



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KOLOREKTAL ADENOM VE KARSİNOMLARDA
KÖK HÜCRE FAKTÖRLERİ OLAN NOTCH, NUMB, ITCH
VE SIAH-1'İN BİRBİRLERİ VE KLİNİKOPATOLOJİK
PARAMETRELER İLE İLİŞKİLERİNİN GÖSTERİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sinem ÇİL GÖNÜLCÜ

Antalya, 2014



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KOLOREKTAL ADENOM VE KARSİNOMLARDA
KÖK HÜCRE FAKTÖRLERİ OLAN NOTCH, NUMB, ITCH
VE SIAH-1'İN BİRBİRLERİ VE KLİNİKOPATOLOJİK
PARAMETRELER İLE İLİŞKİLERİNİN GÖSTERİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sinem ÇİL GÖNÜLCÜ

Tez Danışmanı: Prof.Dr. G. Özlem ELPEK

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2014

“Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2012.04.0103.014B Proje No ile desteklenmiştir”

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitimim boyunca ilgi ve desteklerini esirgemeyen, ufkumu genişleten başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. F. Şeyda KARAVELİ ve tez danışmanı hocam Prof.Dr. G. Özlem ELPEK olmak üzere tüm değerli hocalarıma,

Asistanlık eğitimi sürecinde özverili yardımlarından ve içten dostluklarından dolayı asistan arkadaşlarıma, teknisyen ve idari personele, tezin moleküler çalışmasında yardımcı olan Dr. Mualla ÖZCAN ve Murat BİLLOR'a

Benim bugünlere gelmemde en büyük katkısı ve desteği olan kıymetlilerim; annem, babam, kardeşlerim Sevgül ve Ceren'e, beni her konuda destekleyen eşim Sait'e, gücüme güç katan oğlum Erdem'e

sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iv
Şekiller Dizini	vi
Çizelgeler Dizini	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Anatomi	4
2.2. Kan Dolaşımı	5
2.3. Lenfatik Drenaj	6
2.4. İnnervasyon	6
2.5. Embriyoloji	6
2.6. Histoloji	7
2.7. Fizyoloji	8
2.8. Kolon Kanseri	8
2.8.1. Epidemiyoloji	8
2.8.2. Etiyoloji	9
2.8.3. Kolon karsinomlarının lokalizasyonu ve klinik	9
2.8.4. Kolorektal karsinomların makroskopisi	10
2.8.5. Kolorektal karsinomların histolojik varyantları	10
2.8.5.1. Müsinöz adenokarsinom	10
2.8.5.2. Taşlı yüzük hücreli karsinom	10
2.8.5.3. Adenoskuamöz karsinom	11
2.8.5.4. Medüller karsinom	11
2.8.5.5. Andiferansiye karsinom	11
2.8.5.6. Serrated adenokarsinom	11
2.8.5.7. Kribriform komedo tip adenokarsinom	11
2.8.5.8. Mikropapiller adenokarsinom	11
2.8.6. Histokimyasal ve immunohistokimyasal özellikler	11
2.8.7. Kolorektal karsinomlarda derece ve evre	13
2.8.8. Moleküler ve genetik özellikler	14
2.8.9. Yayılım ve metastaz	15
2.8.10. Tedavi	15
2.8.11. Kolorektal karsinomlarda prognostik faktörler	16

2.9. Kolorektal Adenomatöz Polipler	17
2.9.1. Tübüler adenom	18
2.9.2. Villöz adenom	19
2.9.3. Tübülovillöz adenom	19
2.10. Kolorektal Karsinogenez	20
2.10.1. Adenom karsinom sekansı	20
2.10.1.1. Kromozomal instabilite yolağı	20
2.10.1.2. Mikrosatellit instabilite yolağı	21
2.10.1.3. CpG adacık metilasyon fenotipi	21
2.11. Kök Hücreler	22
2.11.1. Sindirim sistemi epitel kök hücresi	23
2.12. Kanser Kök Hücreleri	23
2.13. Kolon Kanserlerinde Kök Hücreler	24
2.14. Kök Hücrelerde Notch Yolağı	25
2.15. Kanser Kök Hücrelerinde Notch Yolağı	26
2.16. Notch	27
2.16.1. Notch sinyal yolağı	28
2.16.2. Notch sinyalinin regülasyonu	30
2.16.3. Notch sinyalinin fonksiyonu	31
2.16.4. Notch sinyali ve anjiogenez	32
2.16.5. Notch yolağı ve kanser	33
2.16.5.1. Pankreas kanseri	33
2.16.5.2. Gastrik kanserler	33
2.16.5.3. Hepatoselüler karsinom	33
2.16.6. Kolonik prekanseröz olaylarda notch sinyali	34
2.16.7. Kolorektal kanserlerde notch sinyali	34
2.16.8. Notch yolağı ile ilgili terapötik yaklaşımlar	35
2.17. Numb	37
2.18. Siah-1	39
2.19. Itch	40
3. GEREÇ ve YÖNTEM	41
3.1. Çalışma Grubunun Tanımlanması	41
3.2. Histomorfolojik Değerlendirme	41
3.3. İmmunhistokimyasal Boyama	42
3.4. İmmunreaktivitenin Değerlendirmesi	42
3.5. RNA İzolasyonu	42

3.6. c-DNA Reaksiyonu	43
3.7. RT-qPCR	44
3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler	45
4. BULGULAR	46
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇLAR	81
7. ÖZET	83
8. ABSTRACT	85
9. KAYNAKLAR	87

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APC	Adenomatozis polipozs koli
BMP	Bone morphogenetic protein
CIMP	CpG adası metilleyicisi
c-myc	Myelocytomatosis viral oncogene homolog
COX-2	Siklooksijenaz-2
DCC	Deleted in colonic carsinoma
EGFB	Epidermal growth faktör benzeri
EH	Eps15 homoloğu
EKH	Embriyonik kök hücre
ERK	Ekstraselüler regulated kinaz
GKH	Germinal kök hücre
GSK-3-β	Glikojen sentetaz kinaz3 β
HCC	Hepatoselüler karsinom
hCG	İnsan koryonik gonadotropin
HIF-1α	Hipoksi ile indüklenen faktör-1α
HNPCC	Hereditör nonopolipozis kolorektal kanser
KKH	Kanser Kök Hücresi
K-ras	Rat sarcoma
KRK	Kolorektal Kanser
MAML	Mastermind like protein
MAPK	Mitojen aktive protein
MMP-9	Matriks metalloproteinaz -9
MMR	Mismatch repair
MSI	Mikrosatellit İnstabilite
MSI-1	Musashi-1
NF-κβ	Nükleer faktör kappa β
NICD	Notch intraselüler kısmı
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
Pen-2	Presenilin enhancer-2
PEST	Prolin, glutamat, serin, treonin

PLAP	Plasental alkalen fosfataz
PRR	Prolinden zengin domain
PTB	Fosfotrozın bağlayan domain
Shh	Sonic hedgehog
SKH	Somatik kök hücre
SOP	Duyusal organ prekürsörü
TA	Transit amplifiye hücre
TACE	TNF- α dönüştürücü enzim
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WA	Withaferin-A

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Enterik sistemde kök hücrelerin hücresel farklılaşmasında Notch etkisi	25
2.2. Notch reseptör ve ligandları	28
2.3. Notch reseptörünün fonksiyonu ve regülasyonu	29
4.1. Çalışma gruplarında yaş dağılımı	46
4.2. Çalışma gruplarında cinsiyet dağılımı	46
4.3. Adenokarsinom olgularının lezyon lokalizasyonuna göre dağılımı	47
4.4. Adenom ve karsinom gruplarında Notch, Numb, Itch ve Siah'ın protein düzeylerinin artış ve azalışı	48
4.5. Normal kolon mukozasına Notch ekspresyonu	49
4.6. Adenom yüzeyinde Notch ekspresyonu	49
4.7. Karsinomda Notch ekspresyonu	50
4.8. Karsinomda Notch ekspresyonu	50
4.9. Normal mukozada Numb ekspresyonu	54
4.10. Adenomda Numb ekspresyonu	54
4.11. Karsinomda Numb ekspresyonu	55
4.12. Normal mukozada Itch ekspresyonu (x100)	58
4.13. Adenomda noktasal Itch ekspresyonu (x100)	58
4.14. Adenomda noktasal Itch ekspresyonu (x200)	59
4.15. Karsinomda noktasal Itch ekspresyonu	59
4.16. Karsinomda noktasal ve granüler sitoplazmik Itch ekspresyonu	60
4.17. Normal mukozada Siah-1 ekspresyonu (x100)	64
4.18. Normal mukozada Siah-1 ekspresyonu (x200)	65

4.19.	Adenomda nükleer ve sitoplazmik Siah-1 pozitifliği (x200)	65
4.20.	Karsinomda nükleer ve sitoplazmik Siah-1 pozitifliği (x400)	66
4.21.	Karsinomda nükleer ve sitoplazmik Siah-1 pozitifliği (x400)	66
4.22.	Karsinomda nükleer ve sitoplazmik Siah-1 pozitifliği (x400)	67
4.23.	Diferansiasyon ile 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi	72
4.24.	Lenf nodu metastazı ile 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi	72
4.25.	Evre ile 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi	73
4.26.	Notch protein düzeyi ile 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi	73
4.27.	Notch immunekspresyonu ile 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi	74
4.28.	Numb protein düzeyi ile 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi	74
4.29.	Numb immunekspresyonu ile 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi	75
4.30.	Itch protein düzeyi ile 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi	75
4.31.	Itch immunekspresyonu ile 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi	76
4.32.	Siah protein düzeyi ile 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi	76
4.33.	Siah immunekspresyonu ile 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kolorektal tümörleri histolojik sınıflaması (WHO 2010)	12
2.2. Dukes evrelemesi	13
2.3. Astler- Coller evrelemesi	13
2.4. TNM evrelemesi	14
4.1. Normal mukoza, adenom ve karsinom olgularında Notch'un RT-PCR ile protein ekspresyonları ve immünohistokimyasal boyanma dağılımları	48
4.2. Karsinom grubunda Notch'un RT-PCR ile protein ekspresyonlarının ve immünohistokimyasal boyanmasının klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi	52
4.3. Karsinom grubunda Notch'un immunohistokimyasal ekspresyon şiddetinin klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi	53
4.4. Normal mukoza, adenom ve karsinom olgularında immunohistokimyasal ve PCR ile Numb ekspresyonlarının gösterilmesi	55
4.5. Karsinom grubunda Numb'un moleküler ve immünohistokimyasal ekspresyonunun klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi	56
4.6. Karsinom grubunda Numb'ın immünohistokimyasal ekspresyon şiddetinin klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi	57
4.7. Normal mukoza, adenom ve karsinom olgularında Itch'in RT-PCR ile protein ekspresyonları ve immünohistokimyasal boyanma dağılımları	60
4.8. Karsinom grubunda Itch'in immunohistokimyasal boyanma şiddetinin klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi	61
4.9. Karsinom grubunda Itch'ın immunohistokimyasal boyanma şiddetinin klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi	62
4.10. Karsinom grubunda Itch'ın immunohistokimyasal boyanma lokalizasyonunun klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi	63

4.11.	Normal mukoza, adenom ve karsinom olgularında SIAH-1'in RT-PCR ile protein ekspresyonları ve immünohistokimyasal boyanma dağılımları	67
4.12.	Karsinom grubunda SIAH-1'in RT-PCR ile protein ekspresyonlarının ve immünohistokimyasal boyanmasının klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi	68
4.13.	Karsinom grubunda SIAH-1'in immünohistokimyasal boyanma şiddetinin klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi	69
4.14.	Karsinom grubunda SIAH-1'in immünohistokimyasal boyanma lokalizasyonunun klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi	70
4.15.	Cox regresyon analizinde bağımsız prognostik faktörler	77

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK) tüm dünyada izlenen kanserlerin %9'unu oluşturan ve dünyada 3. sıklıkta görülen kanser türüdür (1). Çok sayıda tedavi seçenekleri olmasına rağmen, kanser ile ilişkili ölüm nedenleri arasında 4. sıradadır (1,2). Pek çok KRK olgusunda tümör cerrahi olarak rezeke edilebilir durumdayken bile, cerrahi sonrası metastazlar ile karşılaşmakta ve bu amaçla yapılan, rezidüel tümör hücrelerini ortadan kaldırmaya yönelik adjuvan tedaviler ise tedaviye dirençli hücre popülasyonlarının varlığı nedeniyle etkisiz olmaktadır (3).

Uzun yıllardır kanserlerin sellüler düzeyde fenotipik olarak heterojenik bir hücre popülasyonundan oluştuğu bilinmesinin yanı sıra, son yıllarda tümörojenik büyümenin başlatılması ve desteklenmesinde tümör hücrelerinin büyüme karakteristiklerinde farklılıklar olduğu not edilmiştir (4,5). Bu farklılıkların tümörde devam eden genetik mutasyonlar ile tam olarak açıklanamaması, kanser oluşum ve büyümesi ile ilgili olarak kanser kök hücresi (KKH) hipotezinin ortaya çıkması ile sonuçlanmıştır (4). Yakın geçmişte tümör rekürrensının primer nedeninin kemoterapiye dirençli KKH olduğu gösterilmiştir (6,7). Yapılan çalışmaların KKH ile normal kök hücrelerin kendilerini yenilemeleri arasındaki farklılıkları açığa çıkarması, normal kök hücrelere zarar vermeden, KKH'nin kanser tedavisinin hedefi olarak kullanılabileceği yönündeki görüşleri desteklemiştir (5). Günümüzde KKH'ne bağlı oluşan tedavi direncinin ortadan kaldırılmasını hedefleyen çalışmalar giderek yoğunlaşmaktadır (8). Kök hücre gelişiminin düzenlenmesinde rol alan pek çok yolak embriyonik dönemde tanımlanan ve kanser gelişimi ile bağlantılı da olan yolaklardır. Oct-4, BMP, JNK, SHH, Hedgehog, Wnt/ β -katenin sinyal ileti yolağı gibi kök hücrelerinin kendini yenileme özelliğini düzenleyen yolaklar aynı zamanda kanser gelişimi ve prognozu ile bağlantılı yolaklardır (6, 7). Yine bu yolaklar içerisinde bulunan Notch sinyal yolu da önemli bir yere sahiptir. İnsanlarda bu sinyal yolunun hem kök hücrelerde hem de progenitör hücrelerde bulunmasının yanı sıra, anormal Notch sinyalinin karsinogenez boyunca hem kök hücrelerin kendini yenilemesi hem de normal kök hücrelerin regülasyonunun bozulması üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda Notch sinyalinin kanser hücrelerinin büyümesi, invazyonu ve metastazında etkili olduğu bulunmuş ve Notch sinyal inaktivasyonunun kanser tedavisinde kullanılabileceği öne sürülmüştür(9). Diğer bir yandan Notch sinyal yolu farklı kanserlerde farklı rol oynamaktadır.

Hepatoselüler karsinom, deri ve küçük hücreli akciğer karsinomunda Notch sinyal yolu tümör supresör olarak rol oynarken; serviks, akciğer, baş boyun, böbrek, hematopoetik ve lenfoid tümörlerde ise artan Notch reseptör ve ligandları tümör progresyonunda rol oynamaktadır. İntestinal sistemde ise Notch intestinal kriptlerde matür enterositlere diferansiye olan progenitör hücre popülasyonunda kritik bir role sahiptir. Notch sinyalinin barsakta hem kaybı, hem de artan ekspresyonunun karsinogenez açısından önemli olabileceğine dair bulgular vardır (10). Kolon kanserinde yapılmış az sayıda çalışmada Notch'un tümör progresyonunda rol oynayabileceği ve bu yolağın inhibisyonunun tedavide kullanılabileceği yönünde veriler bulunsa da, diğer kanserler de olduğu gibi Notch ile ilişkili moleküler yollar tam olarak tanımlanmamış olup araştırmalar sürmektedir.

Son yıllarda drosofilada ilk olarak Notch sinyal inhibitörü olarak belirlenen, ancak sonraki çalışmalarda Hedgehog ve p53 sinyal yoluna da etki ettiği izlenen, temel olarak hücre kaderinin seçimi ve asimetric hücre bölünmesinden sorumlu Numb proteinleri tanımlanmıştır (11,12). Kısaca Numb, Itch ile etkileşerek hem Notch, hem de Gli-1 inaktivasyonunu sağlarken, diğer bir yandan MDM2 inaktivasyonu ile P53 stabilizasyonuna neden olmaktadır. Bu sinyal yollarında Numb etkisi başlıca LNX ve SIAH-1 ile inhibe edilmektedir (7,12). Meme kanserinde Numb ekspresyon kaybının kötü derecede diferansiye tümörlerde sık olduğu ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu izlenmiştir (13,14). Bu bulgular küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında da saptanmıştır (15). Benzer olarak malign tükrük bezi tümörlerinde de Numb ekspresyon kaybı kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (16). Tüm bu bulgular Numb'ın tümör supresör olabileceği ve Notch üzerine olan etkilerinden dolayı KKH'ni hedefleyen tedavilerde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Yine az sayıda çalışmada Notch, Numb, Itch ve Siah-1'in tümör oluşumu, progresyonu ile ilişkili olduğu ve prognoza etkili moleküler belirteçler olduğu saptanmıştır. Kolon kanserlerinde Notch ile ilgili az sayıda çalışma yapılmış olup, bu yolağının önemli regülatörleri olan Numb, Itch ve Siah-1'i ele alan bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amaçları şu şekilde özetlenebilir:

1. RT-PCR ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak normal kolon mukozası, kolon adenomu ve kolon kanserinde Notch ve bu yolağın regülatörleri olan Numb, Itch ve Siah-1'in ekspresyonlarını araştırmak.

2. Kolon karsinomunda Notch, Numb, Itch ve Siah-1'in klinikopatolojik parametreler, dolayısıyla tümör davranışı ile ilişkisini saptamak.
3. Kolon karsinomunda Notch, Numb, Itch ve Siah-1'in 5 yıllık hastalıksız sağkalım ile ilişkisini ve bağımsız prognostik faktörler olup olmadığını belirlemek.
4. Kolon karsinomunda Notch, Numb, Itch ve Siah-1'in protein ve immünohistokimyasal ekspresyonlarının birbirleriyle ilişkisini açığa çıkarmak.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anatomi

Kalın barsak ileumun bitiminden anüse kadar uzanır ve ortalama 150 cm uzunluğu ile sindirim kanalının 1/5'ini oluşturur. Kalın barsaklar periton içinde ve retroperitoneal alanda karaciğer, dalak, mide, duodenum, ince barsaklar, böbrekler, üreterler ve mesane gibi çok sayıda organla komşuluk gösterir. İnce barsaklardan farklı olarak longitudinal kas liflerinin yoğunlaşması ile oluşan tenyalara (tenya libera, tenya omentalis, tenya mezokolika), yağ dokusundan oluşan yaprak şeklinde periton ile örtülü “appendices epiploica”lara ve sirküler kas liflerinin oluşturduğu fonksiyonel ceplenmeler olan haustralara sahiptirler. Kalın barsak ince barsaktan daha geniştir ve ileum-çekum birleşme yerinde kalın barsak içeriğinin ince barsağa geçişini engelleyen ileoçekal valv olarak adlandırılan bir kapak bulunur. Kalın barsak çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum olmak üzere bölümlere ayrılmıştır. Çekum; kalın barsağın ilk parçasıdır. Sağ iliak çukurda intraperitoneal yerleşmiştir. Uzunluğu 4-8 cm, çapı 7,5 – 8,5 cm olup, kolonun en geniş kısmıdır. Mezenter olmayan geniş bir poştur. Üzerinde apendiksin yapıştığı yerden tenya mezokolika, tenya libera ve tenya omentalis başlar. Çıkan kolon; çekumdan karaciğerin sağ lobunun alt yüzüne kadar uzanır ve burada hepatik fleksurayı yapar. Ön ve yan yüzleri peritonla örtülüdür. Yaklaşık 15-20 cm uzunluğundadır. Transvers kolon; hepatik fleksura ile splenik fleksura arasında uzanır. Ortalama 50 cm (30-60 cm) uzunluğundadır. Transvers kolonun sağ ucu duodenum ikinci parçasına ve pankreas başına tutunmuştur. Pankreas başından splenik fleksuraya kadar tamamı peritonla örtülüdür ve mezokolon ile karın arka duvarına tutunur. İnen kolon; splenik fleksuradan sol iliak fossaya kadar uzanır. Ortalama 25 cm uzunluğundadır. Yan ve ön yüzü periton ile örtülüdür. Arka yüzü gevşek bağ dokusu ile karın arka duvarına yapışıktır (17).

Sigmoid kolon; krista iliaka hizasında psoas major kasının iç kenarından başlar; 3. sakral vertebra hizasında rektumda sonlanır. Ortalama uzunluğu 40 cm olup çapı kolon çapının en dar yeridir (ortalama 2,5 cm). Tamamen peritonla sarılıdır ve mezokolon ile karın arka duvarına tutunmuştur. Sigmoid kolonun aşağı kısımlarında tenyalar incelmeye başlar ve rektuma yakın kısımda tamamen kaybolurlar (17).

Rektum; Üçüncü sakral vertebra hizasından başlayıp sakrum eğilimini takip ederek anal kanalla devamlılık gösterir. Uzunluğu 12-15 cm arasındadır. Rektum, başlangıç yeri olarak kabul edilen sakral promontorium hizasından pelvik tabana doğru ilerlerken proksimalde ve distalde sağa, orta bölümde sola konveksite gösteren üç kavis yapar. Bunlar lümen içinde mukoza çıkıntıları olarak görülürler ve Houston valvleri olarak adlandırılırlar. Rektumda haustralar, “appendices epiploica”lar, mezenter ve tenyalar yoktur. 2/3 üst kısmı peritonla örtülüdür. Ön yüzü örten periton mesaneye geçerek erkekte “excavatio rectovezicalis”i uterusu geçerek kadında “excavatio rectouterina (Douglas çukuru)”yı oluşturur. Arka yüzde ise sigmoid kolona kadar retroperitonealdir. Burada 4. sakral vertebra korpusundan başlayıp o bölgedeki damar ve sinirleri örterek rektuma uzanan Waldeyer fasyası vardır. Retroperitoneal rektumun önünde ise erkekte mesaneye kadında vaginaya uzanan Denonvillier fasyası bulunur (17).

2.2. Kan Dolaşımı

Kalın barsaklar inferior ve superior mezenterik arterden beslenir. Superior mezenterik arterin ileokolik, sağ kolik ve orta kolik dalları çekum, appendiks, çıkan kolon ve transvers kolonun sağ yarısını; inferior mezenterik arterin ise sol kolik, sigmoid ve superior hemoroidal dalları sol fleksura, inen kolon, sigmoid, rektosigmoid ve rektumun proksimalinin kanlanmasını sağlar. Rektumun orta 1/3’lük kısmı arteria hemoroidalis media, alt 1/3’lük kısmı ise arteria pudenda internanın dalı olan arteria hemoroidalis inferior ile beslenir. Sol ve orta kolik arterler birbirine dal vererek Riolan kavsini oluşturur. Kolonun tüm arterleri kendilerine komşu arterlerle, kalın barsağın tüm uzunluğu boyunca anastomoz yapar, bunlara Drummond’un marjinal arterleri adı verilir. Arterler kolon duvarına ulaşmadan önce vasa recta’ları oluşturur. Kolonun venöz dönüşü bu arterlere eş giden venlerle olur. Özelliği portal sisteme dökülmeleridir. Superior ve inferior mezenterik venler vena lienalis ile birlikte portal sistemi oluşturur. Rektumun ve anal kanalın çevresindeki ven plexusundan çıkan dalların bir kısmı superior rektal ven ile inferior mezenterik vene, bir kısmı da medial ve inferior rektal venler ile internal iliak vene dökülür (17).

2.3. Lenfatik Drenaj

Kalın barsak lenfatikleri dört ana ganglion grubunda toplandıktan sonra cisterna chyli aracılığıyla venöz sisteme dökülür.

