimondo, F., Morosi, L., Chinello, C., Magni, F., and Pitto, M., 2011. Advances in membranous vesicle and exosomeproteomi cs improving biological understanding and biomarker discovery. Proteomics, 11 (4);709–720.

Result of Iraqi Cancer Registry 2000-2002, Iraqi Cancer Board, Ministry of health, Baghdad-Iraq, 2005.

Reynolds, B.A. and Weiss, S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science, 255(5052);1707–1710.

Rot, A.D., Delorenzi, M., Tejpar, S., Yan, P., Klingbiel, D., Fiocca, R., d'Ario G., Cisar, L., Labianca, R., Cunningham, D., Nordlinger, B., Bosman, F., Van Cutsem, E. 2012. Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors in stage II/III colon cancer. J Natl Cancer Inst, 104(21);1635-46.

Safaee Ardekani, G., Jafarnejad, S.M., Tan, L., Saeedi, A., Li, G. 2012. The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. PLoS One;7(10).

Sargent, D.J., Marsoni, S., Monges, G., Thibodeau, S.N., Labianca, R., Hamilton, S.R., French, A.J., Kabat, B., Foster, N.R., Torri, V., Ribic, C., Grothey, A., Moore, M., Zaniboni, A., Seitz, J.F., Sinicrope, F., Gallinger, S., 2010. Defective mismatch

repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. J ClinOncol, 28(20);3219-26.

Sheet, S., Sheikha, A., Saeed, A., Ameen, H., Mohammed, S., Khasraw, M., 2012. Colorectal cancer: Is the incidence rising in young Iraqi patients?.Asia-Pacific journal of clinical oncology.8. 10.1111/j.1743-7563.2012.01524.x.

Sinicrope, F.A., Foster, N.R., Thibodeau, S.N., Marsoni, S., Monges, G., Labianca, R., Kim, G.P., Yothers, G., Allegra, C., Moore, M.J., Gallinger, S., Sargent, D.J. . DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. J Natl Cancer Inst, 103(11);863-75.

Sinicrope, F.A., Karapetis, C.S., 2013. Personalized treatment for advanced colorectal cancer: KRAS and beyond. Cancer Manag Res, 21(5);387-400.

Stastna, M. and Van, Eyk, J. E. 2012. Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery. PROTEOMICS , 12 (4-5);722–735.

El-Bolkainy, T.N., Sakr, M.A., Nouh, A.A., El-Din, N.H., 2006. A comparative study of rectal and colonic carcinoma: demographic, pathologic and TNM staging analysis, J Egypt Natl Cancer Inst, 18; 258-263.

Taha, H.T., Al-Saigh Shahbaa, A., Al-BayatiShatha, A., Abdulmawjood Faris, A. A., 2019. Descriptive Study of Colorectal Cancer in Iraq, 1999-2016, Annals of the College of Medicine, Mosul, 41(1);81-85.

Thiel, A., Ristimäki, A., 2012. Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of BRAF. Front Oncol, 50(2);95-103.

Taha, H.T., Al-Saigh, S.A., Shatha, A.A., Faris, A.A., 2019. Descriptive Study of Colorectal Cancer in Iraq, 1999-2016". Annals of the College of Medicine, Mosul, 41(1);81-85.

Tumor Markers. National Cancer Institute. Disponible en: http://www.cancer.gov/ about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-mar- kers-fact-sheet

Ueland, F.R., Desimone, C.P., Seamon, L.G., Miller, R.A., Goodrich, S., Podzielinski, I., Sokoll, L., Smith, A., van NagellJr, J.R.,and Zhang, Z., 2011. E iveness ectiveness of a multivariate index assay in the preoperative assessment of ovarian t umors. *Obstetrics & Gynecology*, 117(6);1-289.

Vilar, E., et al. 2010. Nat Rev ClinOncol March,7(3);153-62.

ZurHausen, H., 2011. 2011. Red meat consumption and cancer: reasons to suspect involvement of bovine infectious factors in colorectal cancer. Int J Cancer; 130(11);2475—83

Wanebo, H.J., Rao, B., Pinsky, CM, Hoffman, R.G., Stearns, M., Schwartz, M.K., and Oettgen, H.F., 1978. Preoperative Carcinoembryonic Antigen Level as a Prognostic Indicator in Colorectal Cancer. New England Journal of Medicine , 299(9);448–451.

Xu, B.J., Yan, W., Jovanovic, B., Shaw, AK, An, QA, Eng, J., Chytil, A., Link, A.J., and Moses, H.L., 2011. Microdialysis combined with proteomics for protein identi fi cation in breast tumor microenvironment in vivo. Cancer Microenvironment, 4(1);61–71.