- a) Epikolik lenf bezleri; kolon duvarının hemen yanında yer alır.
- b) Parakolik lenf bezleri; marjinal arterler etrafındadır.
- c) İntermedier lenf bezleri; mezenter içindedir.
- d) Esas lenf bezleri; mezenterik arter ve venin kökleri etrafındadır.

Rektuma ait lenf drenajı bu organı besleyen kan damarlarını takip eder. Üst 1/3'e ait lenfatikler arteria hemoroidalis superior ve arteria mezenterika inferioru takip ederek aorta etrafındaki lenf bezlerine gelirler. Orta 1/3'e ait olanlar arteria hemoroidalis mediyı izleyerek pelvis yan duvarı üzerindeki lenf bezlerine; alt 1/3'e ait olanlar ise anal kanal ve perianal derinin lenf yolları ile beraber her iki inguinal lenf bezlerine veya arteria iliaca interna etrafındaki lenf bezlerine drene olurlar(17).

2.4. İnnervasyon

Kalın barsağın innervasyonu otonom sinir sistemi ile olur. Sempatik lifler T7-12 den çıkar ve submukozal (Meissner) ve myenterik (Auerbach) sinir ağlarında sonlanır. Parasempatik innervasyon, sağ kolonda sağ vagus ile olurken, sol kolonda L1-3'den gelen liflerle olur. Sempatik sistem sekresyonu ve hareketleri inhibe ederken, parasempatik sistem uyarıcı etki gösterir. Rektum ve anal kanalın üst kısımları sempatik dallarını sempatik trunkusun lomber kısmından ve superior hipogastrik pleksustan, parasempatik dallarını pelvik splantik sinirlerden alırlar. Alt kısımları ise hipogastrik sinir yoluyla sempatik innervasyon, S2-4 den çıkan liflerle parasempatik innervasyon alır (17).

2.5. Embriyoloji

Kolonun proksimal kısmı (çekum, çıkan kolon, transvers kolon) embriyolojik orta barsaktan köken alır; kolonun kalan kısmı ve rektum ise embriyolojik arka barsaktan gelişir. Gelişiminin erken dönemlerinde orta barsağın uzaması dorsal mezenterin oluşmasına ve bu oluşumun karın arka duvarına asılmasına neden olur. Gebeliğin yaklaşık 6. haftasında çekum bir divertikulum halinde tanınabilir. Kolon fetusun gelişimi

süresince uzamaya devam eder ve son pozisyonunu alır. Distal arka barsak kloakaya girer ve anal kanal ile ürogenital yapının bazı kısımlarını oluşturur (18).

2.6. Histoloji

Kalın barsak duvarı dört tabakadan oluşmaktadır: Mukoza, submukoza, muskularis propriya ve seroza (rektumda perimuskuler doku). Mukoza da epitel, lamina propriya ve muskularis mukoza olmak üzere üç tabakaya ayrılır.

- a) Tunika mukoza: Mukozal yüzey tek sıralı alçak kolumnar veya küboidal epitelle döşeli olup absorbtif hücreler ve goblet hücreleri içerir. Mukozal yüzeye açılan Liberkühn kriptleri de matür absorbtif hücreler ve goblet hücreleriyle devamlılık gösterir. Buna ek olarak immatür ve indiferansiye prekürsör hücreler, endokrin hücreler ve Paneth hücreleri de kriptlerin bazalinde bol miktarda bulunur. Absorbtif hücreler su ve elektrolitleri absorbe ederken goblet hücreleri müsin sentez, depo ve salınımından sorumludur. Kolon mukozası ince barsak mukozasından daha fazla goblet hücresi içerir. İmmatür hücreler diğer bütün epitel hücrelerinin öncülüdür. Paneth hücrelerinin çok sayıda eozinofilik sekretuar granülü bulunur ve lizozim, epidermal büyüme faktörü gibi ürünler içerir. Bunlar normalde çekum ve proksimal sağ kolonda bulunurlar. Kolonun endokrin hücreleri proksimal ve distal kolonda özellikle rektumda bulunur. Lamina propriada kollajen lifler, düz kas demetleri, sinirler, kapillerler ve lenfatikler arasında seyrek dağılım gösteren lenfosit, plazma hücresi, histiyosit ve mast hücreleri mevcuttur. Lamina propria germinal merkezleri olan, boyutları yaş ile değişen ve rektumda daha büyük ayrıca sayıca daha fazla olma eğiliminde lenfoid nodüller içerebilir. Muskularis mukoza kapillerler ve lenfatiklerle sarılı kas ve sinir lifleri içerir.
- b) Tunika submukoza: Lamina proprianın hücresel içeriğine sahip, nöral pleksusu (Meissner pleksusu) bulunan, gevşek bağ dokusundan oluşmuş bir tabakadır.
- c) Tunika muskularis: içte sirküler, dışta longitudinal kas tabakalarından oluşmuştur ve bunların arasında miyenterik Auerbach pleksusu mevcuttur.
- d) Tunika seroza: Tek sıralı yassılaştırmış ya da küboidal mezotelyal hücreler ile döşeli peritondan ve fibroelastik dokudan oluşur. Kan damarları ve lenfatikler içerir. Çekum, appendiks, transvers kolon ve sigmoid kolonu tam olarak sarar. İnen kolon, çıkan kolon ve rektumun distali ile anal kanal peritonun arkasında kalır (19).

2.7. Fizyoloji

Kalın barsakların başlıca görevi depolama, emilim, taşıma ve salgılamadır. Kolonun geniş lümeni, proksimalde ileoçekal kapak, distalde anal sfinkterler arasında kapalı tutularak en önemli işlev olan emilim gerçekleştirilir. Salgılama, klorür emilimi karşılığında az miktarda bikarbonat lümene verilerek ortamın alkali olması sağlanır (pH 8 – 8,4). Potasyum salgılanan mukus ile lümene geçer. Emilim, hergün yaklaşık 600-1000 ml ileum içeriği kolona geçer. Bunun %90'ı sudur. Ancak dışkı ile atılan su miktarı 180 ml düzeyindedir. Su emiliminin hemen tamamı çekum ve çıkan kolonda meydana gelir. Ayrıca kolondan sodyum, klorür, sakkaroz ve laktoz da emilir. Depolama, kalın barsaklar dışkı ve bazı gazları depolarlar. Normal dışkının %70'i su, %30'u ise katı maddeden oluşur. Motilite, kalın barsaklarda itici ve itici olmayan tip olmak üzere iki farklı hareket görülür. İtici olmayan hareketlerde haustraların sırayla kasılmasıyla kolon içeriğinin karışması ve sıvı elektrolit emilimi ve değişimi için mukoza teması sağlanmış olur. İtici tip hareketlerle içerik distale doğru taşınır. Bu taşınma birden fazla haustranın bir arada kasılması, kütleli itme ve peristaltik hareketlerle olur. Ender olarak antiperistaltik hareketler de görülebilir. Normalde ağızdan alınan gıda 4,5 saatte çekuma gelir, 6 saat içinde çıkan kolonu doldurur, sağ fleksuraya erişir, 12 saatte sol fleksuraya varır ve yaklaşık 20 saatte rektosigmoide ulaşır (20).

2.8. Kolon Kanseri

2.8.1. Epidemiyoloji

Kalın barsak tümörleri gastrointestinal traktın en sık tümörleridir. Kolorektal kanser dünyanın her yerinde görülmekte, en çok da ABD, Kanada, Avustralya, Yeni Zelanda ve Batı Avrupa gibi endüstrileşmiş ülkelerde rastlanmaktadır. Kolorektal kanser görülme oranının en düşük olduğu ülkeler Afrika ve Asya'daki gelişmekte olan ülkelerdir (1,21). Gelişmekte olan ülkelerde ortalama görülme yaşı 50'dir. Kolorektal kanserler erkeklerde 4. sık görülen (akciğer, prostat, mide) kadınlarda 3. sık görülen (meme ve serviks) kanserdir (1).

Hayat boyunca kolorektal kanser gelişme riski yaklaşık %6'dır. Erkeklerde görülme riski kadınlara göre daha fazladır. Kronik inflamatuvar barsak hastalığı genetik predispozisyonu veya yüksek riskli ülkelerde yaşamıyorsa 40 yaşından önce görülme ihtimali azdır. 50 yaşından sonra görülme insidansı artmıştır (22).

2.8.2. Etiyoloji

Yüksek kalorili, hayvansal yağ ve protein bakımından zengin ancak bitkisel içerikten yoksun diyetle beslenen popülasyonlarda insidansın yüksek olduğu gözlenmiştir (22,23). Bu diyetin, yüksek miktarlarda fekal safra asidi oluşumuna yol açması ve reaktif oksijen radikallerinin ortaya çıkışını hızlandırması yanı sıra bitkisel liflerin lümenal karsinojenler ile kolon yüzeyi arasındaki teması ortadan kaldıran ve pasajı hızlandıran etkileri gibi; sebzelerde bulunan folat, antioksidanlar ve detoksifikan enzimlerin de etkilerinden kişiyi mahrum bırakması yoluyla karsinojen etkiyi arttırdığı düşünülmektedir (22,23). Diyetin sebze içeriğinin artması yanı sıra fiziksel aktivite artışı, kronik nonsteroid antiinflamatuar ilaç kullanımı ve östrojen replasman tedavisi gibi faktörler de antikarsinojen etki oluşturmaktadır (24). Ailevi polipozis hastalarında kolorektal karsinom gelişme riski, 50 yaş civarında yaklaşık olarak %100 oranında; HNPCC sendromunda ise, etkilenen hastanın birinci derece akrabasında %50 oranında artmaktadır (23). Ülseratif kolit hastalarında kolorektal karsinoma yönelik belirgin bir yatkınlık dikkati çekmekte, ancak bunlar genelde küçük bir grubu oluşturmaktadır (23,24).

2.8.3. Kolorektal karsinomların lokalizasyonu, klinik

Kolorektal karsinomların yaklaşık %50'si rektosigmoid bölgede, %30'u sağ kolonda, %20'si ise sol kolon ve transvers kolonda yerleşim göstermektedir. Sağ kolonda yerleşimli tümörler ileri yaşlarda, bayanlarda sık görülmektedir (25). Kolon karsinomları ilk yıllarda asemptomatik kalsa da sonraki dönemde barsak alışkanlıklarında değişiklikler, rektal kanama, anemi, nonspesifik karın ağrısı gibi semptomlarla belirti verir. İlk ve en sık bulgu ise dışkılamadaki değişimdir (23,25). Sağ taraf yerleşimli tümörlerde hastalar gizli kanama nedeniyle demir eksikliği anemisi ile kliniğe başvururlar ve genelde daha ileri dönemlerde belirti verirler. Lümen geniş, feçes daha sıvı kıvamlı ve tümör sıklıkla egzofitik büyüme gösterdiğinden obstrüktif bulgular nadirdir. Tümör sol kolonda yerleşmiş ise; lümenin darlığı, feçesin sert olması, tümörün daha çok anüler tarzda büyümesi nedeniyle konstipasyon bulguları sık görülür (25). Rektal kanama ikinci sıklıkta bildirilen yakınmadır. Aşık ya da gizli olabilir. Tümör distale yaklaştıkça kanama kırmızı olur. Karın ağrısı, yemeklerden sonra şişkinlik, hazımsızlık gibi nonspesifik şikayetler akut apandisit, kolesistit veya peptik ülser ile karıştırılabilir. Rektum tümörlerinde ağrılı dışkılama görülebilmekle birlikte bu geç

dönem bulgusudur. Hastaların yaklaşık %5'i kemik ağrısı, sarılık, patolojik kırık, nörolojik bulgular, tromboflebitler ve deri nodülleri gibi metastaz bulguları ile başvururlar (26). Hastalarda bu klinik bulguların ve belirtilerin herhangi birisi görüldüğünde rutin fizik muayeneye rektal muayene de eklenmelidir. Rektal muayenede bu bölgedeki tümörler değişik şekillerde ele gelebilir. Kalın barsak tümörlerinin yarısından çoğu rektosigmoidde yer aldığından kolonoskopinin tanıda önemli yeri vardır. Baryumlu kolon grafisi lezyonun barsak içindeki durumunu gösterir. Skiröz veya anüler lezyonlarda elma yeniği görünümü oluşurken, polipoid lezyonlarda lümen içinde kitle görülür. Kalın barsak tümörlerinde CEA (karsino embriyonik antijen) düzeyleri %97 oranında artmıştır (27). Kalın barsağında tümör rastlanan vakalarda metastaz açısından değerlendirilmelidir. Ultrason, akciğer grafisi, bilgisayarlı tomografi faydalanılacak yöntemlerdir (27).

2.8.4. Kolorektal karsinomların makroskopisi

Kolorektal karsinomlarda belirgin intraluminal büyüme ile ekzofitik/fungatif, belirgin intramural büyüme ile endofitik/ülseratif, lümenal daralma ve kolorektal duvarın sirkumferansiyel tutulumuyla anüler ve daha az yaygın olarak diffüz infiltratif/linitis plastika paterninde makroskopik büyüme gösterirler. Proksimal kolonda yerleşen tümörler genellikle ekzofitik kitleler oluştururken, inen kolonda yerleşen tümörler çoğunlukla endofitik ve anüler kitleler oluşturur. Makroskopik olarak nekroz alanları ve musin izlenebilir (22).

2.8.5. Kolorektal karsinomların histopatolojik varyantları

2.8.5.1. Müsinoz adenokarsinom: Tümörün %50'den fazlası ekstraselüler musinden oluşuyorsa müsinoz adenokarsinom olarak isimlendirilir. Kolorektal karsinomların %15'ini oluşturur ve çoğunluğu rektumda yerleşir (24). Kolonun diğer yerlerinde bulunan klasik adenokarsinoma oranla, adenomlarla daha sık birliktelik gösterir (28). Mikrosatellit instabilite (MSI) oranı yüksek olup, lenf nodu metastaz oranı yüksektir ve prognozu daha kötüdür (28).

2.8.5.2. Taşlı yüzük hücreli karsinom: Genellikle genç erişkinleri etkileyen bir formdur. Makroskopik olarak duvarda diffüz gelişim paterni ve mikroskopik olarak çok az veya hiç gland oluşturmayan gelişim paterni mevcuttur. Tümör hücrelerinin %50'den fazlasında belirgin intrasitoplazmik müsine bulunur (24). Lenf nodu, peritoneal yüzey,

over ve nadiren de karaciğere metastaz görülür. Peritonel yayılım esas yayılma paternidir ve prognozu oldukça kötüdür (24).

2.8.5.3. Adenoskuamöz karsinom: Bu nadir tümör ayrı odaklarda veya karışık skuamöz hücreli karsinom veya adenokarsinom alanlarını içerir. Skuamoz differasyon küçük odak şeklinde izlenmelidir. Kolonun saf skuamöz hücreli karsinomu nadirdir (24).

2.8.5.4. Meduller karsinom: Nadir görülen bir varyant olup, genellikle kadınlarda çekum ya da sağ kolonda yerleşimlidir. Belirgin intraepitelyal lenfosit infiltrasyonu mevcut olup, MSIH ile karakterize, prognozu iyidir (29).

2.8.5.5. Andiferansiye karsinom: Nadir tümör morfolojik, immunohistokimyasal ve moleküler biyolojik kanıtları ile epitelyal tümör diferansiyasyonunu kaybetmiştir. Bazıları MSI-H özelliği göstermektedir (24).

2.8.5.6. Serrated adenokarsinom: 2001 yılında serrated adenomların komşuluğunda tümörler izlenmesi ve bunların yapısal farklılıkların saptanması ile serrated adenokarsinomlar saptanmıştır. Epitelyal saçaksı yapılar bulunan, berrak ya da eozinofilik sitoplazmalı veziküler çekirdekli hücreler izlenmesi, nekroz olmaması yada nekrozun %10'dan az olması, müsin üretimi olması ve müsinöz tümör alanlarında papiller rodlar bulunması ile tanınırlar. Bu tümörler MSI, BRAF mutasyonu ve GpG adacık hipermetilasyonuna sahiptirler (30,31).

2.8.5.7. Kribriform komedo-tip adenokarsinom: Meme adenokarsinomlarında olduğu gibi geniş kribriform glandların lümeninde nekroz bulunur. Genellikle mikrosetallit stabildirler (32).

2.8.5.8. Mikropapiller adenokarsinom: Bu nadir varyant vasküler kanallara benzer şekilde, stromada küçük tümör adalarından oluşmaktadır. Meme ve mesane tümörlerinde de tanımlanmıştır. İmmunohistokimyasal olarak karakteristik MUC1 boyanma paterni gösterirler (33).

2.8.6. Histokimyasal ve immünohistokimyasal özellikler

Kolorektal karsinomların çoğunluğunda histokimyasal olarak müsin varlığı gösterilebilir. Konvansiyonel kolon adenokarsinomunda, müsinöz tipteki kolon karsinomundaki MUC2 müsin varlığının aksine, MUC1 ve MUC3 ekspresyonu gözlenmektedir (22). Adenomatöz poliplerde ise MUC2 ekspresyonu mevcut olup, epitelde atipi arttıkça MUC2 düzeyinde azalma gözlenir (34). Kolon adenokarsinomlarında CEA ile immünohistokimyasal reaksiyon varlığı değişmez bir

bulgu olarak kabul edilir. Keratin 20 pozitifliği ile beraber keratin 7 negatifliği beklenir (22). Kalretinin, kolorektal adenomların küçük bir kısmında, özellikle andiferansiye olanlarda eksprese olur. Kolorektal karsinomların çoğunda, özellikle müsinöz ve az diferansiye tümörlerde daha belirgin olarak hCG (“human chorionic gonadotropin”) ile reaksiyon %10 olguda PLAP (“placental alkaline phosphatase”) gösterilmiştir. Östrojen ve progesteron reseptörleri ekspresyonu genellikle izlenmez (22).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2010 histolojik sınıflaması Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kolorektal tümörlerin WHO histolojik sınıflaması 2010 (24).

EPİTELYAL TÜMÖRLER				
BENİGN TÜMÖRLER				
Adenom • Tübüler • Villöz • Tübülovillöz	İntraepitelyal Neoplazi • Düşük • Yüksek	Serrated Lezyonlar • Hiperplastik polip • Sesil serrated adenoma/polip • Traditional serrated adenom	Hamartomlar • Cowden-ilişkili polip • Juvenil polip • Peutz-Jegher polip	
KARSİNOMLAR				
Adenokarsinomlar	Skumöz hücreli	Adenoskuamöz	İğ hücreli	Andiferansiye
• Müsinöz • Taşlı yüzük hücreli • Serrated • Mikropapillar • Meduller • Kribriform komedo-tip	Nöroendokrin Tümörler			
	Nöroendokrin Neoplazmlar			
	Nöroendokrin Tümör (NET) • NET G1(Carcinoid) • NET G2			
	Nöroendokrin Karsinoma • Büyük hücreli NEC • Küçük hücreli NEC • Mikst adenonöroendokrin karsinom • EC hücre, serotonin üreten neoplazm • L hücre, glukagon benzeri peptid ve PP/PYY oluşturan NETs			
MEZENKİMAL TÜMÖRLER				
Benign Tümörler		Malign Tümörler		
• Leiomyom • Lipom • GIST		• Leiomyosarkom • Anjiosarkom • Kaposi Sarkomu		
LENFOMALAR				
• Diffüz büyük B hücreli lenfoma • MALT tipi marjinal zon B hücreli lenfoma • Mantle hücreli lenfoma • Burkitt lenfoma • Burkitt” benzeri “atipik Burkitt” lenfoma • Diğer				

2.8.7. Kolorektal karsinomlarda derece ve evre

Adenokarsinomlar mikroskopik olarak glandüler görünümüne göre iyi, orta, az diferansiye veya düşük grade'li (iyi ve orta derecede diferansiye tümör) ve yüksek grade'li (az diferansiye tümörler) olarak derecelendirilir. Heterojen tümörlerde derecelendirme daha az diferansiye alana göre yapılır. Glandüler yapıların oranı %95'ten fazla ise iyi diferansiye (grade 1), %50-95 ise orta derecede diferansiye (grade 2), %5-50 ise az diferansiye (grade 3), %5'ten az ise andiferansiye karsinom (grade 4) olarak adlandırılır (24).

Kolorektal karsinomalarda evreleme için ilk olarak 1937 yılında "Dukes" tarafından tarif edilen, rektal karsinomlarda kullanılmak üzere önerilen sistem kullanılmaktadır (Çizelge 2.2). Bu sistem, tümörün penetrasyon derinliği ile lenf nodu metastazının varlığı ya da yokluğuna dayalı olup, prognoz ile direkt ilişkili olduğu için halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Daha sonra 1954 yılında "Astler ve Coller" tarafından farklı bir evreleme sistemi önerilmiştir (22,24) (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.2. "Dukes" evrelemesi.

Evre A	Tümör kolon duvarında sınırlı, muskularis propriayı aşmamış
Evre B	Tümör tüm kolon duvarını tutup muskularis propriayı aşmış, kolonda serozayı, rektumda perirektal dokuyu invaze etmiştir. Lenf nodu tutulumu yok
Evre C	Lenf nodunda metastaz mevcut

Çizelge 2.3. Astler-Coller evrelemesi.

Evre A	Tümör mukozada sınırlı
Evre B1	Tümör submukozaya sınırlı, lenf nodu tutulumu yok
Evre B2	Tümör kas tabakasına sınırlı, lenf nodu tutulumu yok
Evre C1	Tümör barsak duvarını aşmadığı halde lenf nodu tutulumu mevcut
Evre C2	Tümör barsak duvarını aşmış ve lenf nodu tutulumu mevcut
Evre D	Uzak metastaz mevcut

TNM Evrelemesi (AJCC/UICC) (24)

T: Primer tümör	
TX	Primer tümör değerlendirilemedi
T0	Primer tümör yok
Tis	Karsinoma insitu
T1	Tümör lamina propria, muskularis mukoza veya submukozaya invaze
T1a	Tümör lamina propria veya muskularis mukoza invaze
T1b	Tümör submukozaya invaze
T2	Tümör muskularis propriaya invaze
T3	Tümör subseroza ya da nonperitonealize perikolik/perirektal dokuya invaze
T4	Tümör komşu organ ya da yapılara invazyon göstermekte ve/veya visseral peritonu perforasyon etmektedir
N: Bölgesel lenf bezleri	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi
N0	Lenf nodu metastazı yok
N1	1-3 lenf nodu tutulumu mevcut
N2	4 veya daha fazla lenf bezi tutulumu mevcut
M: Uzak metastazı	
MX	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz mevcut

Çizelge 2.4. TNM evrelemesi (24).

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1,T2	N0	M0
Evre IIA	T3	N0	M0
Evre IIB	T4	N0	M0
Evre III A	Herhangi bir T	N1	M0
Evre III B	Herhangi bir T	N2	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

2.8.8. Moleküler ve genetik özellikler

Kolonun ailevi karsinomlarının saptanması, bu tümörler ile ilişkili genetik değişikliklerin bulunmasına yol açmıştır. Bunların en önemlileri arasında APC (adenomatosis polyposis coli geni), MMR (mismatch repair) genleri, p53, K-ras (rat sarcoma) ve DCC (“deleted in colonic carcinoma”) sayılabilir (22,24,30). Tüm kolorektal kanserlerin aynı genetik yolu izlemedikleri, bir kısmında önemli bir alternatif yol olarak DNA’da MSI’ye (mikrosatellit instabilite) yol açan MMR bozuklukları oluşturdukları bilinmektedir (22).

Kolorektal karsinom patogeneğinde önemli rol oynayan bir diğer molekül grubu ise E-kadherin ve kateninlerdir. Bunlardan β -katenin, APC ilişkili bir protein olup, regülasyonunda adenom-karsinom sekansı boyunca tüm basamaklarda bozukluk görülmektedir (22). Moleküler teknikler ile kolorektal karsinomların çoğunda p53 mutasyonları tespit edilmiştir. Tümörlerin yaklaşık yarısında yerleşim yeri,

diferansiyasyon ve DNA ploidisinden bağımsız olarak p53 ile pozitif reaksiyon izlenmiş, transisyonel mukozada reaksiyon izlenmemiştir (22,30).

Kolorektal adenokarsinomların büyük bir kısmında ‘von Hippel-Lindau’ geni delesyonu bulunmuş, ayrıca adenokarsinomların %90’ında c-myc (myelocytomatosis viral oncogene homolog) onkogeninin ekspresyonunda artış tespit edilmiştir (22).

Ras onkogeni mutasyonları kolorektal karsinomların genellikle metastatik olanlarını da içeren küçük bir grubunda gözlenmiştir ve bu genin ekspresyonunun erken kanser morfogenezini etkilediği düşünülmüştür (22).

2.8.9. Yayılım ve metastaz

Kolon karsinomunun en sık metastaz yaptığı bölgeler bölgesel lenf nodları ve karaciğerdir. Karaciğere metastaz ve damar invazyonu izlenen olgularda lenf nodu metastazı da gözlenmektedir. Bu nedenle rezeksiyon materyali üzerinde lenf nodu taraması ayrıntılı olmalıdır. Nispeten sık metastaz görülen diğer alanlar periton, akciğer ve overlerdir. Merkezi sinir sistemi, kemik, testisler, uterus ve oral kaviteye metastaz daha nadirdir (22,25).

Kolorektal karsinomun küratif rezeksiyon sonrası 5 yıllık sağkalımı, büyük serilerle yapılan çalışmalarda %40-60 arasında bulunmuştur. Kaybedilen olguların %90’ında lokal rekürens ve/veya bölgesel lenf nodu metastazı bulunmuştur (30).

2.8.10. Tedavi

Kolorektal karsinomun standart tedavisi cerrahi eksizyon olup, cerrahinin tipi tümörün yerleşimine göre değişir. Çekum ya da çıkan kolon yerleşimli bir tümör için tercih edilen yöntem ileokolektomidir. Pelviste periton dönemecinin (Douglas boşluğunun alt ucu) altındaki tümörlerde kullanılan yöntem abdominoperineal rezeksiyon, kolonun diğer lokalizasyonundaki tümörlerde tercih edilen yaklaşım anterior rezeksiyondur. Operasyon sırasında kesi alanına implante tümör hücreleri sebebiyle anastomoz hattında lokal rekürensler görülebilir. Kolorektal karsinomun bilinen rezektabilitesi %92, operasyon mortalitesi %2’dir. Karaciğer ve diğer organlarda izlenen izole -bazı durumlarda birden çok da olabilen- uzak metastazlar, cerrahi eksizyondan fayda görebilir (22).

2.8.11. Kolorektal karsinomlarda prognostik faktörler

Prognoz, aşağıda sıralanan klinik ve patolojik parametrelerle ilişkilidir:

- Çok yaşlı ve çok genç hastalarda prognoz daha kötüdür.
- Kadınlar erkeklere göre daha iyi bir prognoza sahiptir (24).
- Kolorektal karsinomlar multifokal olabilirler. Kalın barsakta senkron veya metakron malignite bulunan hastaların beklenen yaşam süreleri soliter kolorektal karsinomlu hastalara benzerdir (35).
- Polipte insidental olarak gözlenen, sıklıkla mukoza ve submukoza arasında sınırlı mikroskopik karsinom odağının prognozu mükemmeldir (35).
- Tümör boyutu ve prognoz arasında belirgin bir ilişki olmasına rağmen bunun güvenilir bir belirleyici olmadığına dair kanıtlar vardır. Aynı şekilde tümörün boyutu ve lenf nodu metastazlarının sıklığı arasındaki ilişki zayıftır (36).
- Obstrüksiyon ve perforasyon varlığı kötü prognoz ile ilişkilidir (36). Perfore tümörler T4 olarak kabul edilir. Bu nedenle perforasyonun saptanması ve gösterilmesi önem taşır (24).
- Tümörün derin invazyonu özellikle seroza yüzeyinin tutulumu, infiltratif büyüme paterni ve tümördeki tomurcuklanmalar kötü prognozla ilişkilidir (24).
- Karsinomun itici sınırlara sahip olması ve peritümöral ve tümör alanı içindeki lenfositlerin varlığı prognozu olumlu etkiler (24).
- Serozal yayılım ve bölgesel lenf nodu metastazı kötü prognoz ile ilişkilidir (36).
- Venöz invazyon varlığında hastalıksız yaşam süresi en az 5 yıl olmak üzere belirgin derecede azalır. Özellikle muskularis proprianın dışında yer alan damlarda tümör bulunmasının daha da güçlü bir prognostik faktör olduğu öne sürülmektedir (24). Perinöral invazyon genellikle ilerlemiş hastalığın işaretidir (37).
- Tümörün tomurcuklanarak büyümesi önemli prognostik faktördür (24).
- Müsinöz, taşlı yüzük hücreli ve anaplastik tipin prognozu kötüdür (38).
- Perikolik ve perirektal yağ dokusunda düzensiz tümör depozitleri prognozun kötü olması ile ilişkili saptanmıştır (36).
- Neovaskularizasyon, tümör büyümesinde kritik bir rol oynar ve artışı kötü prognostik faktör olarak yorumlanır. Çok sayıdaki bağımsız çalışmada, tümör anjiogenezisinin rekurrensi önceden bildirdiği ve kolorektal karsinomda beklenen yaşam süresini kısalttığı bildirilmiştir (39).

- Tümör lenf nodlarına yayıldığında 5 yıllık sağkalım oranı belirgin bir azalma gösterir. Tutulan lenf nodu sayısının fazla olması, bunların tümör apikalinde ve mezenter damar köklerinde olması ve perikapsüler yayılım içermesi kötü prognoz göstergesidir. İmmunohistokimyasal ya da moleküler tekniklerle saptanan mikrometastazlar da tartışmalı olmakla birlikte, kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (40)
- MSI-H yokluğunda taşlı yüzük hücreli karsinom ve adenokarsinom ile adenoskuamöz karsinom ve küçük hücreli karsinom kötü prognozla ilişkilidir (24).
- Kolorektal karsinomlarda en önemli prognostik faktör evrelemedir (24).
- Kısa longitudüal cerrahi rezeksiyon sınırı (n:2-5 cm) kötü prognozla ilişkilidir.
- Kolorektal karsinomlarda kromozom 18q allelinin kaybı oldukça güçlü bir negatif prognostik faktördür. Evre III kolon karsinomu için mikrosatellit instabilitesi bulunan tümörlerde 18q allelinin tutulması, adjuvan kemoterapi sonrası olumlu sonuca işaret eder (41).

2.9. Kolorektal Adenomatöz Polipler

Gastrointestinal sistemde görülen polipler içerisinde anormal mukoza matürasyonu, inflamasyon veya yapısal bozukluk sonucu oluşan gruba nonneoplastik polipler adı verilir; bu poliplerin malignite potansiyeli taşımadıkları düşünülür. Hiperplastik polipler en tipik örnekleridir. Epitelyal polipler, proliferasyon ve displazi içerdiklerinde adenomatöz polip veya adenom adını alır. Bunlar gerçek neoplastik lezyonlar olup, karsinom prekürsörü olarak kabul edilirler (22,42).

Adenomlar (adenomatöz polipler) intraepitelyal neoplazmlardır. Çeşitli büyüklükte, saplı veya sesil olmak üzere geniş bir morfolojik yelpaze içinde görülebilirler. Kolon adenomlarının sıklığı 40 yaşından önce %20-30 civarında olup, 60 yaştan sonra sıklığı artarak %40-50'ye ulaşır. Kadın ve erkekte eşit olarak görülür. Sporadik adenom gelişiminde ailevi bir eğilim görülür (22). Adenomatöz polipler, epitelin yapılanmasına göre tübüler, villöz ve tübülovillöz adenomlar olarak üç alt tipe ayrılırlar. Bu kategoriler arasında belirgin bir örtüşme olduğundan bir adenomun %75'den fazlasını tübüler yapılanma oluşturuyor ise tübüler adenom, %50'den fazlasını villöz yapılanma oluşturuyor ise villöz adenom, %25-50 arasında villöz yapılanma var ise tübülovillöz adenom adı verilmektedir. Adenomatöz polipler arasında en sık görüleni tübüler adenomlardır. Geriye kalan %5-10 olguyu tübülovillöz ve %1'ini villöz

adenomlar oluşturmaktadır (22,23). Bir adenomatöz polibin malignite riski birbirinden bağımsız üç özellik ile korelasyon gösterir. Bunlar polip çapı, histolojik yapı ve epitelde displazi derecesidir. Çapı 1 cm'den küçük olan tübüler adenomlarda malignite nadir görülürken, 4 cm'den büyük, sesil villöz adenomlarda ağır displazi genellikle villöz alanlarda izlenir malignite riski yüksektir (yaklaşık %40). Bununla birlikte herhangi bir adenomda tüm displazi dereceleri ve hatta invaziv karsinom mevcut olabilir; dolayısıyla polibin klinik öneminin makroskopik olarak belirlenmesi mümkün değildir (24,25). Bütün adenomlar yüzeysel kabarıklık lezyonları değildir. Bazıları düz ("flat") veya çökük ("depressed") lezyonlardır ve sadece histopatolojik inceleme ile tanınabilirler. Bunlara mikroskopik adenomlar da denir (22,43). Bir adenomdaki malign değişimin klinik önemi aşağıdaki durumlara bağlıdır (22,23).

- Yüksek grade'li displazi (karsinoma in situ) varlığı durumunda henüz metastaz yapma kapasitesi bulunmaz ve klinik olarak benign bir lezyon olarak kabul edilir.
- Lamina propria'yı invaze eden intramukozal karsinomların metastaz potansiyelinin olmadığı veya minimal olduğu kabul edilir.
- Eğer lezyon submukozal alana geçerse, invaziv adenokarsinom oluşur. İnvaziv adenokarsinom, metastaz kapasitesi olan malign bir tümördür. Bununla birlikte eğer adenokarsinom yüzeysel, sap cerrahi sınırında lezyon yok, kan ve lenf damarı invazyonu izlenmiyor ve karsinom iyi veya orta derecede diferansiye ise, yeterli eksizyon sağlanmış kabul edilir.
- Sesil bir polipten invaziv adenokarsinom gelişmiş ise, polipektomi yeterli rezeksiyonu sağlayamayabilir. Pedinküllü ve sesil adenomların tek yeterli tedavisi lezyonun tam çıkarılmasıdır. Eğer hastada adenomatöz epitel kalırsa, premalign lezyon varlığı sebebiyle karsinom gelişebilir (22,23).

2.9.1. Tübüler adenom

Kolorektal epitelyal polipler içinde çoğunluğu tübüler adenomlar oluşturur (22). Tübüler adenomların çoğu (%90) kolonda bulunur, ancak mide ve özellikle ampulla vateri çevresinde olmak üzere intestinal yerleşimli de olabilirler (43). Çoğu polip asemptomatik olmakla birlikte, dışkılama alışkanlığında değişiklik, intususepsiyon ve kanama bulgusu gösterebilir. Bu sebeple anemi ve gizli kanama nedenleri araştırılması sırasında rastlanmaları sık görülen bir durumdur. Çoğu küçük ve pedinküllüdür; düz ya da çökük formları da görülebilir (22,25). Büyüklükleri 2,5 cm çapını nadiren aşar. Sap,

fibromusküler doku ve belirgin kan damarlarından oluşur ve submukozadan gelişir. Adenomatöz epitel sap kısmında da olabilir ve sap çevresindeki mukozaya da yayılabilir. Hepsi displastik epitel içerir (22). Mikroskopik olarak hücreler kalabalık, geniş ve genellikle hiperkromatik nükleusludur ve mitoz sayısında artış vardır. Nadiren atipik mitoz görülebilir. Müsin yapımı oldukça değişken olmakla birlikte genellikle azalmıştır. Akım sitometrisi ile hastaların %35'inde anöploidi varlığı tespit edilebilir. Olguların az bir kısmında p53 ekspresyonunda artış gösterilmiş olmakla birlikte neredeyse tamamında bcl-2 immünreaktivitesi mevcuttur (22). Displazinin derecesi; hastanın yaşı, polip sayısı ve villöz komponentin miktarı arttıkça artmaktadır. Displazi, hafif, orta ve ağır olarak kabaca üç grupta sınıflandırılabilir. Psödoinvazyon, polip sapının tekrarlayan torsiyonunun sorumlu tutulduğu önemli bir durumdur (22). Kolonik karsinojenlerle oluşturulan deneysel hayvan modellerinde 'aberran kript' adı verilen ve mikroskopik displazi odakları içeren genişlemiş, hiperplastik glandlardan oluşan alanlar izlenmiştir. İnsanlarda karsinom tespit edilen kolonlarda bu alanlar normal kolonlara göre daha fazla bulunur. Aberran kript, karsinom gelişiminde olası prekürsör bir lezyon olarak değerlendirilebilir (44). Tübüler adenom ve tübülovillöz adenomun tedavisi eksizyon ve sonrasında endoskopi ile takiptir (22).

2.9.2. Villöz adenom

Daha az görülen villöz adenom, genellikle yaşlılarda rektum veya rektosigmoid yerleşimli, tek ve büyük bir kitle şeklinde izlenir (22). Diğer polip tiplerine göre daha sık semptom verirler. Genellikle belirgin rektal kanama, daha nadir olarak da hipoproteinemi ve hipokalemi ile saptanırlar (25). Geniş bir tabana oturan papiller villöz uzantıları vardır. Lezyonların %10'undan azı bir pedinküle sahiptir. Genelde mukozadan 1-3cm kabarıklık gösterirler, bazen çapları 10 cm'yi aşabilir. Mikroskopik olarak uzun, taç veya eğrelti otu yaprağı benzeri papiller çıkıntılar izlenir (22,25). Villöz adenomlarda displazi derecelerinin hepsi görülebilir, çoğu zaman içerisinde %29-70 oranında malign transformasyon gösterir. İnvaziv karsinom geliştiğinde, genellikle sapları olmadığı için sıklıkla kolon duvarına submukoza ve daha derin tabakalara invazyon gözlenir (42). Karsinom mevcut değilse tedavisi total eksizyondur (22).

2.9.3. Tübülovillöz adenom

Adenomatöz polibin tübüler ya da villöz komponentinin toplam alanın %25-50'sini oluşturması durumunda tübülovillöz adenom adı verilir. İzlenen adenomatöz poliplerin

%5-10'u tübülovillözdür. Görülme sıklığı, çapı, displazi derecesi, saplı veya sapsız oluşu gibi özellikleri tübüler ve villöz lezyonlar arasındadır. İn situ veya invaziv karsinom gelişme riski, villöz komponentin oranı ile korelasyon gösterir (22).

2.10. Kolorektal Karsinogenez

2.10.1. Adenom - karsinom sekansı

Günümüzde kolon kanseri gelişiminde patogenetik olarak farklı üç yolak tanımlanmıştır. Her üç yolakta rol oynayan genler ve mutasyonların oluşum mekanizmaları farklı olsa da benzer şekilde, aşamalar halinde mutasyonlar oluşarak etkileri birikir (45).

2.10.1.1. Kromozomal instabilite yolağı: Kolorektal karsinom patogeneğinde sorumlu genomik instabiliteden yaklaşık %75-80'inde kromozomal instabilite yolağı görülür. Bu yolakta bir seri onkogen ve tümör baskılayıcı gende mutasyon birikimi oluşur (41). Başlangıçta kolonda, bölgesel epitel proliferasyon bulunur. Bunu küçük adenomatoz polip gelişimi takip eder, zamanla boyut ve displazi artar ve sonunda invaziv kanser ortaya çıkar. Genetik değişiklikler, bu morfolojik yolak ile aşağıda belirtildiği gibi bir ilişki gösterirler:

(a) APC geni kaybı: APC geni 5q21'de haritalanmıştır ve adenom oluşumunun en erken olayı olduğuna inanılır. Bu tümör baskılayıcı gen, hücre göçü ile adezyonunu kontrol eden bir proteini kodlar. Aynı zamanda β -katenin düzeyini kontrol eden bir bekçi ("gatekeeper") proteini olarak da rol oynar. Bu sinyal yolağı normal kolon epitelinin gelişimi ve kolorektal karsinom oluşumunda etkilidir. Kolorektal karsinomların %80'den fazlasında inaktif APC, APC mutasyonunun olmadığı kanserlerin %50'sinde ise β -katenin mutasyonları vardır. Eğer β -katenin, hücre nükleusuna geçerse bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynar ve bazı durumlarda hücre adezyonuna katılır. Bu görevi sırasında GSK-3- β ("glycogen synthase kinase") ve APC'yi de içeren bir kompleks, β -kateninin bozulmasına yol açar. APC mutasyonunda sitoplazmada β -katenin birikir ve nükleusa geçerek bir transkripsiyon faktörü ailesine bağlanır. Aktive edilen genlerin MMP-7, c-myc ve cyclin-D1 gibi hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenleyen genler olduğu düşünülmektedir (41).

(b) K-ras mutasyonu: K-ras geni kolon kanserleri ve adenomlarında en sık görülen aktif onkogendir ve hücre içi sinyal iletiminde rol oynar. Mutasyonu 1 cm'den

daha küçük çaplı adenomların %10'undan azında, 1 cm'den büyük adenomların ve karsinomların yaklaşık %50'sinde görülür (46).

(c) SMAD'ların kaybı: Kolon kanserlerinde ortak bir özellik de SMAD2 ve 4'ü de kodlayan (TGF- β sinyalinde görevli) 18q21'de allel kaybıdır. SMAD4'ün eksikliği gastrointestinal kanalda tümör sıklığını arttırır (24).

(d) p53 kaybı: Kolon kanserlerinde geç dönemde %70-80 oranında p53 geninde kayıp bulunmuştur. Bu durum adenomlarda çok nadirdir (47).

(e) BRAF mutasyonu: K-ras mutasyonu içermeyen kolorektal kanser olgularının yaklaşık %14'ünde ve sporadik MSI gösteren olguların hemen tümünde BRAF geninde aktive edici mutasyonlar saptanmıştır (48). BRAF geni (7q34)18 ekzon içermekte olup, mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolağında RAS/RAF/MEK/ERK sinyal iletiminde KRAS'ın primer efektör proteini olarak rol almaktadır.

2.10.1.2. Mikrosatellit instabilite yolağı: Kolorektal tümöregenezde ikinci yolak, DNA MMR genlerinde oluşan bozukluklar ile dikkati çeker. Kolorektal karsinomlu olguların %15-17'sinde mikrosatellit instabilite yolağı sorumludur. HNPCC sendromundan gelişen tümörlerin hemen tamamında ve sporadik kolorektal kanserli olguların %10-15'inde MSI yolağı görülür. DNA MMR genlerindeki inaktivasyon sonucu ortaya çıkan DNA onarımındaki bozukluklar temel özelliktir. Genlerin herhangi birindeki kalıtsal mutasyonlar DNA onarımını etkiler (48). İnsandaki bu MMR genleri, hMSH2, hMLH1, MSH6, hPMS1 ve hPMS2'dir. Mutasyonların %90'ı hMSH2 ve hMLH1'de olur. MSI gösteren tümörler sergiledikleri hata düzeyine göre, düşük ve yüksek düzeyde kararsız (sırasıyla MSI-L, MSIH) olarak sınıflandırılmaktadır (48).

Mikrosatellitler insan genomunda tekrarlayan sekans fragmanlarıdır ve DNA replikasyonu sırasında yanlış dizilme eğilimleri vardır. Bazı mikrosatellit sekanslar genlerin kodlanmış bölümlerinde veya hücre çoğalmasını düzenleyen genlerin promoter bölgelerinde bulunur. MMR bozulduğunda hem bu genlerde hem de çoğalmayı düzenleyen diğer genlerde mutasyon birikir ve hepsi topluca kolorektal karsinomun ortaya çıkmasını sağlar. MMR genlerinde homozigot kayıp olduğunda, mutasyon oranı normalden 1000 kat daha fazla gözlenir (48).

2.10.1.3. CpG adacık metilasyon fenotipi. DNA metilasyonu, bir guanin bazına göre 5' konumunda sitozin bazlarının 5 karbon (C5) konumuna bir metil grubunun kovalent bağla bağlanması anlamına gelir. Bu, DNA kodunu değiştirmese de ve DNA molekülünde çok küçük bir kimyasal modifikasyon olsa da, düzenleme açısından

sonuçları çok önemli olabilir. Olağandışı DNA metilasyonu çeşitli kanserlerle yakından ilişkilidir. İnsan kanserinde iki anormal DNA metilasyonu vardır: 5- metil-sitozinin tümünden kaybı (genel hipometilasyon) ve gen promotörüyle ilişkili (CpG adasına özgü) hipermetilleme (24,49). Gen promotörleri hipermetillendiklerinde gen ifadesinden sorumlu faktörlere bağlanamazlar. Böylece gen etkin olmayan bir hale gelir. Çok sayıda gen içeren DNA metillemesi üzerine yapılan çalışmalar, bazı kanser tiplerinde kanserle ilişkili gen gruplarının eşzamanlı olarak metillendiği görülmektedir; bu, CpG adası metilleyicisi (CIMP) fenotipi olarak bilinen bir olgudur(49). CIMP li tümörler genellikle MLH1 mismatch geninin metilasyonundan dolayı MSI-H'dırlar. Ancak CIMP karsinomların %50'den fazlası mikrosatellit-stabildirler.

2.11. Kök Hücreler

Organizmayı oluşturan hücreler çoğalma, bölünme ve büyüme özellikleri açısından birbirlerinden farklılıklar göstermektedirler. İleri farklılaşma gösteren eritrositler ve sinir hücrelerinin bölünmedikleri kabul edilir ve bu hücreler post mitotik hücreler olarak tanımlanır. Kök hücreler, kendi-kendilerini yenileme ve belirli organa veya dokuya özel karakteristikleri olan, olgun hücreye farklılaşan hücreler olarak tanımlanmaktadır. Kök hücreleri; embriyonik kök hücreleri (EKH), germinal kök hücreleri(GKH) ve somatik kök hücreleri (SKH) olmak üzere üç ana gruba ayrılır (50).

- a) **EKH:** Blastosistin iç hücre tabakası EKH'ni oluşturur. EKH totipotentdirler, yani yetişkin organizmadaki herhangi bir hücre tipini oluşturma kabiliyeti vardır. Günümüzdeki EKH araştırmaları, daha çok doku transplantasyonu ve tamirinde kullanılmak üzere doku ve organ oluşumuna odaklanmıştır.
- b) **GKH:** Embriyonun germinal tabakasından oluşmaktadırlar ve farklılaşarak belli organı oluştururlar.
- c) **SKH:** Somatik veya yetişkin dokuya-özü kök hücreler: EKH gibi totipotent değildirler, kendilerini yenileme kapasiteleri vardır ve belli organ veya dokudaki tüm hücrelere farklılaşabilirler. SKH; intestinal sistemi de içerecek biçimde birçok farklı organda belirlenmiştir. Bu kök hücreler hayat boyunca dokunun sınırları içinde dokunun yenilenmesini ve devamını sağlarlar. Bu hücreler normal dokunun dengesini ("homeostasis"), tamirini, yaralanmadan sonra iyileşmesini sağlarlar ve çevresel strese karşı sorumludurlar. Özellikle gastrointestinal epitel hücreleri gibi

yaşam süresi kısa olan ve hızla yenilenme gereksinimi olan hücreler SKH havuzlarında yenilenirler (50).

2.11.1. Sindirim sistemi epitel kök hücresi: Organizmanın yaşamı boyunca kök hücrelerden köken alan farklılaşmamış epitel hücreleri sindirim sisteminde hızlı hücre yenilenmesini sağlarlar. Epitel hücre yenilenmesi; epitel ve bağ dokusu arasındaki hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matris etkileşiminin sıkı bir kontrolü altındadır. Özellikle kök hücre etrafındaki mikroçevre "niche" bu kontrolde çok önemlidir ve sindirim sisteminde görülen birçok hastalık ve kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Sindirim sistemi epitelinin yenilenmesinde rol oynayan önemli faktörler: Wnt/T-hücre faktörü-katenin (TCF/beta-catenin), Notch, Sonic hedgehog (Shh)/kemik morfogenezik protein (bone morphogenetic protein-BMP) sinyal yollarıdır (6).

Musashi 1 (MSI-1) ilk tanımlanan kolon kök hücresidir. İlk olarak drosophilada sensory organ prekürsörünün asimetrik bölünmesi esnasında bulunmuştur. MSI-1 memelilerde ayrıca sinir sistemi gelişim aşamalarında da etkili olduğu bulunmuştur (6,7).

2.12. Kanser Kök Hücreleri (KKH)

Alman patolog Rudolf Virchow ilk olarak 1855 yılında kanser kök hücre hipotezini ortaya atmıştır. Daha sonra Lapidot 1994 yılında akut myeloid lösemi hücrelerinde kök hücreleri göstermiştir. Bu keşiften sonra kanser kök hücreleri solid tümörlerde de araştırılmaya başlanmıştır. O'Brien ve Vitianni 2007 yılında kolon kanser kök hücrelerini bulmuşlardır. Kanser kök hücre teorisine göre, bunlar kanser hücrelerinin kendi-kendilerini yenileme ("self-renewal") ve farklılaşma özelliği olan alt gruplarıdır. Yalnız bu iki özelliğe sahip hücreler "Kanser Kök Hücresi" (KKH) olarak adlandırılır. Kanser kök hücresi "kanseri başlatan hücre" olarak da adlandırılmaktadır. Son zamanlarda kolon kanserine ek olarak da kan, meme, beyin, dalak, baş ve boyun, deri ve over kanserlerinde KKH'lerin olduğu bildirilmiştir(4).

Dokuya özgü hücre yüzey belirteçleri kullanılarak kanser tipine özgü kanser kök hücrelerini belirlemek mümkündür. Örneğin kolon kanserinde ESA, CD44, CD166 ve CD133'ün kanser kök hücre belirteçleri olduğu saptanmıştır (3,6,7). O'Brien ve arkadaşları ilk olarak immun yetmezlikli farelerin böbrek kapsüllerinde insanlarda kolon kanserini başlatan ve devam ettiren CD133 pozitif hücreleri bulmuşlardır. Deneysel

çalışmalarda immun yetmezlikli farelere CD 133 pozitif kök hücre enjeksiyonu sonrası kolon kanserinin geliştiği izlenmiştir.

Kanserle ilgili birçok sinyal ileti sistemi kök hücrelerinin kendi-kendini yenileme ve farklılaşmasını da düzenlemektedir. Bu sistemlerin içerisinde Wnt, Hedgehog, Shh ve Notch sinyal ileti sistemi oldukça önemlidir. Normal ve transforme olmuş kök hücrelerin kendi-kendilerini yenileme mekanizmaları benzer sinyal ileti sistemleri ile fakat farklı şekilde düzenlenmektedir. Normalde kök hücrelerinin kendi-kendilerini yenilemesini düzenleyen sinyal ileti sistemleri, sistemde aksilik olduğunda tümör oluşumuna öncülük de edebilmektedir (4).

Kanser kök hücresi ile normal kök hücre arasındaki kendi-kendini yenilemenin mekanistik farklılığının kanser tedavisinde kullanılabileceği, böylece normal kök hücrelere zarar vermeden kanser kök hücreleri hedef tedavi olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (4,5).

Son yıllarda kanser tedavilerinde dikkati çeken ve tedavide yardımcı yeni hedef moleküllerin ortaya çıkmasını sağlayan en önemli gelişmelerden biri embriyonik ve tümorojenik yolakların birbirleriyle bağlantılarının keşfedilmesidir(8). Buna bağlı olarak kanser kök hücresi (KKH)'ne bağlı oluşan direncin ortadan kaldırılarak kanserin tedavi edilmesini hedefleyen çalışmalar giderek yoğunlaşmaktadır. Özellikle embriyonik dönemden itibaren kök hücre ve bu hücrelerdeki Notch yolağının ortak inhibisyonunun tanımlanması ve yeni invitro araştırmalarla desteklenmesi kanser tedavisi açısından umut vericidir (8).

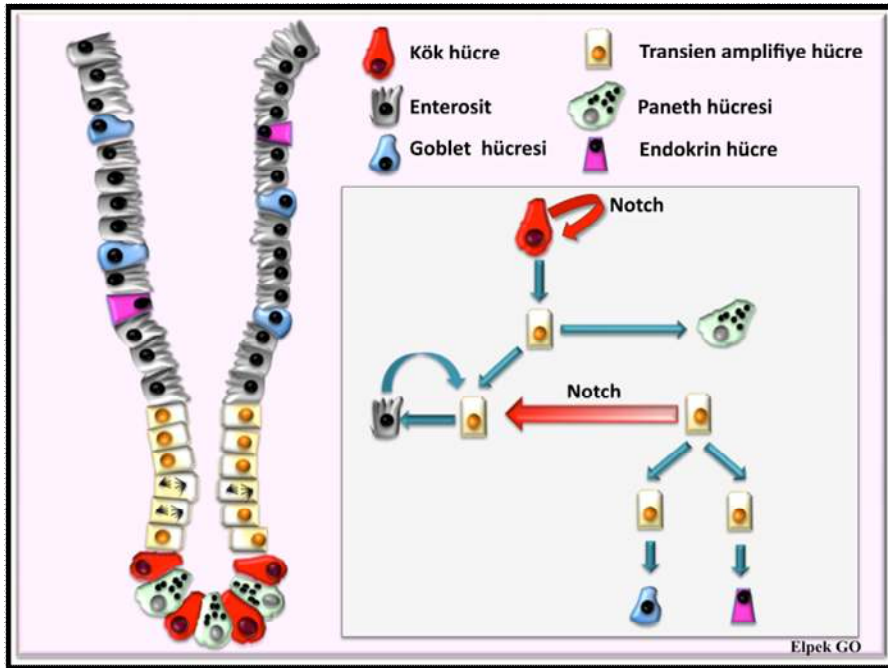
2.13. Kolon Kanserinde Kök Hücreler

Yeni tedavi rejimleri geliştirilmesine rağmen kolorektal kanserlerin yaklaşık %50'sinde rekürrens görülmektedir. Tümör rekürrensinden sorumlu primer neden kemoterapiye dirençli kanser kök hücreleri olduğu düşünölmektedir (6,7).

Normal kolonda milyonlarca kript vardır ve her birinde 200 tane hücre yer alır. Kriptlerde 3 ana hücre bulunur; kolumnar hücreler (kolonositler), goblet hücreleri (müsin sekrete eden hücreler) ve enteroendokrin hücrelerdir. Dördüncü bir grup olarak asendan kolonda yer alan Paneth hücreleri alınabilir. Kolonik kriptleri üst yüzeyi diferansiye hücrelerden oluşurken alt kısmında transit amplifiye hücreler (TA) vardır.

Kök hücreler her kriptte 5-10 adet bulunur. Kript tabanında, bazal lamina ve kök hücrelerin çevresinde myofibroblast dizisinden oluşan mezenkimal hücreler vardır. Bu

alanlara niş adı verilir. Bu bölgede epiteli oluşturan pluripotent hücreler kript bazalinde yerleşir. Kök hücreler asimetrik hücre bölünmesi sonucunda iki tane yavru (daughter) hücreye dönüşürler (51). Asimetrik bölünme sonrası hücrelerden bir tanesi kendini yenilerken diğeri de terminal diferansiye olmak için transient amplifiye hücreye dönüşür. Wnt, BMP, Notch sinyal yolağı, ephrin tip B reseptör ve tirozin kinaz kök hücrelerin davranışını, migrasyonunu ve diferansiasyonunu düzenler. Bu bölgede kript çevresi yerleşmiş myofibroblastlardan büyüme faktörleri ve sitokinler salarak epitelyal kök hücre fonksiyonlarını düzenlerler (51,52). Ayrıca myofibroblastlar Wnt sinyalini, BMP reseptör antagonistlerinden hangisine bağlanacak ise gremlin1 ve gremlin2'i, bazal epitelyal kök hücrelerinde Notch sinyalini aktive ederler. Yapılan çalışmalarda Notch sinyalinin hücre proliferasyonunda, diferansiasyonunda ve apoptozis gibi önemli hücresel olaylarda rol aldığı bilinmektedir. Kolonda kriptlerin orta 1/3'lük kısmındaki proliferatif zonda Notch1 ve jagged1 ekspresyonları saptanmıştır. Kolonda Notch2 ekspresyonuna ise rastlanmamıştır. Notch temel olarak kök ve progenitör hücrelerin diferansiyasyonunu regule etmektedir (10,51).



Şekil 2.1. Enterik sistemde kök hücrelerin hücresel farklılaşmasında Notch etkisi.

2.14. Kök Hücrelerde Notch Yolağı

Notch sinyalleri hem *Drosophila* ve *C.elegans*ta, hem de memeli kök hücrelerinde intestinal, deri, hematopoetik ve germinal kök hücrelerinde saptanmıştır (9).

Drosophila orta barsağında (midgut) intestinal kök hücrelerinde yüksek oranda Notch yolağını aktive edip enterositlere dönüşümünü sağlayan sinyaller saptamışlardır (53). Diğer bir yandan Notch aktivasyonu kök hücre nişinde bulunan hücre markerlarını da artırmaktadır.

Hipoksi kök hücrelerde Notch bağımlı olarak oluşan nöronal ve myojenik diferansiasyonu bloke eder. Hipokside Notch'u direkt inhibe eden HES-1 ve HEY-2 genlerinin ekspresyonu artar. Notch intraselüler bölgeleri (domain) hipoksi ile indüklenen faktör 1- α (Hif 1- α) ile direkt ilişkidir (9,53).

Notch sinyali ayrıca insanlarda intestinal kriptlerde matur enterositlere diferansiye olan progenitör hücre popülasyonunda da kritik bir role sahiptir. Notch sinyalinin barsakta hem kaybı hem de overekspresyonu önemlidir. Gama sekretaz inhibisyonunda veya Notch kaybında azalan Notch sinyalleri nedeniyle proliferasyon kaybı ve goblet hücrelerine dönüşüm artarken; Notch overekspresyonu kriptlerde proliferasyona neden olur ve goblet hücrelerine dönüşüm azalır (10). İntestinal kriptlerde Notch etkisi Şekil 2.1'de özetlenmiştir.

2.15. Kanser Kök Hücrelerinde Notch Yolağı

Kanser kök hücreleri antijen, molekül ve sinyal yollarından oluşan spesifik kök hücre markerlarını içerir. Bu yolların regülasyonu sonucunda kendi kendini yenileme ve hücre kaderinin belirlenmesi gerçekleşir (9). Notch yolağının da aralarında bulunduğu NF- κ B, B lenfoma Mo-MLV insertion region (Bmi-1), Wnt, Sonik hedgehog yolağı gibi yollar, transkripsiyon faktörleri ve moleküller onkogenezis ile ilişkilidir (9).

Notch sinyali insanlarda hem kök hücrelerde, hem de progenitör hücrelerde bulunmaktadır. Anormal Notch sinyali karsinogeneizde hücrelerin kendi kendini yenilemesine ve normal kök hücrelerin regülasyonunun bozulmasına neden olur. Notch sinyali birçok kanser türünde saptanmıştır (54). Çalışmalar sonucunda Notch sinyalinin kanser hücrelerinin büyümesi, invazyonu ve metastazında etkili olduğu bulunmuştur. Bundan yola çıkılarak Notch sinyal inaktivasyonunun kanser tedavisinde kullanılabileceği öne sürülmüştür. Servikal, akciğer, kolon, baş boyun tümörleri, renal hücreli karsinom, akut myeloid lösemi, hodgkin lenfoma, büyük hücreli lenfoma ve pankreatik kanser gibi tümörlerde Notch reseptör ve ligandların ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Hepatoselüler karsinom, deri ve küçük hücreli akciğer karsinomu gibi bazı tümörlerde ise Notch sinyalinin tümör supresör etkisi olduğu görülmüştür (9).

2.16. Notch

Notch geni ilk olarak 1917 yılında drosophilada saptanmıştır. İlerleyen zamanlarda Notch geni memelilerde de bulunmuştur. Notch sinyali birçok organın fonksiyonu ve gelişiminde, hücre proliferasyonu, sağ kalımı, diferansiasyon ve apoptozis gibi olaylarda önemli role sahiptir (55).

Memelilerde 4 adet (Notch 1-4) Notch reseptörü bulunmaktadır. Notch reseptörleri tek transmembran bir proteindir ve tek bir prekürsör olarak sentezlenip golgide membrana transfer olmadan önce furin benzeri proteazlar tarafından kırılır. Bu ilk ayrılma sonucunda ekstraselüler ve transmembran domainleri oluşur. Ekstraselüler bölge ve transmembran bölgeleri noncovalent ve Ca^{++} ile birbirlerine bağlanmışlardır (56). Notch reseptörleri ekstraselüler kısmının N-terminal ucunda 29-36 adet epidermal growth faktör-benzeri (EGFB) ligand bağlayan tekrar kısımları vardır. Bu tekrarları 3 adet LIN-12 tekrarı izler ve bu kısım ligand bağlanması olmadığı zaman aktivasyonu önler (55-58). İlk ayrılma LIN-12 tekrarlarından sonraki 100 rezidu çevresinde gerçekleşir. Böylece ekstraselüler kısım ayrılır ve ekstraselüler kısmından transmembran tarafında çok kısa sistein rezidüleri geriye kalır (10,56). Transmembran subunitin intraselüler kısmında RAM bölgesi ve bunu izleyen ankyrin/CDC10 tekrarları vardır her ikisi de nükleusta transkripsiyon faktörlerine bağlanır. Ankrin tekrarlarının her iki tarafında da nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) bulunmaktadır. NLS'yi izleyen kısımda prolin, glutamat, serin ve threonin dizisi (PEST) bulunmaktadır (10,59). Memeli Notch reseptörleri birbirlerine çok benzemekle birlikte, bazılarının ekstraselüler ve sitoplazmik bölgelerinde farklılıklar bulunmaktadır. Notch1 ve Notch2; 36 adet EGFB tekrar bulundururken Notch3'de 34 adet Notch 4'de ise 29 adet EGFB tekrar bulunmaktadır (56). Notch1'in transaktivasyon bölgesi daha güçlü iken Notch2'ninki daha zayıftır, Notch 3 ve Notch 4'de transaktivasyon bölgesi bulunmamaktadır (56,57). Bu özellikler kısaca Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

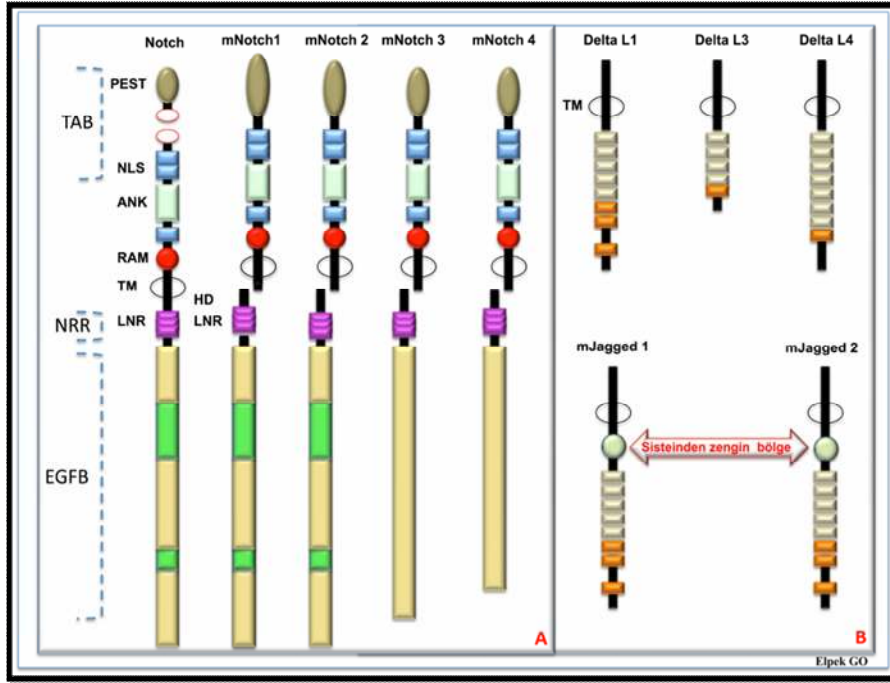
Notch ligandları; DSL ailesine ait tek transmembran proteini şeklindedirler. Drosophilada Delta ve Serrate olmak üzere 2 çeşit ligand vardır (60). Memelilerde Serrate homoloğu olan 2 tane Jagged1 ve Jagged2, Delta homoloğu olan 3 tane de Delta-like1, Delta-like3, Delta-like4 ligandı bulunmaktadır. Ligandların N-terminal ucunda reseptör ile bağlantıyı sağlayan DSL modifleri bulunmaktadır. DSL modiflerini EGFB tekrarları izler ve bu kısım transmembran bölgesindedir (60,61). Ligandın sitoplazmik kısmı 70-215 aminoasit içeren küçük bir kısımdan oluşmaktadır. Ligandların sayısı ve

EGF-like tekrar aralıkları farklıdır. Jagged1 ve Jagged2’de EGFB tekrarların altında sisteinden zengin domain bulunur (10,60,62-65).

2.16.1. Notch sinyal yolağı

Notch sinyal yolağı diğer yolakların aksine enzimatik amplifikasyon basamağı içermez ve Notch reseptörleri direkt olarak kendisi nukleusa gider ve sinyal üretimini başlatır (63).

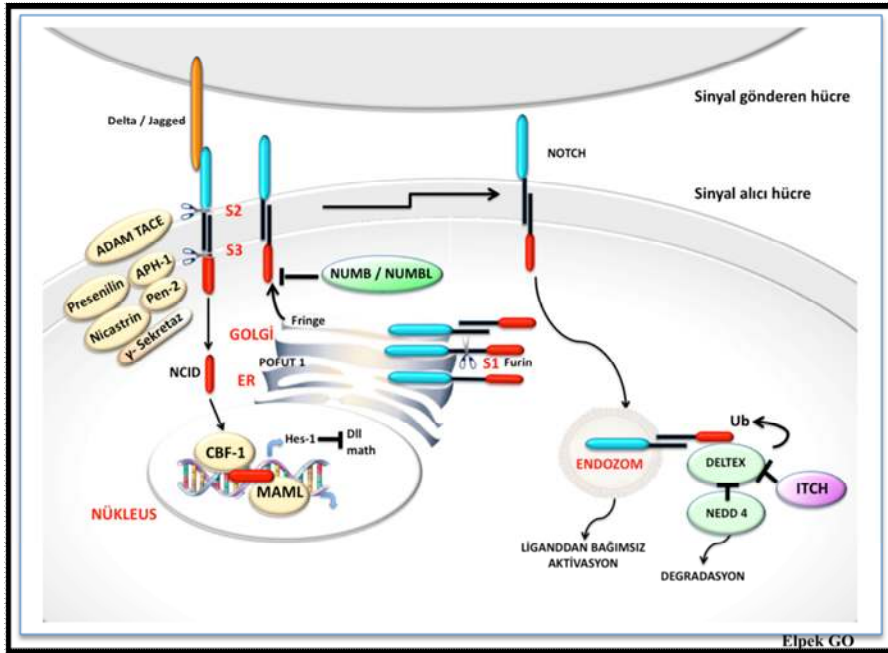
Notch sinyali komşu hücrelerin reseptör ligand bağlantısının gerçekleşmesi ile aktive olur. Bu aktivasyon Şekil 2.3’de gösterilmiştir. Reseptör ligand bağlantısı sonucunda reseptörün heterodimerik yapısı bozulur ve ikinci ayrılma (S2) gerçekleşir.



Şekil 2.2. Notch reseptör ve ligandları.

İkinci ayrılma insanlarda ADAM proteaz ailesinin bir üyesi olan TNF- α konverting enzim (TACE) tarafından gerçekleşir (60,62). İkinci ayrılma sonucunda reseptörün transmembran subuniti membran kısmından ayrılır. Bu ayrılma transmembran kısmında gerçekleşecek olan üçüncü ayrılmayı (S3) indükler. Üçüncü ayrılma presenilin, nicastrin, Aph1 ve Pen2 protein kompleksinin katalizasyonu sonucunda γ sekretaz kompleksi ile gerçekleşir ve reseptörün fonksiyonel olan sitoplazmik kısmı serbestleşir “Notch intraselüler kısmı (NICD)”. NCID nukleusa transloke olur ve insanlarda bir transkripsiyon faktörü olan (CSL) CBF1’e bağlanır (60,66,67). Notch sinyali yokluğunda

bu moleköl korepresör kompleksi ile hedef genlere bağlanır ve histon deasetilaz ile transkripsiyon inhibe edilir (61). γ sekratez aktivitesinin inhibisyonu sonucunda Notch sinyal yolağı inhibe olur ve Notch hedef genleri üretilemez (9,67,68). Histon asetilaz benzeri, CBP/p300, pCAF, GCN5 ve Mastemind like protein (MAML) NICD'ye bağlanıp koaktivatör görevi yaparlar ve transkripsiyonu indüklerler. Sinyal oluştuktan sonra NICD, Sel-10 ve E3 ubiquitin ligaz aracılığı ile hızlı bir şekilde ubiquitinasyona uğrayıp parçalanır (61,69). Hızlı proteozomal etki ile de NICD parçalanabildiğinden Notch sinyali çok kısa sürelidir. Bu yüzden çalışmalarda NICD'nin saptanması çok zordur. Bunun yerine hedef genlerden biri olan hes-1 (hairy enhance of split-1) ölçümü yapılmaktadır (56,69,70,71). Notch'un diğer hedef genleri, nuclear factor-kappa B (NF- κ B), siklin D1, siklooksijenaz2 (COX-2), vasküler endotelial growth faktör (VEGF), matriks metalaproteinaz-9 (MMP-9), ekstraselüler regulated kinaz (ERK), AKT, P21, P27, P53 ve c-myc'i içerir (55,72,73,74). Notch1'in p53 ilişkili apoptoziste fosfatidilinozitol 3 kinazı (PI3K) aktive ettiğı gösterilmiştir. ERBB2 ve NF- κ B; CSL bağlayan bölgeyi aktive ederek Notch1'i indükler (75,76). ERBB2 proliferasyonu indüklerken NF- κ B lenfoid organların gelişiminde birçok geni indüklemektedir (61,77).



Şekil 2.3. Notch reseptörünün fonksiyon ve regülasyonu.

2.16.2. Notch sinyalinin regülasyonu

Notch reseptörleri EGFB tekrarlarına fukoz, serin ve threonin rezidülerinin O-fukozil transferaz enzimi ile eklenmesi sonucunda glikolize olurlar. Glikolizasyon Notch aktivitesinin regülasyonunda gereklidir (69,78). Dolayısıyla glikozilasyon, Notch reseptörlerinin fonksiyon kaybında veya Notch aktivitesini inhibe eden enzimlerin overekspresyonunda önemlidir. Fringe; EGFB O-bağımlı fukoz modifikasyonunu yapan bir diğer enzimdir bu özellikle ligand bağlanmasında gereklidir (60,67,78).

Notch regülasyonunu düzenleyen bir diğer mekanizma reseptörlerin internalizasyonudur ve endositozis ile gerçekleşir daha sonrasında ubiquitinasyon ile de degradasyon gerçekleşir. Ligand endositik vezikülde posttranslasyonel modifikasyona uğramaktadır (79). Ligand endositozisi ile aktive reseptörler endozomların içine alınır. Endozomal olaylar Notch reseptörlerinin downregülasyonu ve ligand aktivitesinin önlenmesi için önemlidir (80). Notch sinyaline endositoz etkisi ile ilişkili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda hem sinyal gönderen, hem de sinyal alan hücrede endositozisin sinyal yolağını regüle ettiği bulunmuştur (67,81).

Bu basamağa etki eden moleküllerden biri de Numb'dır. Bu molekül ligand endositozisinde görevlidir ancak mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Numb'ın yavru hücre oluşumunda ve hücre kaderinin belirlenmesinde Notch sinyal inhibisyonu yaptığı bilinmektedir (77,82).

Yine Ubiquitin aracılı degradasyonun Notch sinyal yolağını kontrol ettiğine dair birçok kanıt vardır. Ubiquitinasyon endoplazmik retikulumda gerçekleşir ve hücre siklusunun progresyonu, selüler diferansiasyon, protein transportu, DNA onarımı gibi birçok selüler olayda rol almaktadır. Protein ubiquitinasyonu çok basamaklı bir olaydır. İlk olarak serbest ubiquitin, ubiquitin aktive eden enzime (E1) bağlanır, daha sonra ubiquitin konjuge eden enzime (E2) transfer olur, son olarak da spesifik protein substratı içeren ubiquitin ligaza (E3) transfer olur. E3 ligaz selektif substrat bağlayan spesifik bir fonksiyon gösterir. Ubiquitin sıklıkla hedef genlerin proteozomlar aracılığı ile degradasyonunu sağlarken, ayrıca reseptörlerin internalizasyonu, multiveziküler cisimciklerle de ilgilidir. Notch reseptörünü regüle eden birkaç farklı E3 ubiquitin ligaz tanımlanmıştır (83).

Notch sinyal regülasyonunda bir diğer önemli nokta da γ -sekrataz fonksiyonu inhibe edilirse, Notch reseptör ayrılması ve sinyal iletimi bloke olur. NICD ayrılması gerçekleşmediği zaman Notch hedef genlerin transkripsiyonu inhibe olur (72).

Notch sinyal yolağı selüler olaylardaki birçok sinyal yolağı ile bağlantılıdır. Kültüre edilmiş insan hücre dizisinde Notch sinyali Ras'ın indüklediğı neoplastik fenotipte yer almaktadır (84). Wnt sinyali de Notch sinyali üzerinde inhibitör etki göstermektedir (77). Helix-loop-helix proteinlerinden olan hes ve hey genleri Notch sinyalini azaltan en iyi hedef genlerdir (85).

2.16.3. Notch sinyalinin fonksiyonu

Notch sinyali, Wnt, Hedgehog, Transforming Growth Faktör- β (TGF- β) ve Reseptör tirozin kinaz/fosfataz gibi birçok yolak ile ilişkilidir. Notch sinyalinin, kök hücrenin korunmasında, hücre kaderinin belirlenmesinde, diferansiasyonunda, proliferasyonunda önemli rolleri vardır (9,61,78).

Notch intestinal morfogenezde ve doku homeostazisin korunmasında görevlidir ve etkisi barsaklarda önemli bir role sahip olan Wnt'ye benzedir. Notch normal barsak gelişiminde önemlidir ve kriptlerde saptanabilir (51,86). Barsaklarda Notch hedef geni olan hes1 ekspresyonuna bağı olarak amplifiye hücrenin absorbtif epitel mi yoksa sekretuar hücre mi olacağı belirlenir. İntestinal sekretuar progenitör hücrelerde Notch ligand ekspresyonu fazla olursa komşu hücrelerde sinyal aktive olarak sekretuar hücre oluşumu inhibe olur. Memelilerde lateral inhibisyon henüz net olarak gösterilememiş olsa da morfolojik ve matematiksel modeller sonucunda kriptlerde görülen erken progenitör hücrelerin absorbtif ve sekretuar hücre dizisi olarak ayrıldığı ortaya çıkmaktadır (87,88). Notch sinyal aktivasyonu sonucunda Hes-1'in seviyesi artar ve ATOH/HATH/MATH1 down regülasyonu gerçekleşir. Atoh goblet hücre diferansiasyonunu sağlayan bir markerdir. Yine hes-1, intestinal terminal diferansiye epitel hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen zing finger içeren bir transkripsiyon faktörü olan KLF4'ü süprese eder (51,88). Notch sinyali inhibe edildiğı zaman ise kript hücrelerinin proliferasyonunda durma ve goblet hücrelerine dönüşüm saptanmıştır.

Diğer bir yandan Notch ve Wnt hücrelerin gelişimi ve spesifikasyonu esnasında bHLH transkripsiyon faktör ile koordine bir şekilde çalışır. Örneğin math1 bHLH'nin aktivatörüdür ve kolonik goblet, enteroendokrin ve paneth hücre diferansiasyonuna katkıda bulunur. Notch yolağında ki transkripsiyon faktör RBPJK/CBF-1 delesyonu veya gama sekretaz inhibisyonu sonucunda math1 ekspresyonu artar ve prematur kript hücreleri goblet hücrelerine dönüşür (88).

Kısacası Notch ve Wnt sinyal yolağı hem intestinal sistemin normal gelişiminde hem de tümörögenezisinde görev almaktadır. Erken dönem intestinal kanser prekürsörlerinde Wnt sinyali normal saptanırken Notch sinyalinin arttığı görülmüştür (89,90).

Son çalışmalarda Notch sinyalinin kanser progresyonunda, transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonunda, hücre yaşamında, hücre motilitesinde ve tümör anjiogenezisinde de rolleri olduğu bulunmuştur. Notch transkripsiyon faktörlerinin regülasyonu ile kök hücre fonksiyonlarının kontrol edilebileceği böylece kanser kök hücrelerinden gelişen tümörün başlatılmasını, büyümesini ve yayılımının kontrol altına alınabileceği düşünülmektedir (9).

2.16.4. Notch sinyali ve anjiogenezis

Anjiogenezis daha önceden var olan bir damardan yeni damar gelişimidir. Notch sinyali fizyolojik ve tümöral anjiogeneziste rol almaktadır. Notch ligand ve reseptörleri erken embriyogenezis döneminde kritik arterial diferansiasyonda saptanmıştır ve Notch sinyalinin ekspresyonu arterlerde saptanırken venöz sistemde saptanmamıştır (70). Notch1, 2 ve 3 reseptörleri vasküler endotelial hücrelerde eksprese edilir ve uygun formasyonda damar gelişimine katkıda bulunmaktadırlar. Notch sinyali tümör anjiogenezisinde de diğer yollar ile birlikte görevlidir (91). Yeni damar oluşumunda hipoksi ve sonrasında salınan VEGF bilinen en iyi stimulatördür. Hipoksi sonucunda mevcut vasküler yapı ekstraselüler degradasyona uğrayıp tomurcuklanma, proliferasyon, migrasyon ve tüp aşamalarından geçerek yeni damar oluşumu gerçekleşir (70,92,93). Notch 1 sinyali özellikle tip ve tüp fenotipindeki endotel hücrelerinde saptanmıştır. Endotel hücreleri tip formasyonundan tüp formasyonuna VEGF salınımı ile geçerler. Endotel hücreleri VEGF stimülasyonu sonrasında yüksek oranda Dll4 ve düşük oranda Notch eksprese ederler (93). Notch1 ve Notch4 reseptörleri arterial endotelden salınır. Notch sinyali kaybında arteriyel bir marker olan ephrin B2 salınımı azalır (92).

Günümüzde çoğu kanser hastaları metastaz nedeniyle ölmektedir. Aes (Grg5) endojen olarak metastazları suprese etmektedir. Aes ekspresyonu karaciğer metastazı olan kolon kanserli hastalarda azalmış olarak bulunmuştur (94). Bilindiği üzere tümör hücrelerinde de Notch sinyali anjiogenezi ve transendotelial migrasyonu arttırmaktadır. Masahiro Sonoshita ve arkadaşları Aes'in Notch sinyal yolağını inhibe

ederek metastazları önlediğini bulmuşlardır. Bunu Notch sinyalinde NICD ve Maml1'in transkripsiyonunu azaltarak yapmaktadır (94,95).

2.16.5. Notch yolağı ve kanser

Notch sinyal yolağı diğer birçok sinyal yolağı ile ilişkili olarak birçok proteinin ekspresyonuna neden olur ve diferansiasyon ve proliferasyonu da içine alan değişik selüler mekanizmalarda görev almaktadır. Notch aktivitesi selüler olaylarda hem tümör supresör, hem de onkogen olarak etki göstermektedir (96). Notch sinyali renal hücreli karsinom, baş boyun skuamöz hücreli karsinom, endometriyal karsinom gibi birçok kanser türünde ekspresyonu artar ve onkogen aktivasyon göstermektedir. Diğer bir onkojenik karakteri ise ebstein barr virusuna (EBV) benzemektedir. EBV nükleer antijen2 NICD'nine benzer şekilde CSL'ye bağlanır ve transkripsiyonu arttırır (97).

Hepatopankreatikobiliyer sistem ve gastrointestinal kanserlerde Notch'un rolü olduğu bilinmektedir (55).

2.16.5.1. Pankreas kanseri

Ekzokrin pankreas hücrelerinin gelişiminde Notch sinyali görev almaktadır. Erken gelişen pankreatik tümörögeneziste Notch sinyal yolağının aktive olduğu saptanmıştır. Bu kanserde RAS/MAPK yolağı, EGFR, Notch reseptör ve ligandlarının ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (59,98). Zhie Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada pankreas kanserinde Notch reseptör, ligand ve hedef genlerinin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (55).

2.16.5.2. Gastrik kanserler

Notch1 özellikle gastrik tümörlerde normal gastrik mukozaya oranla yüksek oranda eksprese edilmektedir. Notch1 seviyesi tümör boyutu, diferansiasyonu, grade'i, damar invazyonu ile korele bulunmuştur. Notch1 pozitif hastaların negatif hastalara göre yaşam süresi daha azdır (55).

2.16.5.3. Hepatoselüler karsinom (HCC)

HCC'da Notch sinyal yolağı kritik role sahiptir. Notch sinyali HCC de hücre tipine bağlı olarak hem onkogen hem de tümör supresör etki göstermektedir. İn vitro ve in vivo çalışmalarda Notch1 sinyali SMMC7721 dizili HCC hücrelerinin büyümesini inhibe etmektedir. Bunu hücre siklusunun G0/G1 evresini durdurarak yapar. Notch1 sinyali;

siklinA1, D1, E, CDK2 ve fosforile Rb ekspresyonunu azaltır, SMMC7721 hücrelerinde P53 ekspresyonunu arttırarak apopitozisi indükler. HCC de Notch1 ve jagged1 seviyeleri düşüktür (55).

2.16.6. Kolonik prekanseröz olaylarda Notch sinyali

Notch1, Notch2, jagged 1 ve jagged 2 normalde proliferatif kriptlerde saptanır ve villöz enterositlerde bulunmaz. Postmitotik goblet hücrelerinde ise Notch1 ve Notch 2'nin kaybolması dikkate değerdir. Yine Notch ile ilişkili moleküllerden hes1 ince barsakta proliferatif kript kompartmanında saptanmıştır (98). Sporadik kolorektal kanserler sıklıkla adenomatöz poliplerden ve inflamatuvar barsak hastalıkları gibi prekanseröz durumlardan kaynaklanmaktadır. Bu durumlarda da Notch, ligandları ve bunlar ile ilişkili moleküllerdeki değişikliklerin ortaya çıktığı bilinmektedir.

Crohn ve ülseratif kolit hastalarında Notch sinyalinin hedef geni olan hes1 overekspresyonu saptanmıştır. Benzer olarak ülseratif kolitte Notch'un goblet hücre diferansiasyonunu önleyerek epitelyal rejenerasyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir (54). Deneysel olarak oluşturulmuş ülseratif kolitte Notch1 ve NICD'nin normal barsağa göre daha fazla eksprese edildiği bulunmuştur (99).

Familiyal adenomatoz polipozis kolili hastalarda barsakta Jagged 1'in mRNA'sı sağlıklı kişilere göre yüksek orandadır (54).

Notch 1, jagged 1 ve jagged 2 kolon adenomlarında da eksprese edilmektedir (54,55). Adenom ve kript hücrelerinde Wnt ve Notch benzer şekilde eksprese olurlar (54,98,100). Apc mutant farelerin adenomlarında hes1 overekspresyonu izlenirken, γ -sekretaz inhibitörlerinin adenomlarda goblet hücre diferansiasyonu artırarak, adenom epitelinde proliferasyonu azalttığı gösterilmiştir (54,98,100).

Tüm bu bulgular Notch ligandları ve ilişkili moleküllerin karsinogenez ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

2.16.7. Kolorektal kanserlerde Notch sinyali

KRK yeni ilaçların gelişmesine rağmen kanser nedenli ölümlerin 4. sırasında yer almaktadır (100).

İnsanlarda KRK'de Notch-1 ve hes1 ekspresyonu saptanmıştır ve Notch 1 ekspresyonu tümörün diferansiasyonu ve patolojik grade'i ile de ilişkili bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda tümörün grade'i arttıkça Notch immunboyanma oranı ve şiddeti artmıştır (98,101).

Michael Reedijk ve arkadaşları kolorektal kanserlerde Hes1 mRNA seviyesini ve Notch aktivasyonunun hastalığın seyri ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Diğer bir çalışmada ise KKK hastalarında Notch ligandlarından jagged1 ekspresyonunu izlenmiştir (99). Bu ekspresyonun özellikle primer KKK hastalarında metastatik kolon KKK hastalarından daha yüksek olduğu not edilmiştir. Böylece Notch sinyal aktivasyonunun KKK gelişiminde etkili olacağını düşünmüşlerdir (99).

J. Gao ve arkadaşları kolon kanserli hastalarda ve normal mukozal epitelde Notch1 ve jagged1 seviyelerine bakmışlardır normal mukozada ekspresyon saptamazlarken kolon kanserli, hastalarda Notch 1 ve Jagged1 ekspresyonunu saptamışlardır (54).

2.16.8. Notch yolağı ile ilgili terapötik yaklaşımlar

Çoğu solid tümörde olduğu gibi KKK'de temel tedavi cerrahidir. Ama çoğu hasta cerrahi tedavi aşamasına gelinceye kadar asemptomatiktir ve tedavide kombine kemoterapötiklerin ve biyolojik ajanların kullanılması gerektirmektedir (102).

Kök hücreler kendini yenileme, pluripotans ve en önemlisi kemoterapötik ajanlara direnç geliştirme özelliğine sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda kanser tedavisinde KKH'ni hedeflenmesi amaçlanmıştır. Tümör oluşumunda temel olarak kök hücrelerinde bulunan ve Notch sinyal yolağını da içeren birçok yolağın rol oynadığı ve Notch'un genelde onkogen fonksiyonu göstererek, kök hücrelerinin kendini yenilemesini indükleyerek tümörögeneze yol açtığı bilinmektedir (88,98). Çoğu kanser türünde saptanmasına rağmen Notch sinyal aktivasyonu en iyi T hücreli akut lenfoblastik lösemi de açıklanmıştır. Birçok tümörde Notch reseptör ve ligandların aberan aktivasyonu olduğu da gösterildiğinden bu yolağa karşı geliştirilmiş ilaçların tedavide kullanılması düşünülmektedir (88,98,103).

Yolağın inhibisyonu ligand bağlanması, reseptör ayrılımları, NICD fonksiyonu gibi birçok aşamada olabilmektedir (12,72,104). Bu yolakda önemli rol oynayan γ -sekretaz; multisubunit içeren aspartil proteaz kompleksinden oluşur. Bunlar; presenilin, nicastrin ve Pen2 (presenilin enhancer-2)'dir. Özellikle Presenilin, γ -sekretaz aktivitesinde santral katalitik rol oynamaktadır. γ -sekrataz inhibitörleri (dibenzazepin) tümör hücrelerinin büyümesini de suprese ederler(69). γ -sekrataz inhibitörleri ile yapılan faz 1 klinik çalışmalarda Notch sinyalinin kanser tedavi modellerinde önemli bir rolü olduğunu destekleyen pek çok bulgu ortaya çıkmıştır. Bu yüzden Notch sinyalini

inhibe etmek için γ -sekretaz inhibitörlerinin kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (105). Bu çalışmaların sonucunda γ -sekretaz inhibitörlerinin kemoterapiye dirençli, özellikle metastatik KRK hastalarında mevcut tedaviye eklenebilecek yeni bir ajan olabileceği izlenmiştir (105).

Deneysel araştırmalarda Notch1 ekspresyonu adenom ve adenomatoz polipozis koli/multiple intestinal neoplazide de saptanmıştır (106). γ -sekretaz inhibitörleri ile Notch sinyal inhibisyonu sonucu APC tümör supresör gen mutasyonu taşıyan deneklerin adenomlarında goblet hücrelerine dönüşüm saptanmıştır. Kolon kanserlerinde γ sekretaz inhibitörlerinin antimikrotübül ajanlarının, mitotik arresti ve apoptozisi arttırdığı da izlenmiştir (54,85,99).

Evre 3 KRK ele alındığında ise bu grupta adjuvan kemoterapotiklerden 5-fluourasil, levamisole, leucovorin kombine tedavileri uygulanmaktadır. Adjuvan tedaviye rağmen bu hastaların yalnızca %10-20'si tedaviden yarar görmektedir (105). Bu nedenle Evre 3 KRK'de yeni terapötik ajanlara ihtiyaç vardır (85,105). KRK'de taksanları da içeren geleneksel terapötik ajanlara direnç geliştiği bildirilmiştir. γ sekretaz inhibitörleri kolon kanserinde taksanların indüklediği mitotik arrest ve apoptozisi arttırdığından Evre 3 KRK'de tedaviye γ sekretaz inhibitörlerinin eklenmesi gündemdedir (55). Yine Withaferin-A (WA) anti-kanser ve anti inflamatuvar amaçla kullanılan bir ilaçtır. WA Notch'un da ilişkili olduğu Akt/NF- κ B/m-TOR yolaklarına etki ederek kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Akt aktivasyonu KRK'li hastalarda progresyon ve metastazlarında etkilidir. WA ise Notch yolağını inhibe ederek Akt aktivasyonunu da önlemektedir (107). Bu nedenle WA'nın Notch sinyalini inhibe ederek KRK hastalarında tedavide kullanılabileceği düşünülmüştür. WA tedavisi alan hastalarda 3 hafta sonra Notch hedef genleri olan hes1 ve hey1 genlerinde azalma bu görüşü desteklemiştir (107). Diğer bir yandan her ne kadar WA kolon kanser hücre dizisinde inhibisyon oluştursa da, Notch sinyali üzerindeki etkisinin hangi noktada olduğu henüz tam olarak açıklanamamıştır (107).

Yapılan birçok çalışmanın sonucunda görülmüş ki Notch yolağı inhibisyonu birçok kanserin tedavisinde kullanılabilmektedir (72).

2.17. Numb

Numb ilk olarak 20 yıl önce drosophilada duyuşal organ prekürsöründe (SOP) hücre yüzey reseptörü olan Notch ile birlikte tanımlanmıştır (12,108,109). Drosophilda Numb (d Numb) asimetrik hücre bölünmesi esnasında Notch yolağını inhibe ederek hücre kaderinin belirlenmesinde görevlidir. Numb'ın insanlarda mNumb ve mNumb-like olmak üzere iki tane homoloğu bulunmaktadır (12).

Numb 65-72 kDa ağırlığında 4 alternatif transkript bölgesinden oluşan 4 çeşit proteinden oluşur. Numb amino-terminal ucunda fosfotirozin-bağlayan domain (PTB), C-terminal ucunda prolinden zengin domain (PRR) ve Eps15 homoloğu (EH) bölgesi (DPF ve NPF) içerir. PRR bölgesi 48 aminoasit içeren bir kısımdır. PTB VE PRR domainleri alternatif bağlanma kısımlarıdır (108,109,110).

Numb kök hücre kompartmanını belirleme ve sürdürmede, epitelyal hücre polaritesinin oluşturulmasında, hücreşel adhezyon migrasyonunda ve asimetrik hücre bölünmesinde görevlidir (12). Numb sinir sistemi gelişiminde de kritik öneme sahiptir. Numb keşfedildiğı ilk yıllarda nörogenezisdeki rolü üzerinde durulsa da daha sonraları tümörogeneziste de rolü olduğu ortaya çıkmıştır (12,108,111).

Numb; meme, akciğer, testis, tükrük bezi gibi birçok erişkin dokuda eksprese olmaktadır. Numb farelerin barsağında villus kript aksında saptanmıştır ve intestinal epitel hücrelerinde Notch yolağını inhibe ederek goblet hücrelerine dönüşümünde rol almaktadır (105). İntestinal epitel sürekli kendi kendini yenilemektedir. Bu süreçte kript tabanındaki kök hücreler rezerv görevi görmektedir. Kök hücreler asimetrik hücre bölünmesi ile bir kök hücreye bir de diferansiye olacak hücreye bölünür. Asimetrik bölünme esnasında Numb'ın asimetrik yerleşimi iki yavru hücredeki Notch aktivitesini regüle etmektedir (110). Numb intestinal hücrelerde müşin sekresyonunu artırır ve intestinal epitel bariyerinin bütünlüğünün korunmasına yardımcı olmaktadır (105,110).

İnsanlarda meme kanseri ve medulloblastomda Numb tümör supresör etkili bulunmuştur. Numb meme kanserinde Notch'u inhibe ederek tümör supresör etki göstermektedir. Meme tümörlerinde sıklıkla Numb kaybı mevcuttur (12,112).

Küçük hücreli dışı akciğer karsinomunda numb ekspresyonu sıklıkla kaybolur ve Notch yolağı aktive olur. Meme ve akciğer karsinomunda numb kaybı degradasyon sonucunda olmaktadır (12).

Numb fonksiyonunu regule eden majör kontrol noktası post transkripsiyonel aşamadır. Nöronal kök hücrelerde güçlü ekspresyonu olan RNA bağlayan protein

Musashi-1 Numb translasyonunu represe eder (12). Bir diğ er önemli kontrol noktası da ubiquitin bağımlı proteolitik degradasyon aşamasıdır. Proteolitik degradasyonda RING-tip E3 ligase LNX tarafından Numb izoformları (p72 ve p66) seçimi gerçekleşir. Numb ayrıca fosforilasyon gibi postsentetik modifikasyonada uğrar. Numb'ın; Notch, TP53 ve hedgehog yolakları ile de kesiştiğı bulunmuştur. Bu bulgular ışığında Numb h ucresel d uzenlemede önemli fonksiyonları olan bir moleküler marker olarak tanımlanmıştır (12,109).

Numb birçok farklı şekilde Notch yolağını inhibe etmektedir (110,113). Bunlardan biri de, memeli h ucrelerinde Numb E3-ubiquitin ligaz olan Itch'a bağılanarak Notch'un ubiquitinasyonunu sağılar. Bu  er evede Numb, Notch ve Itch arasında adaptör görevi görmektedir. Numb'ın overekspresyonunda Notch intraselüler domaininin ubiquitinizasyonu ve sonuç olarak da proteozomal degradasyonu artmış olur. Ancak Numb, Notch'un membrana bağılı formlarında aynı etkiyi göstermemektedir (109). Bir diğ er çalışmada da Numb yokluğunda Notch'un Itch bağımlı degradasyonundan sonra hücre yüzeyine geçişinin hızlandığı ortaya çıkmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda Numb endozomal olaylardan adezyon, migrasyon, reseptörlerin internalizasyonunu stimule ettiğı, endozomal vezik ldeki Notch reseptörünün lizozomal degradasyonunu arttırdığı bulunmuştur (109,114). Bir diğ er Notch yolağını inhibe etme mekanizması ise, Numb, Eps15'in DPF ve NPF domainleri ve α -adaptini etkileyerek endositik olayları etkilemektedir. Numb; endositozisi, membrana bağılı Notch sekestrasyonunu veya NICD'nini inhibe etmektedir (110).

Numb ubiquitin yolağının da önemli bir düzenleyicisidir. Ubiquitinasyon özellikle hedgehog sinyal yolağında önemli bir basamaktır. Hedgehog sinyalinin hücre proliferasyonu, farklılaşması, migrasyonu ve DNA onarımı gibi birçok önemli görevi vardır (12). Ayrıca doku onarımı/rejenerasyonu ve kök hücrelerin kendini yenilemesinde de katkıda bulunmaktadır. Örneğın, Hh sinyalleri nöral kök hücrelerin kendini yenilemesi (self-renewal) için gerekli olup deregülasyonu sıklıkla nöral kök hücrelerin tümörojenik progresyonu ile ilişkilidir. Hh yolağının harabiyeti çeşitli gelişimsel anormallikler ve farklı kanser türlerinden sorumlu tutulmuştur. Numb, nöroenez sırasında Hh sinyallerinin inhibisyonunda rol alır. Numb Itch ile etkileşir ve bu E3-ligaz'ı Gli1'e hedefler. Bu, Gli1 stabilitesini etkiler ve Hh sinyalini baskılar. Notch ve Hedgehog arasındaki çapraz iletişimin (cross-talk) hem normal gelişimsel süreçler hem de t m rojenizde rol oynadığı düşünüldüğünden, Numb'ın her iki sinyal yolağı ile de

olan ilişkisini ortaya koymaktadır. Yapılan son çalışmalarda Numb'ın tümör süpresör protein TP53'ün hücrel düzeylerinin regülasyonunda da fonksiyonunu gösterilmiştir. Numb E3-ligaz-Hdm2'ye bağlanarak TP53'ü inhibe etmektedir. E3-ligaz-Hdm2; TP53 ubiquitinizasyonu/degradasyonundan sorumludur (113,115).

Numb E3 ubiquitin ligaz enzimleri ile Notch, hedgehog ve P53 yolaklarını düzenler. Bu esnada ise Numb'ın kendisini de E3 ubiquitin ligaz olan Siah-1 düzenlemektedir. Siah-1 Numb'a bağlanıp onu ubiquitine eder ve Numb'ın degradasyonuna yol açar. Siah-1 overekspresyonunda ise sitoplazma ve nükleustaki Notch hücre yüzeyine taşınır ve Notch sinyal aktivasyonunu sağlar (12,109).

2.18. Siah-1

Notch sinyal yolağının düzenleyicilerden biri de ubiquitinasyon aracılığı ile oluşan degradasyondur. Ubiquitinasyon ATP bağımlı kompleks bir mekanizmadır; E1 ubiquitin aktivasyonu, E2 ubiquitin konjugasyon, E3 ubiquitin ligaz enzimlerini içerir. E3 ligazlar hem tümör süpresör hem de onkogen aktivasyonu gösterebilirler (116). E3 ligazlardan ring ailesi Siah olarak bilinir (117).

Siah-1 ilk olarak drosophilanın göz gelişimin esnasında saptanmıştır. Siah-1'in drosophiladaki homoloğu seven in absentia (Sina)'dır. İnsanlarda 2 çeşit Siah türü vardır. Siah1 ve Siah 2 proteinleri büyük farklılıklarını N-terminal kısmında içerir ama yüksek korunmuş ring domaini ve substrat bağlayan C- terminal domaini bulunmaktadır (117,118,119). C terminalinde ubiquitin bulunur ve burada ubiquitin proteozom yolağına bağlı degradasyon gelişir (120).

Siah-1 proteinleri poliubiquitinasyon yaparak hedef transkripsiyonel faktörlerin degradasyonuna neden olur (117,121). Siah proteinleri tümör süpresif ve apoptozisi arttıran etki göstermektedir (120).

Memelilerde Siah onkogen molekül sinyallerini stabil halde tutarak; β - katenin, prolyl-4-hidroksilaz, HIF1- α , tümör nekrozis faktör, Numb ve Notch gibi bir çok önemli yolak ve hücrel olaylarda rol almaktadırlar (122).

Hücre kaderini belirlemede Siah-1 doğrudan Numb yolağı ile ilişkilidir. Siah-1 Numb degradasyonuna yol açar ve bu da sitoplazma ve nükleustaki Notch'un endojen hücre yüzeyine dağılmasına neden olur. Böylelikle Notch ilişkili transkripsiyonel aktivite arttırılmış olur (12,109,121).

Siah-1 mRNA'sı plesanta, iskelet kası, testis gibi bazı hücre dizilerinde de saptanmıştır (116, 120). Fizyolojik şartlarda Siah-1 ince barsak villuslarında yüksek oranda eksprese edilmektedir. İntestinal epitelde kript tabanlarında villus uçlarına doğru migrasyonu sırasında saptanır (119,121). İnsanlarda Siah-1 aktivasyonu intestinal epitelde tümör supresör ve apoptoziste görevli olduğu bulunmuştur (118,120).

Siah 1'in hepatoselüler karsinomun (HCC) gelişimini ve progresyonunu suprese ettiği bulunmuştur (123). Ayrıca Siah-1'in hepatoselüler karsinomda apoptotik hücrelerde nükleer ve sitoplazmik ekspresyonları saptanmıştır (116,120). Siah-1 ekspresyonu gastrik kanserlerde de saptanmıştır (120).

2.19. Itch

Itch'da Siah gibi bir E3 ubiquitin ligazdır ve önemli ileti yollarında görev almaktadır. Notch yolağının regülörlerinden biridir (124). Itch ilk olarak farelerde saptanmıştır. Itch geni 854 aminoasit içeren 113kDa ağırlığında monomerik bir proteindir. Ca^{++} bağımlı fosforilasyon yapan C2 domaini, protein-protein bağlantısını yapan WW domaini ve C-terminal ucunda HECT domaini bulunur (124,125). Itch küçük parçalar halinde perinükleer alanda golgide ve erken ve geç lizozomların endozomal komponentinde de bulunmaktadır (125).

Itch deride inflamatuvar ve immun sistemi etkileyen olaylarda görev almaktadır. Itch'ın defektli olduğu çalışmalarda dalakta, lenf nodunda, timusun meduller kısmında sistemik otoimmun benzeri hastalık ve kronik pulmoner intertisyel inflamasyon gelişmiştir (125,126). Itch immun sistemin gelişiminde etkili bir proteindir. Bunun için Notch'u da içeren farklı birçok yolda görev almaktadır. İmmun sistemde T ve B hücre gelişiminde Notch yolağı da katkıda bulunur. Özellikle T hücrelerinin gelişiminde Th2 diferansiasyonunda görevlidir. Notch sinyal yolağının aktivasyonu sonucu NICD'ni ayrılır ve nükleusa gider burada reseptör aktivitesini takiben membrana bağlı Notch reseptör kısmında Itch bağlı poliubiquitinasyon ve degradasyon gerçekleşir (124,125,126).

Itch Numb proteininin aktivitesini de düzenler. Numb proteininin PTB domaini Notch'un C- terminal intraselüler kısmından bağlanır, Itch WW1/2 domainleri ile de Numb'a direkt olarak bağlanır ve membrana bağlı reseptörde Itch'ın katalize ettiği ubiquitilasyon başlar ve Numb, Notch sinyalini inhibe eder (124,125,127).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Etik Kurulu'nun 30.22.2012 tarih ve 18 sayılı onayı ile yapılmıştır.

3.1. Çalışma Grubunun Tanımlanması

Çalışma için 2005-2009 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan tanı alan 50 adet adenokarsinom, 30 adet adenom ve 20 adet normal kolon mukoza örneklerinden oluşan toplam 100 adet olgu incelenmiştir. Retrospektif olarak H&E boyalı preperatlarda normal mukoza örnekleri, adenokarsinom ve adenom tanısı almış olgular incelemeye alındı. Hasta dosyalarından yaş, cinsiyet, lezyonun lokalizasyonu, yaşam takipleri tesbit edildi. H&E boyalı preperatlar tekrar incelenerek adenokarsinom olgularında tiplendirme, derecelendirme, TNM evreleme, lenfovasküler invazyon, invazyon derinliği, reaktif lenf düğümü sayısı, bölgesel lenf nodu metastazı ile metastatik lenf nodülü sayısı gibi parametreler tekrar değerlendirildi. Her kolorektal karsinom olgusu için tümörü en iyi temsil eden ve grade'i en yüksek alan seçilerek tümör hücreleri değerlendirildi. Adenomlar tübüler, villöz, tübülovillöz olarak sınıflandırıldı. Notch, Numb, Itch ve Siah-1 immunohistokimyasal olarak boyama ve real time PCR yöntemi ile araştırıldı.

3.2. Histomorfolojik Değerlendirme

Olgulara ait tüm hematoxilen ve eozin (H&E) boyalı kesitler incelenerek, tümörün histolojik derecelemesi glandüler yapı temel alınarak; tümörün %95'inden fazlası glandüler yapı içeriyorsa iyi diferansiye (derece 1), %50-95 oranında glandüler yapılar içeriyorsa orta derecede diferansiye (derece 2), %5-50 oranında glandüler yapılar içeriyorsa az diferansiye (derece 3) olarak gruplandırıldı. İyi diferansiye ve orta derecede diferansiye adenokarsinomlar düşük dereceli; az diferansiye ve musinöz adenokarsinomlar yüksek dereceli olmak üzere iki gruba ayrıldı. TNM klasifikasyonuna göre, primer tümörün evresi tekrar değerlendirildi.

3.3. İmmunhistokimyasal Boyama

Olgulara ait seçili parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler alınarak tam otomatik Ventana immünohistokimya cihazında immün boyamalar yapıldı. Kullanılan antikorlar ve özellikleri:

- a) Notch-1: ThermoFisher Scientific, Dilüsyon:1/25
- b) Numb: ThermoFisher Scientific, Dilüsyon:1/25
- c) ITCH/AIP4: ThermoFisher Scientific, Dilüsyon:1/100
- d) SIAH-1: ThermoFisher Scientific, Dilüsyon:1/100

3.4. İmmunreaktivitenin Değerlendirmesi

Notch, Numb, Itch ve Siah antikorları ile hazırlanan kesitler ışık mikroskopunda değerlendirildi. İmmunohistokimyasal olarak boyanmanın var olup olmadığına bakıldı. Pozitif boyanan hücrelerin oranına göre; 0 (negatif), 1 (%1- 33), 2 (%34-66), 3 (%67-100) olmak üzere 4 kategoriye alındı.

3.5. RNA İzolasyonu

1. Çalışma kapsamında yer alan 50 adet tümör, 30 adet adenom ve 20 adet normal doku örneklerine ait parafin bloklardan 5-20 µm kalınlığında kesitler alındı.
2. Üzerlerine 1000 µl Ksilol eklendi. Vortekslendi.
3. 56°C'ye ayarlı ısıtıcı blokta 3 dakika bekletildi.
4. Süre sonunda 14000 rpm ayarlı santrifüjde 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
5. Pelet üzerine tekrar 1000 µl Ksilol eklendi. Vortekslendi.
6. 14000 rpm ayarlı santrifüjde 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
7. Pelet üzerine 1000 µl, %99.9 saflıkta Etanol eklendi. Vortekslendi.
8. 14000 rpm ayarlı santrifüjde 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
9. Santrifüj tüplerinin kapakları açık halde 10 dakika oda ısında bekletilerek alkolün uçması sağlandı.
10. RNA izolasyonu için Parafine gömülü dokudan RNA izolasyon kiti kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılan örneklerin üzerine, kit içindeki Buffer PKD solüsyonundan 240 µl eklendi. Vortekslendi.
11. 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.

12. Üzerilerine 10 µl Proteinaz K eklendi.
13. Dokuların lizisi için, 56°C'ye ayarlı ısıtıcı blokta gece boyu inkübasyona bırakıldı.
14. Ertesi gün: Örnekler 80°C'ye ayarlı ısıtıcı blokta 15 dakika bekletildi.
15. Süre sonunda örnekler buz üzerinde 3 dakika bekletildi. Süre sonunda 13500 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
16. Süpernatant kısım temiz bir ependorf tüpe alındı.
17. Süpernatant üzerine 25 µl DNase Booster Buffer ve 10 µl DNase I stok solüsyondan eklendi. Tüp alt-üst yapılarak karıştırma yapıldı.
18. Oda ısısında 15 dakika bekletildi.
19. Süre sonunda, 500 µl Buffer RBC eklendi. Pipetaj yapılarak karışması sağlandı.
20. Üzerine 1200 µl %100 saflıkta Etanol eklendi.
21. Örnekler, kit içinden çıkan RNeasy MinElute spin kolonlarına aktarıldı.
22. >10000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.
23. RNeasy MinElute spin kolonlarına, 500 µl Buffer RPE eklendi. >10000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.
24. RNeasy MinElute spin kolonlarına, İkinci kez tekrar 500 µl Buffer RPE eklendi. >10000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
25. RNeasy MinElute spin kolonları, temiz toplama tüplerine yerleştirildi. Kolonların kapakları açık olarak 13500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
26. RNeasy MinElute spin kolonları, temiz 1.5 ml'lik ependorf tüpe yerleştirildi. 30 µl RNase içermeyen su eklendi. 13500 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak kolondan RNA elüsyonu yapıldı.

RNA'ların spektrofotometrik ölçümünde Nanodrop kullanarak RNA miktarları belirlendi. Gerçek zamanlı PCR çalışması için RNA örnekleri 50 ng olacak şekilde ayarlandı.

3.6. c-DNA Reaksiyonu

- a. Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR kit (Thermo Scientific) kullanılarak c-DNA sentezi yapıldı.
- b. Kit içeriği:
 - Maxima Enzim Miks
 - 5XReaksiyon Miks
 - Nükleaz içermeyen su

- c. Her bir vaka için PCR tüpü hazırlandı. Aşağıda belirtilen miktarlarda PCR miski hazırlandı:

5XReaksiyon Miks	4 µl.
Maxima Enzim Miks	2 µl.
Kalıp RNA	1 pg-5 µg.
Nükleaz içermeyen su	20 µl'ye tamamlanacak şekilde ilave edilir.

- d. PCR cihazında aşağıdaki program kullanılarak c-DNA sentezi gerçekleştirildi.

25 °C	10 dakika
50 °C	30 dakika
85 °C	5 dakika

- e. C-DNA'lar, uzun süreli -70°C'de, kısa süreli ise -20°C'de saklanabilecek şekilde hazırlandı.

3.7. RT-qPCR

- a. NOTCH-1, ITCH, NUMB ve SIAH1 genlerinin ekspresyonlarını belirlemek için Solaris Human qPCR gene expression Assay kitleri kullanılmıştır. İnternal kontrol olarak GAPDH kullanılmıştır.

- b. Kit içeriği:

Solaris qPCR Master Miks
Solaris Primer/Probe Set
PCR grade su

- c. Her bir gen için toplam miktar 25 µl olacak şekilde aşağıda belirtilen miktarlar kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif PCR çalışması yapıldı.

Solaris qPCR Master Miks	12.5 µl.
Solaris Primer/Probe Set	1.25 µl.
PCR grade su	8.75 µl.
cDNA Kalıp (1-250 ng)	2.5 µl.

- d. Aşağıdaki PCR programı kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif PCR çalışması gerçekleştirildi.

	Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
Enzim Aktivasyonu	95 °C	15 dakika	1 siklus
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	40 siklus
Bağlanma/Uzama	60 °C	60 saniye	

- e. Gen ekspresyonundaki değişiklikler, Cq metodu kullanılarak hesaplandı.

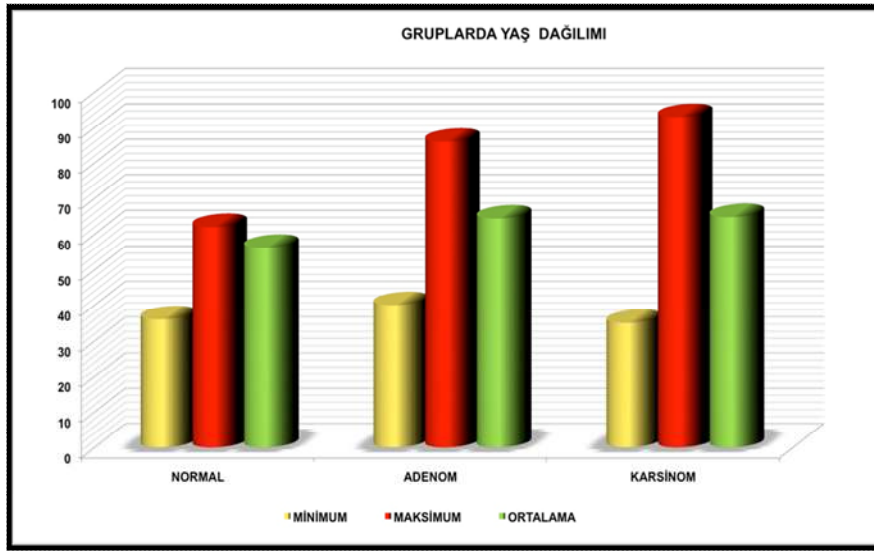
3.8. İstatistiksel Değerlendirmeler

Öncelikle RT-PCR değerlendirilmesinde protein değişikliği olmayan olgular 0, azalış izlenen olgular 1 ve artış izlenen olgular 2 olarak üç gruba ayrıldı. Gruplar arası ekspresyon farklılıkları ile adenokarsinomlarda klinikopatolojik parametreler ile Notch, Numb, Itch ve Siah-1 ilişkilerin belirlenmesinde için Ki-kare testi uygulandı. Ek olarak adenokarsinomlarda bu istatistiksel analiz için öncelikle olgularda yaş ortalaması, adenokarsinomlarda ise reaktif lenf düğümü ve metastatik lenf nodülü sayısı ortalamaları alınarak bu değerlerin sınır kabul edilmesi ile olgular dikotomize edilerek iki gruba ayrıldı. Yine olgu sayısının az olması nedeniyle adenom tipleri ve displazi istatistiksel değerlendirmeye alınmadı. Beş yıllık hastalıksız yaşam süresi temel alınarak olgularda değişkenlerin yaşam süresi ile ilişkisi Kaplan-Meier analizi ile incelendi. Yaşam süresi ile ilişkili olan parametreler Cox-regresyon analizi ile karşılaştırılarak bağımsız prognostik faktörler araştırıldı. Notch, Numb, Itch ve Siah-1'in RT-PCR verileri kullanılarak aralarındaki korelasyonlar Spearman korelasyon testi ile değerlendirildi. Tüm istatistiksel analizlerde p değerinin 0.05 altında olması anlamlı olarak kabul edildi.

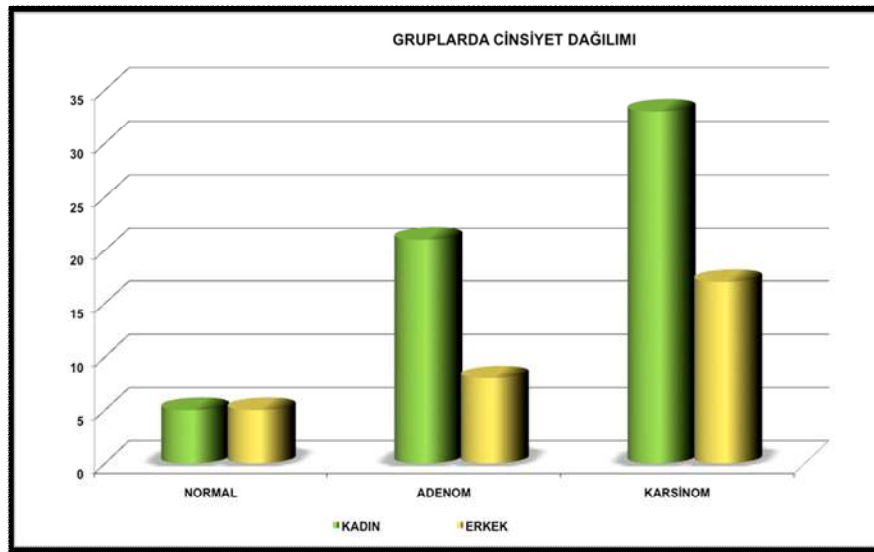
4. BULGULAR

Çalışmaya adenokarsinom tanısı almış 50 adet olgu, adenom tanısı almış 30 adet olgu ve 20 adet normal kolon mukozası bulunan olgu dahil edildi. Adenokarsinom olgularının yaşları 40 ile 86 arasında; adenom olgularının ise 35 ile 93 arasında dağılım göstermektedir. Adenokarsinom olgularında ortalama yaş 64,3 iken, adenom olgularında 64,7 olarak saptanmıştır (Şekil 4.1).

Olguların cinsiyetlere göre dağılımında 50 adet kolon adenokarsinomlu olgunun 17/50'si (%34.0) kadın, 33/50'si (%66.0) erkek iken, 30 adet adenom olgusunun 9/30'u (%30) kadın, 21/30'u (%70) erkek olarak izlendi (Şekil 4.2).

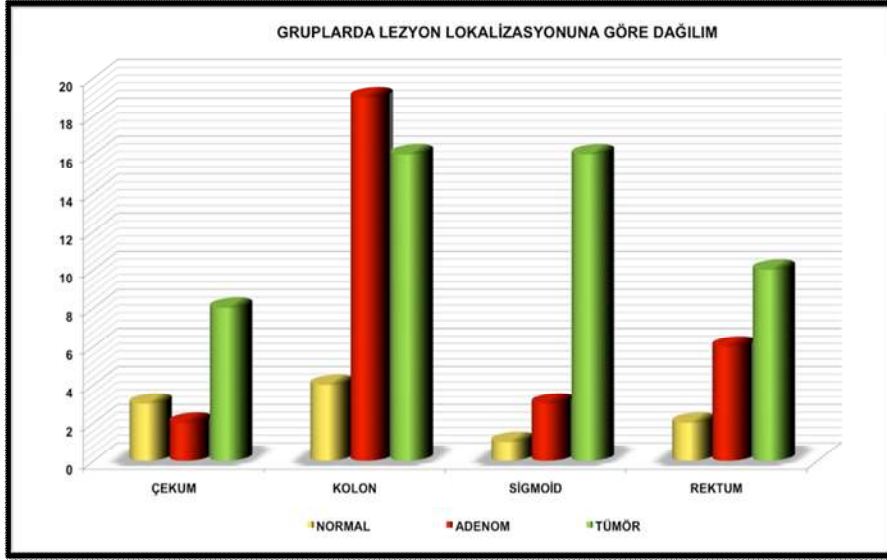


Şekil 4.1. Çalışma gruplarında yaş dağılımı.



Şekil 4.2. Çalışma gruplarında cinsiyet dağılımı.

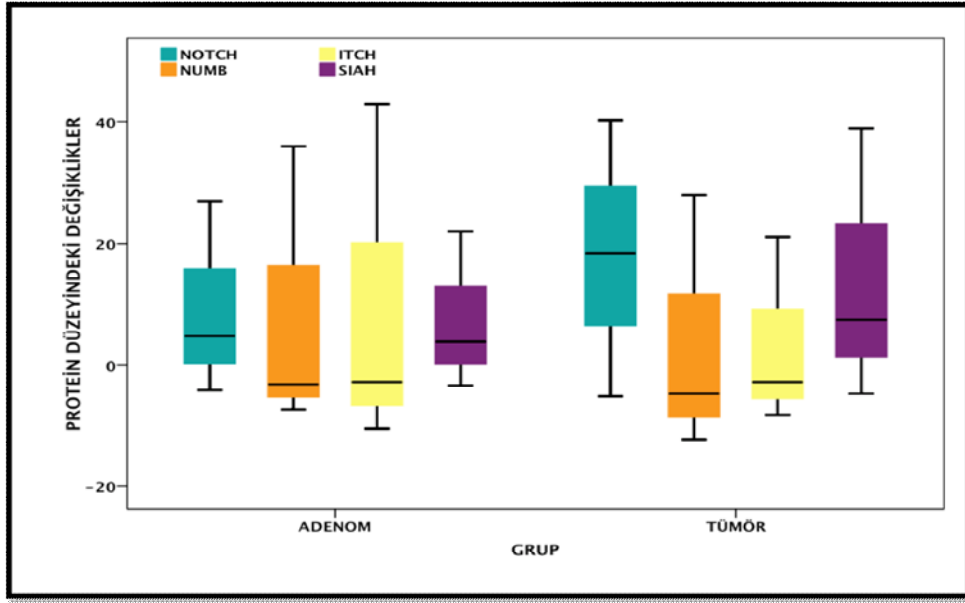
Adenokarsinom olgularının kolondaki yerleşim yerlerine göre dağılımları; tümörlerin 8/50'si (%16.0) çekum; 16/50'si (%32.0) kolon, 16/50'si (%32.0) sigmoid, 10/50'si (%20.0) rektumda izlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Adenokarsinom olgularının lezyon lokalizasyonuna göre dağılımı.

Adenom tanısı alan olguların 20/30'u (%66.6) tübülovillöz adenom, 10/30'u (%33.3) tübüler adenom olarak izlenmiştir. Histomorfolojik olarak displazi dereceleri değerlendirildiğinde; 20/30'u (%66.6) düşük dereceli, 10/30'si (%33.3) yüksek dereceli displazi olarak görüldü.

Olgulara ait klinikopatolojik özellikler sonuç çizelgelerinde ayrıntılı olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda Notch pozitifliği her üç grupta da sitoplazmik ve granüler nitelikte izlendi. (Şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8). PCR ile Notch ekspresyon düzeyinde kontrol olgularında değişiklik izlenmezken, adenomlarda olguların yarısında azalma, yarısında ise artış izlendi. Karsinomlarda ise sırasıyla olguların %44'ünde artış, %32'sinde azalma izlenirken %24'ünde değişiklik izlenmedi. Notch immünohistokimyasal ekspresyonu ise sırasıyla normal grupta olguların %5'inde, adenomlarda %60'ında ve karsinomlarda ise %64'ünde pozitif olarak izlenmiş olup, her iki metod ile gruplar arasındaki ekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$) (Şekil 4.4. ve Çizelge 4.1). Gruplar arasında Notch boyanma şiddeti arasındaki farklar ise anlamlı değildi ($p > 0,05$) (Çizelge 4.1). Lokalizasyon sadece sitoplazmik olduğu için istatistiksel analiz yapılamadı.

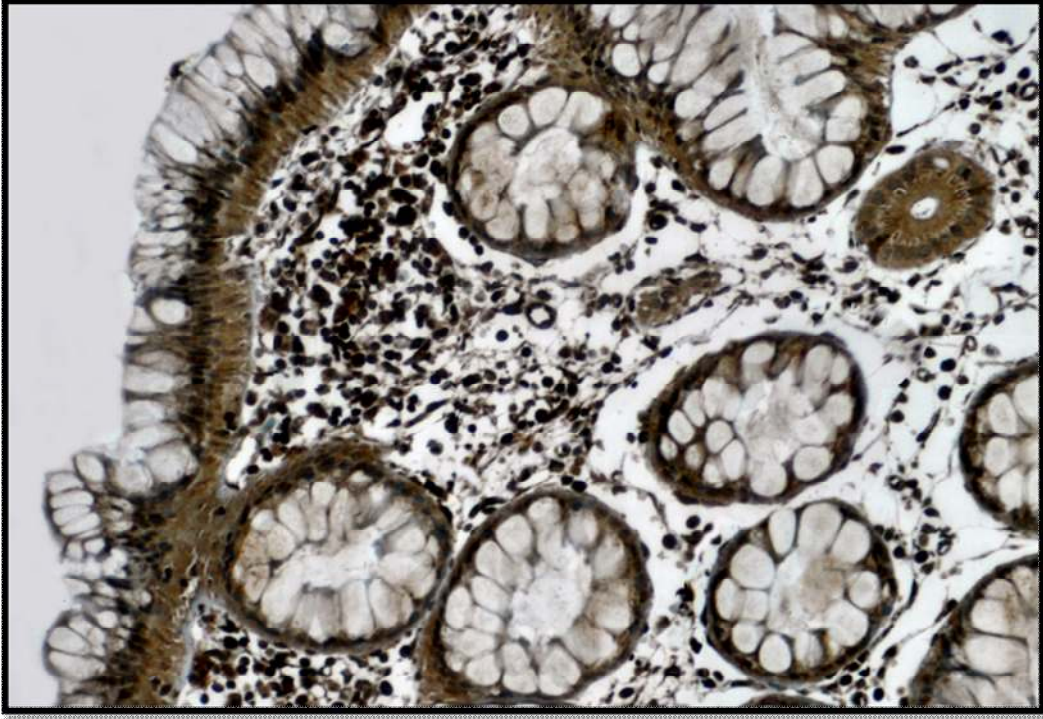


Şekil 4.4. Adenom ve karsinom gruplarında Notch, Numb, Itch ve Siah'ın ekspresyon düzeyleri.

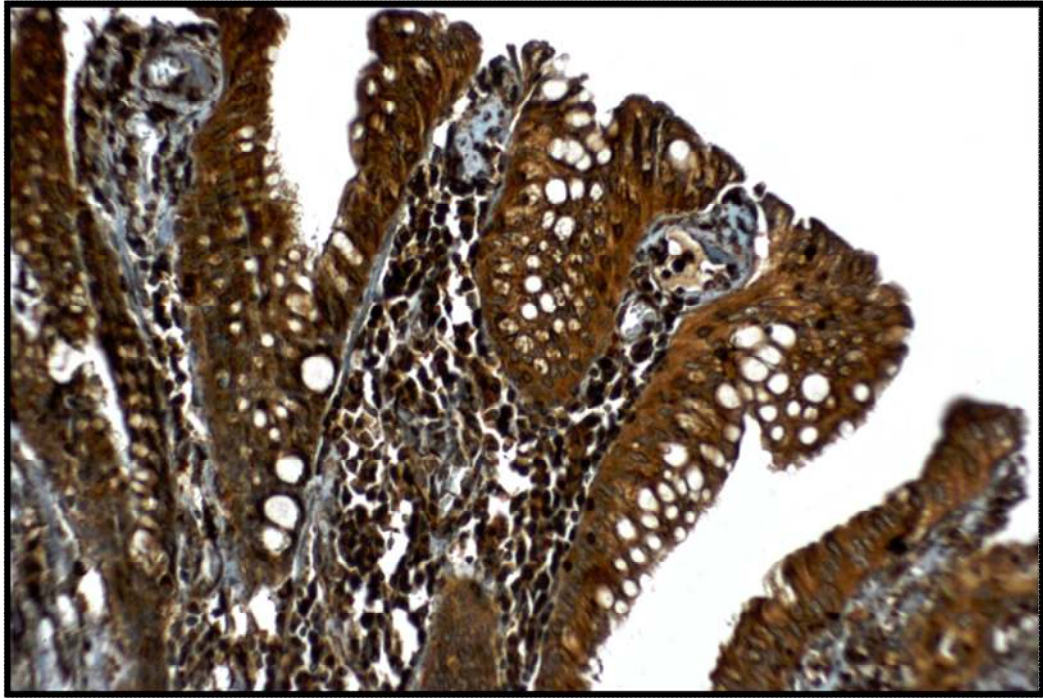
Çizelge 4.1. Normal mukoza, adenom ve karsinom olgularında Notch'un immunohistokimyasal ve PCR ile ekspresyonlarının gösterilmesi.

NOTCH	NORMAL	ADENOM	KARSİNOM	P değeri
PCR				
0	20 (100)	0	12 (24)	0.0001
1	0	15 (50)	16 (32)	
2	0	15 (50)	22 (44)	
Boyanma				
0	15 (75)	12 (40)	18 (36)	0.02
1	5 (25)	18 (60)	32 (64)	
Boyanma Şiddeti				
0		12 (40)	18 (36)	0.092
1		5 (16.7)	10 (20)	
2		7 (23.3)	12 (24)	
3		6 (20)	10 (20)	
Boyanma Dağılımı				
Sitoplazmik	5 (100)	18 (100)	32 (100)	

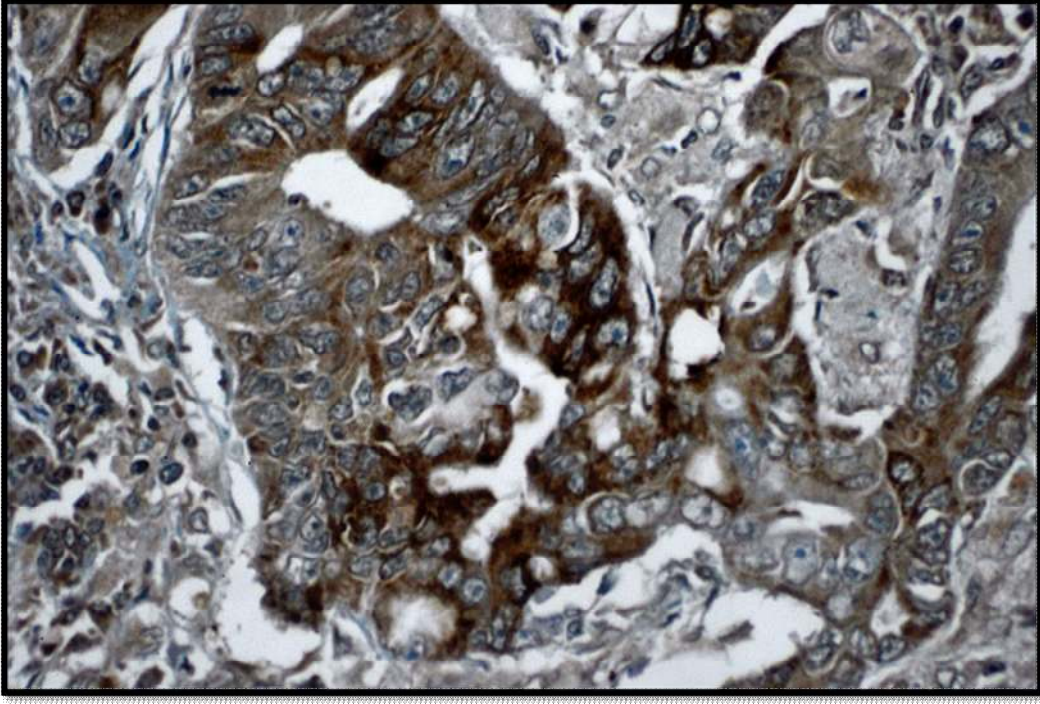
(PCR 0: değişmemiş, 1: azalmış, 2: artmış)



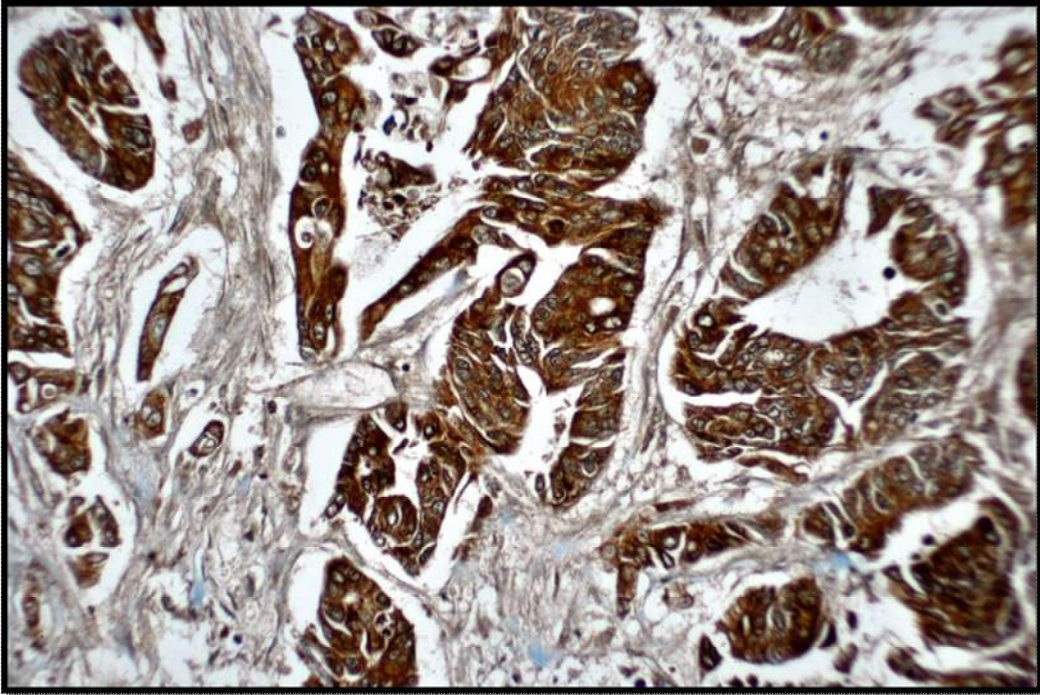
Şekil 4.5. Normal kolon mukozasına Notch ekspresyonu. (x200)



Şekil 4.6. Adenom yüzeyinde Notch ekspresyonu. (x200)



Şekil 4.7. Karsinomda Notch ekspresyonu (x400)



Şekil 4.8. Karsinomda Notch ekspresyonu (x200)

Karsinom grubunda ise klinikopatolojik parametreler ile Notch'un hem PCR hem de immünohistokimyasal ekspresyonu karşılaştırıldığında, diferansiasyon, lenf düğümü metastazının varlığı, evre ve 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ile ilişkili olduğu görüldü ($p<0.05$) (Çizelge 4.2). Boyanma şiddeti ile herhangi bir ilişki saptanmadı (Çizelge 4.3).

İmmünohistokimyasal Numb pozitifliği her üç grupta da sitoplazmik ve granüler nitelikte izlendi (Şekil 4.9, 4.10, 4.11). PCR ile Numb ekspresyon düzeyinde kontrol olgularında değişiklik izlenmezken, adenomların %60'ında; karsinomların ise %56'sında azalma izlendi ($p<0.05$). İmmünohistokimyasal olarak normal kolonda olguların %70'inde pozitif boyanma izlenirken, adenomlarda ve karsinomlarda ise bu oranın sırasıyla %30 ve %60 olduğu dikkati çekti ($p<0.05$) (Çizelge 4.4). Gruplar arasında Numb boyanma şiddeti arasındaki farklar ise anlamlı değildi ($p>0,05$) (Çizelge 4.4). Boyanma lokalizasyonu sadece sitoplazmik olduğu için istatistiksel analiz yapılamadı.

Karsinom grubunda Numb'ın hem moleküler hem de immünohistokimyasal olarak ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, lokalizasyon, invazyon, metastatik lenf düğümünün sayısı, lenfatik, vasküler, perinöral invazyon, reaktif lenf düğümü sayısı ve uzak metastaz arasında ilişki izlenmedi ($p<0.05$). Diferansiasyon, lenf düğümü metastazı, evre ve 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ile Numb ekspresyonu arasında hem moleküler hem de immünohistokimyasal olarak istatistiksel anlamlı korelasyon saptandı ($p<0.05$) (Çizelge 4.5). Numb boyanma şiddeti ile belirli bir fark saptanmadı (Çizelge 4.5).

İmmünohistokimyasal olarak pozitif olgularda Itch sitoplazmada noktasal ve/veya granüler tarzda boyanma göstermekteydi (Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16). Itch protein ekspresyonu immünohistokimyasal ve PCR ile değerlendirildiğinde adenom ve karsinom vakalarında normal mukozaya göre azalmış olarak saptandı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (Çizelge 4.7). Boyanma şiddeti ve boyanma lokalizasyonu ile gruplar arasında fark izlenmedi.

Karsinom olgularında PCR ile yapılan çalışmada diferansiasyon, lenf düğümü metastazı, evre ve 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ile Itch ekspresyonu arasında korelasyon olduğu görülürken, İmmünohistokimyasal ekspresyonda ise evre ve 5 yıllık hastalıksız sağ kalım anlamlı korelasyon saptandı ($p<0.05$) (Çizelge 4.8). Boyanma şiddeti ve lokalizasyon ile ilişki izlenmedi (Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10).

Çizelge 4.2. Karsinom grubunda Notch'un moleküler ve immünohistokimyasal ekspresyonunun klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi.

N		PCR (%)			EKSPRESYON	
PARAMETRELER		0	1	2	YOK	VAR
YAŞ						
64±12.353 ≥	22	7 (31.8)	11 (50)	4 (18.2)	14 (63.6)	8 (36.4)
64±12.353 <	28	5 (17.9)	11 (39.3)	12 (42.9)	16 (57.1)	12 (42.9)
CİNS						
Kadın	17	3 (17.6)	9 (52.9)	5 (29.5)	11 (66.7)	6 (35.3)
Erkek	33	9 (27.3)	13 (39.4)	11 (33.3)	21 (63.6)	12 (36.4)
LOKALİZASYON						
Çekum:	8	1 (12.5)	4 (50)	3 (37.5)	5 (62.5)	3 (37.5)
Kolon	16	3 (18.8)	10 (62.5)	3 (18.8)	11 (68.8)	5 (31.2)
Sigmoid:	16	7 (43.8)	2 (12.5)	7 (43.8)	7 (70)	3 (30)
Rektum:	10	1 (10)	6 (60)	3 (30)	7 (43.8)	9 (56.2)
DİFERANSİYASYON *						
İYİ DİFERANSİYE	24	6 (25)	16 (66.7)	2 (8.3)	22 (91.7)	2 (8.3)
ORTA DİFERANSİYE	13	4 (30.8)	5 (38.5)	4 (30.8)	6 (46.2)	7 (53.8)
KÖTÜ DİFERANSİYE	13	2 (15.4)	1 (7.7)	10 (76.9)	2 (15.4)	11 (84.6)
İNVAZYON						
T1	7	1 (14.3)	5 (71.4)	1 (14.3)	6 (85.7)	1 (14.3)
T2	10	3 (30)	4 (40)	3 (30)	6 (60)	4 (40)
T3	23	6 (26.1)	10 (43.5)	7 (30.4)	13 (56.5)	10 (43.5)
T4	10	2 (20)	3 (30)	5 (50)	5 (50)	5 (50)
LNM*						
Yok	19	3 (15.8)	15 (78.9)	1 (5.3)	18 (94.7)	1 (5.3)
Var	31	9 (29)	7 (22.6)	15 (48.4)	12 (38.7)	19 (61.3)
METASTATİK LDS						
1.54±0.7 ≥	26	8 (30.8)	10 (38.5)	8 (30.8)	17 (65.4)	9 (34.6)
1.54±0.7 <	24	4 (16.7)	12 (50)	8 (33.3)	13 (54.2)	11 (45.8)
LENFATİK İNV.						
Yok	37	11 (29.7)	13 (35.1)	13 (35.1)	20 (54.1)	17 (45.9)
Var	13	1 (7.7)	9 (69.2)	3 (23.1)	10 (76.9)	3 (23.1)
VASKÜLER İNV.						
Yok	42	12 (28.6)	16 (38.1)	14 (33.3)	25 (59.5)	17 (40.5)
Var	8	0	6 (75)	2 (25)	5 (62.5)	3 (37.5)
PERİNÖRAL İNV.						
Yok	31	6 (19.4)	13 (41.9)	12 (38.7)	17 (54.8)	14 (45.2)
Var	19	6 (31.6)	9 (47.4)	4 (21.1)	13 (68.4)	6 (31.6)
REAKTİF LDS						
18.28±0.7 ≥	27	7 (21.7)	12 (43.5)	8 (34.8)	16 (59.3)	11 (40.7)
18.28±0.7 <	23	5 (21.7)	10 (43.5)	8 (34.8)	14 (60.9)	9 (39.1)
EVRE*						
1+2	24	8 (33.3)	16 (66.7)	0	22 (94.7)	2 (8.3)
3+4	26	4 (15.4)	6 (23.1)	16 (61.5)	8 (30.8)	18 (69.2)
METASTAZ						
Yok	26	7 (26.9)	11 (42.3)	8 (30.8)	16 (61.5)	10 (38.5)
Var	24	12 (20.8)	11 (45.8)	8 (33.3)	14 (58.3)	10 (41.7)
YAŞAM SÜRESİ *						
60.62±26.68 ≥	26	3 (11.5)	17 (65.4)	6 (23.1)	20 (76.9)	6 (23.1)
60.62±26.68 <	24	9 (37.5)	5 (20.8)	10 (41.7)	10 (41.7)	14 (58.3)

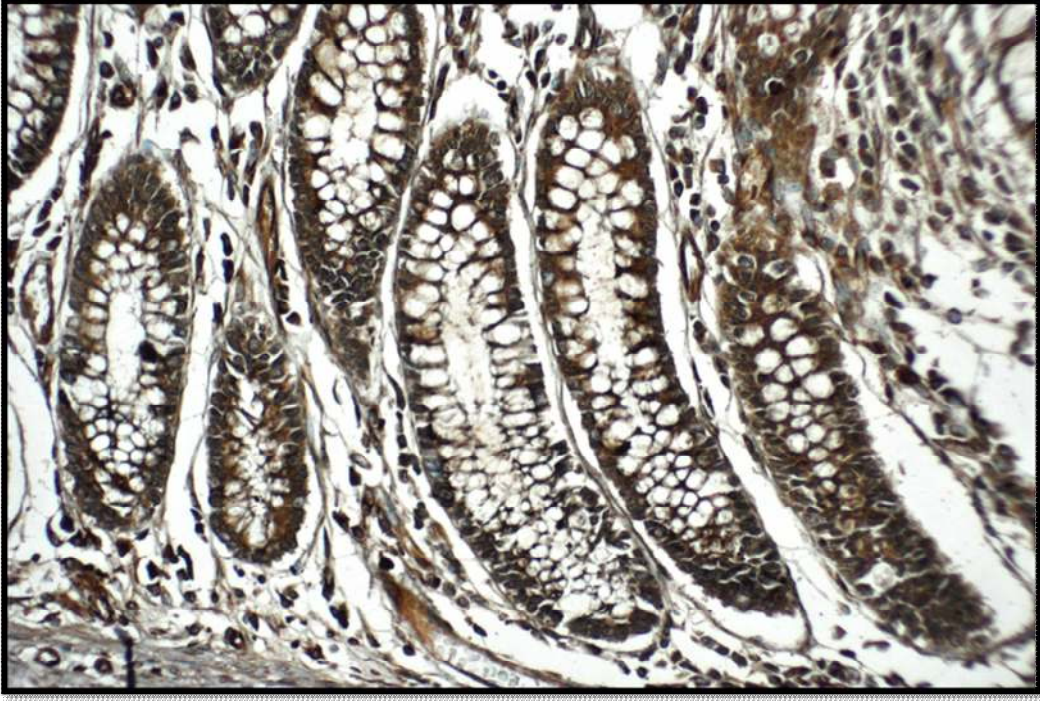
N: sayı; LNM: Lenf düğümü metastazı, LDS: Lenf düğümü sayısı; İNV: İnvasyon. PCR 0: değişmemiş, 1: azalmış, 2: artmış

* p<0.01

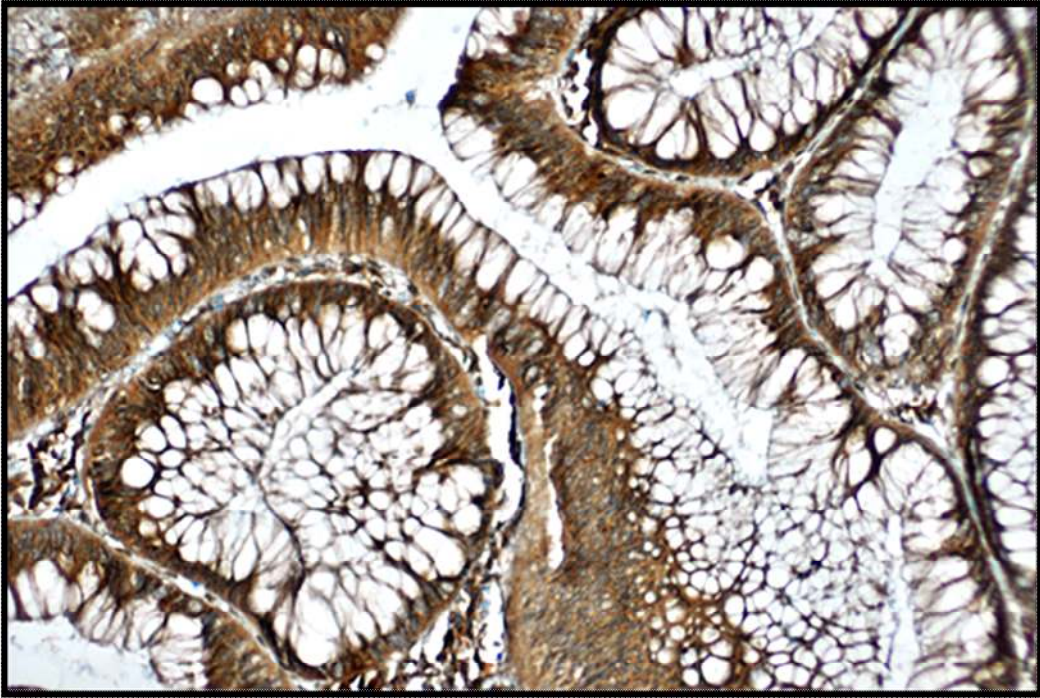
Çizelge 4.3. Karsinom grubunda Notch'un immünohistokimyasal ekspresyon şiddetinin klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi.

N		BOYANMA ŞİDDETİ (%)			
PARAMETRELER		0	1	2	3
YAŞ					
64±12.353 ≥	22	14 (63.6)	2 (9.1)	3 (13.6)	3 (13.6)
64±12.353 <	28	16 (57.1)	0	6 (21.4)	6 (21.4)
CİNS					
Kadın	17	21 (63.6)	4 (12.2)	4 (12.2)	4 (12.2)
Erkek	33	11 (64.7)	1 (5.9)	0	5 (29.4)
LOKALİZASYON					
Çekum:	8	5 (62.5)	0	2 (25)	1 (12.5)
Kolon	16	11 (68.8)	0	2 (12.5)	3 (18.8)
Sigmoid:	16	7 (43.8)	1 (6.2)	4 (25)	4 (25)
Rektum:	10	7 (70)	1 (10)	1 (10)	1 (10)
DİFERANSİYASYON					
İYİ DİFERANSİYE	22	22 (91.7)	0	1 (4.2)	1 (4.2)
ORTA DİFERANSİYE	13	6 (46.2)	1 (7.7)	5 (38.5)	1 (7.7)
KÖTÜ DİFERANSİYE	13	2 (15.4)	1 (7.7)	3 (23.1)	7 (53.8)
İNVAZYON					
T1	7	1 (100)	0	0	0
T2	10	3 (75)	0	0	1 (25)
T3	23	23 (56.1)	2 (4.9)	9 (22)	7 (17.1)
T4	10	3 (75)	0	0	1 (25)
LNM					
Yok	19	18 (94.7)	0	0	1 (5.3)
Var	31	12 (38.7)	9 (29)	6 (6.5)	4 (25)
METASTATİK LDS					
1.54±0.7 ≥	26	17 (65.4)	0	4 (15.4)	5 (19.2)
1.54±0.7 <	24	13 (54.2)	2 (8.3)	5 (20.8)	4 (16.7)
LENFATİK İNV.					
Yok	37	20 (54.1)	1 (2.7)	7 (18.9)	9 (24.3)
Var	13	10 (76.9)	1 (7.7)	2 (15.4)	2 (15.4)
VASKÜLER İNV.					
Yok	42	25 (59.5)	1 (2.4)	9 (21.4)	7 (16.7)
Var	8	5 (62.5)	1 (12.5)	0	2 (25)
PERİNÖRAL İNV.					
Yok	31	17 (54.8)	0	6 (19.4)	8 (25.8)
Var	19	13 (68.4)	2 (10.5)	3 (15.8)	1 (5.3)
REAKTİF LDS					
18.28±0.7 ≥	27	16 (59.3)	1 (3.7)	5 (18.5)	5 (18.5)
18.28±0.7 <	23	14 (60.9)	1 (4.3)	4 (17.4)	4 (17.4)
EVRE					
1+2	24	22 (91.7)	0	1 (4.2)	1 (4.2)
3+4	26	8 (30.8)	6 (29.6)	6 (29.6)	6 (29.6)
METASTAZ					
Yok	26	16 (61.5)	0	5 (19.2)	5 (19.2)
Var	24	14 (58.3)	2 (8.3)	4 (16.7)	4 (16.7)
YAŞAM SÜRESİ					
60.62±26.68 ≥	26	20 (76.9)	1 (3.8)	1 (3.8)	4 (15.4)
60.62±26.68 <	24	10 (41.7)	1 (4.2)	8 (33.3)	8 (33.3)

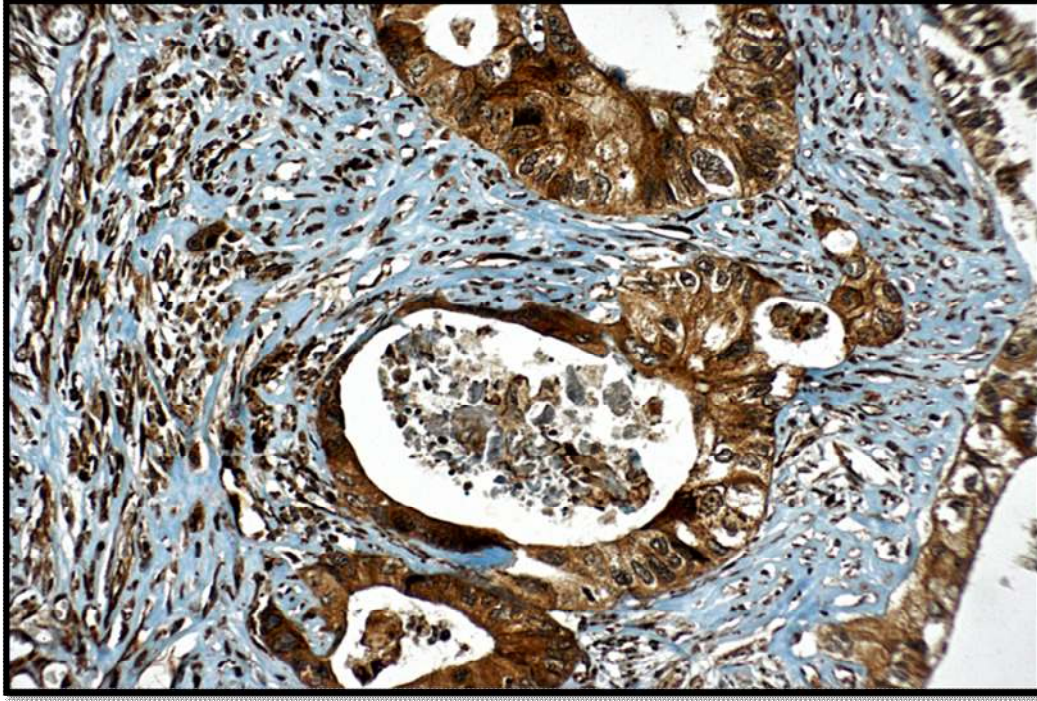
N: sayı; LNM: Lenf düğümü metastazı, LDS: Lenf düğümü sayısı; İNV: İnvasyon



Şekil 4.9. Normal mukozada Numb ekspresyonu. (x100)



Şekil 4.10. Adenomda Numb ekspresyonu. (x400)



Şekil 4.11. Karsinomda Numb ekspresyonu. (x400)

Çizelge 4.4. Normal mukoza, adenom ve karsinom olgularında immunohistokimyasal ve PCR ile Numb ekspresyonlarının gösterilmesi.

NUMB	NORMAL	ADENOM	KARSİNOM	P değeri
PCR				
0	20 (100)	4 (13.3)	0	0.0001
1	0	18 (60)	28 (56)	
2	0	8 (26.7)	22 (44)	
Boyanma				
0	6 (30)	21 (70)	20 (40)	0.008
1	14 (70)	9 (30)	30 (60)	
Boyanma Şiddeti				
0	6 (30)	21 (70)	20 (40)	0.086
1	5 (25)	3 (10)	13 (26)	
2	5 (25)	3 (10)	12 (12)	
3	4 (20)	3 (10)	5 (10)	
Boyanma Dağılımı				
Sitoplazmik	14 (100)	9(100)	30(100)	

PCR 0: değişmemiş, 1: azalmış, 2: artmış

Çizelge 4.5. Karsinom grubunda Numb'un moleküler ve immünohistokimyasal ekspresyonunun klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi.

N		PCR (%)		EKSPRESYON (%=	
PARAMETRELER		1	2	YOK	VAR
YAŞ					
64±12.353 ≥	22	12 (54.5)	10(45.5)	9 (40.9)	13 (59.1)
64±12.353 <	28	14 (50)	14 (50)	11 (39.3)	17 (60.7)
CİNS					
Kadın	17	17 (51.5)	16 (48.5)	7 (41.2)	10 (58.8)
Erkek	33	9 (52.9)	8 (47.1)	13 (39.4)	20 (60.6)
LOKALİZASYON					
Çekum:	8	4 (50)	4(50)	3 (37.5)	5 (62.5)
Kolon	16	9 (56.2)	7 (43.8)	5 (31.2)	11 (68.8)
Sigmoid:	16	6 (60)	4 (40)	6 (37.5)	10 (62.5)
Rektum:	10	7 (43.8)	9 (56.2)	6 (60)	4 (40)
DİFERANSİASYON *					
İYİ DİFERANSİYE	22	8 (33.3)	16 (66.7)	5 (20.8)	17 (79.2)
ORTA DİFERANSİYE	13	8 (61.5)	5 (38.5)	6 (46.2)	7 (53.8)
KÖTÜ DİFERANSİYE	13	10 (76.9)	3 (23.1)	9 (69.2)	4 (30.8)
İNVAZYON					
T1	7	1 (14.3)	6 (85.7)	0	7 (100)
T2	10	6 (60)	4 (40)	3 (30)	7 (70)
T3	23	(62.5)	8 (34.8)	14 (60.9)	9 (39.1)
T4	10	4 (40)	6 (60)	3 (30)	7 (70)
LNM*					
Yok	19	6 (31.6)	13 (68.4)	4 (21.1)	15 (78.9)
Var	31	20 (64.5)	11 (35.5)	16 (51.6)	15 (48.4)
METASTATİK LDS					
1.54±0.7 ≥	26	13 (50)	13 (50)	7 (26.9)	19 (73.1)
1.54±0.7 <	24	13 (54.2)	11 (45.8)	13 (54.2)	11 (45.8)
LENFATİK İNV.					
Yok	37	20 (54.1)	17 (45.9)	15 (40.5)	22 (59.5)
Var	13	6 (46.2)	7 (53.8)	5 (38.5)	8 (61.5)
VASKÜLER İNV.					
Yok	42	23 (54.8)	19 (45.2)	16 (38.1)	26 (61.9)
Var	8	3 (37.5)	5 (62.5)	4 (50)	4 (50)
PERİNÖRAL İNV.					
Yok	31	15 (48.4)	16 (51.6)	10 (32.3)	21 (67.7)
Var	19	11 (57.9)	8 (42.1)	10 (52.6)	9 (47.4)
REAKTİF LDS					
18.28±0.7 ≥	27	16 (59.3)	11 (40.7)	11 (40.7)	16 (59.3)
18.28±0.7 <	23	10 (43.5)	13 (56.5)	9 (39.1)	14 (60.9)
EVRE*					
1+2	24	7 (29.2)	17 (70.8)	5 (20.8)	19 (79.2)
3+4	26	19 (73.1)	7 (26.9)	15 (57.7)	11 (42.3)
METASTAZ					
Yok	26	11 (42.3)	15 (57.7)	8 (30.8)	18 (69.2)
Var	24	15 (62.5)	9 (37.5)	12 (50)	12 (50)
YAŞAM SÜRESİ*					
60.62±26.68≥	26	8 (30.8)	18 (69.2)	7 (26.9)	19 (73.1)
60.62±26.68<	24	18 (75)	6 (25)	13 (54.2)	11 (45.8)

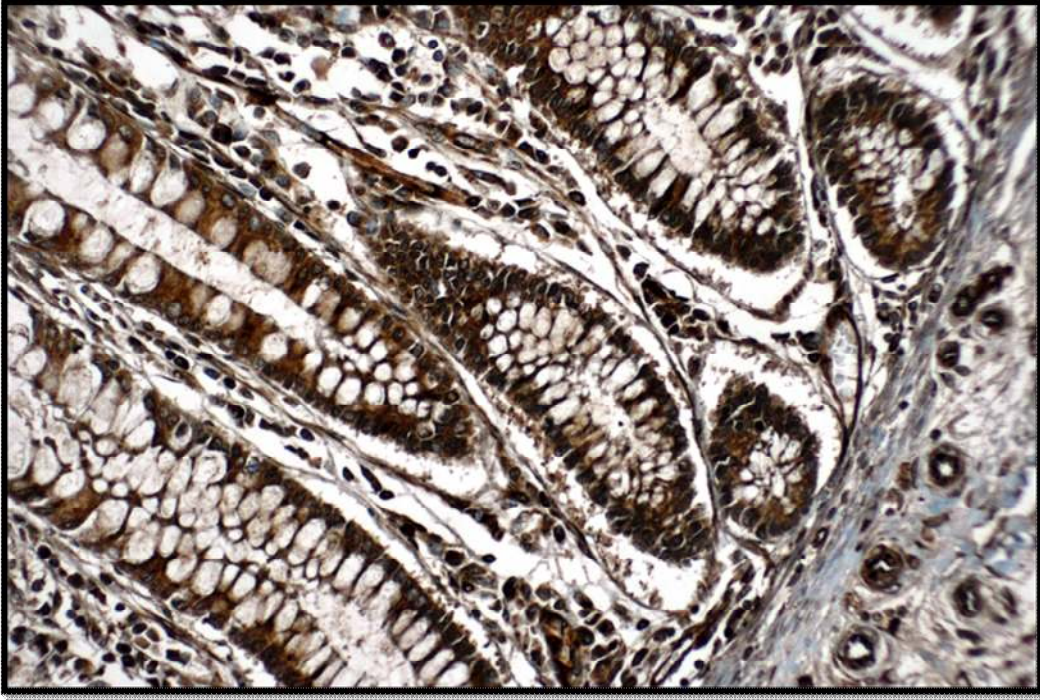
N: sayı; LNM: Lenf düğümü metastazı, LDS: Lenf düğümü sayısı; İNV: İnvasyon. PCR 1: azalmış, 2: artmış

* p<0.01

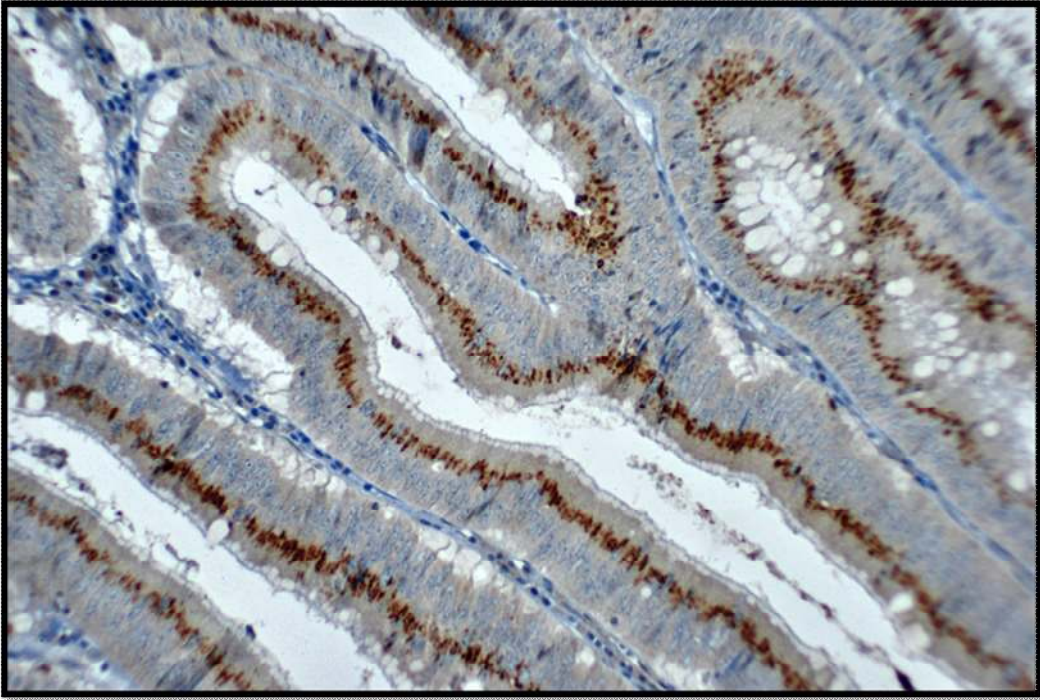
Çizelge 4.6. Karsinom grubunda Numb'ın immünohistokimyasal ekspresyon şiddetinin klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi.

N		BOYANMA ŞİDDETİ (%)			
PARAMETRELER		0	1	2	3
YAŞ					
64±12.353 ≥	22	9(40.9)	5 (22.7)	4 (18.2)	4 (18.2)
64±12.353 <	28	11 (39.3)	7 (25)	8 (28.6)	2 (7.1)
CİNS					
Kadın	17	7 (41.2)	6 (18.2)	2 (11.8)	2 (11.8)
Erkek	33	13 (39.4)	6 (18.2)	10 (30.3)	4 (12.1)
LOKALİZASYON					
Çekum:	8	3(37.5)	2 (25)	2 (25)	1 (12.5)
Kolon	16	5 (31.2)	4 (25)	5 (31.2)	2 (12.5)
Sigmoid:	16	6 (37.5)	4 (25)	3 (18.8)	3 (18.8)
Rektum:	10	6 (60)	2 (20)	2 (20)	0
DİFERANSİYASYON					
İYİ DİFERANSİYE	24	5 (20.8)	7 (29.2)	9 (37.5)	3 (12.5)
ORTA DİFERANSİYE	13	6 (46.2)	3 (23.2)	1 (7.7)	3 (23.1)
KÖTÜ DİFERANSİYE	13	9 (69.2)	2 (15.4)	2 (15.4)	0
İNVAZYON					
T1	7	0	4 (57.1)	1 (14.3)	2 (28.6)
T2	10	3 (30)	2 (20)	5 (50)	0
T3	23	14 (60.9)	2 (8.7)	5 (21.7)	2 (8.7)
T4	10	3 (30)	4 (40)	1 (10)	2 (20)
LNM					
Yok	19	4 (21.1)	6 (31.6)	6(31.6)	3(15.8)
Var	31	16 (51.6)	6 (19.4)	6 (19.4)	3 (9.7)
METASTATİK LDS					
1.54±0.7 ≥	26	7 (26.9)	6 (23.1)	11 (42.3)	2 (7.7)
1.54±0.7 <	24	13 (54.2)	6 (25)	1 (4.2)	4 (16.7)
LENFATİK İNV.					
Yok	37	15 (40.5)	7 (18.9)	10 (27)	5 (13.5)
Var	13	5(38.5)	5 (38.5)	2 (15.4)	1 (7.7)
VASKÜLER İNV.					
Yok	42	16 (38.1)	9 (21.4)	12 (28.6)	5 (11.9)
Var	8	4 (50)	3 (37.5)	0	1(12.5)
PERİNÖRAL İNV.					
Yok	31	10 (32.3)	8 (25.8)	9 (29)	4 (12.9)
Var	19	10 (52.6)	4 (21.1)	3 (15.8)	2 (10.5)
REAKTİF LDS					
18.28±0.7 ≥	27	11 (40.7)	7 (25.9)	8 (29.6)	1 (3.7)
18.28±0.7 <	23	9 (39.1)	5 (21.7)	4 (17.4)	5 (21.79)
EVRE					
1+2	24	5 (20.8)	6 (25)	8 (33.3)	5 (20.8)
3+4	26	15 (57.7)	6 (23.1)	4 (15.4)	1 (3.8)
METASTAZ					
Yok	26	8 (30.8)	5 (19.2)	9 (34.6)	4 (15.4)
Var	24	12 (50)	7 (29.2)	2 (12.5)	2 (8.3)
YAŞAM SÜRESİ					
60.62±26.68≥	26	7 (26.9)	8 (30.8)	7 (26.9)	4 (15.4)
60.62±26.68<	24	13 (54.2)	4 (16.7)	5 (20.8)	2 (8.3)

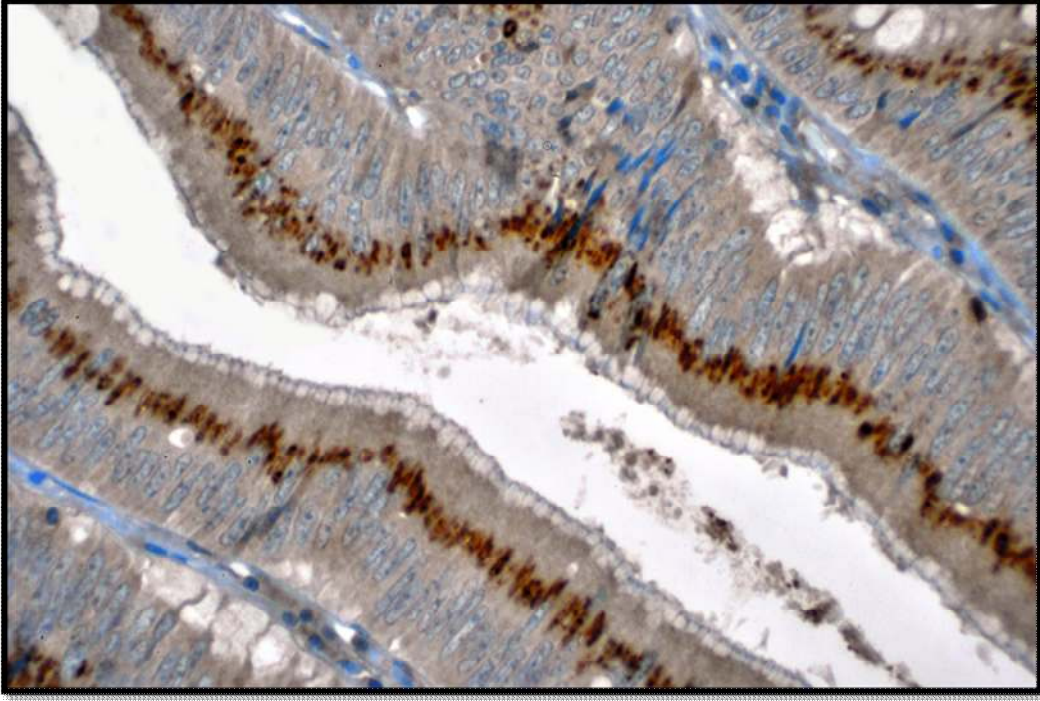
N: sayı; LDS: Lenf düğümü sayısı; LNM: Lenf düğümü metastazı, İNV: İnvazyon



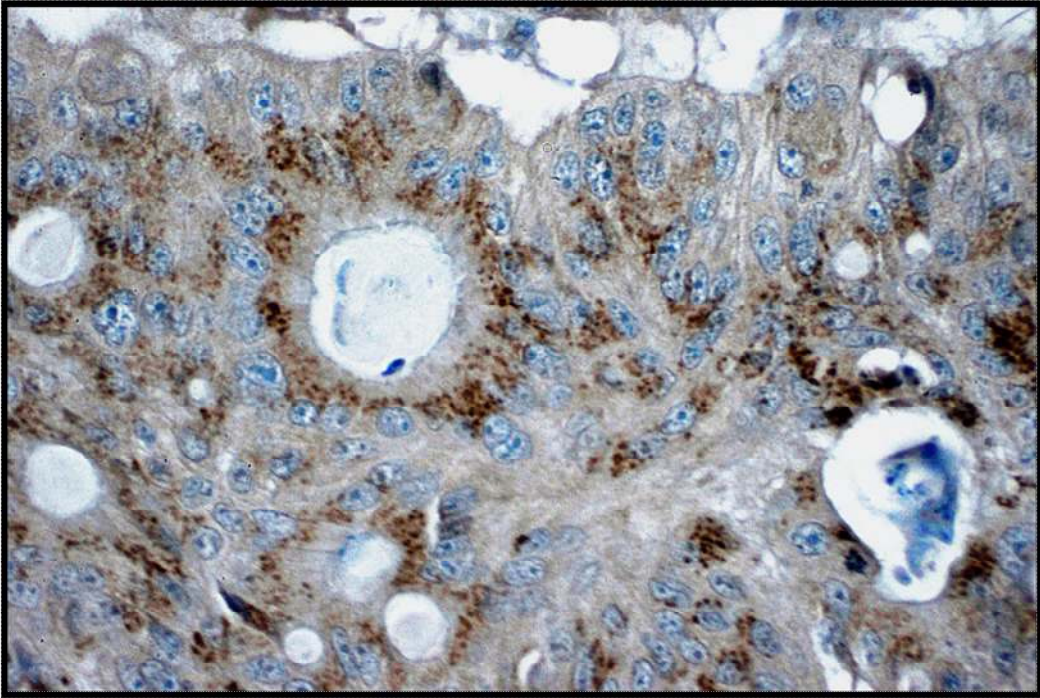
Şekil 4.12. Normal mukozada Itch ekspresyonu. (x100)



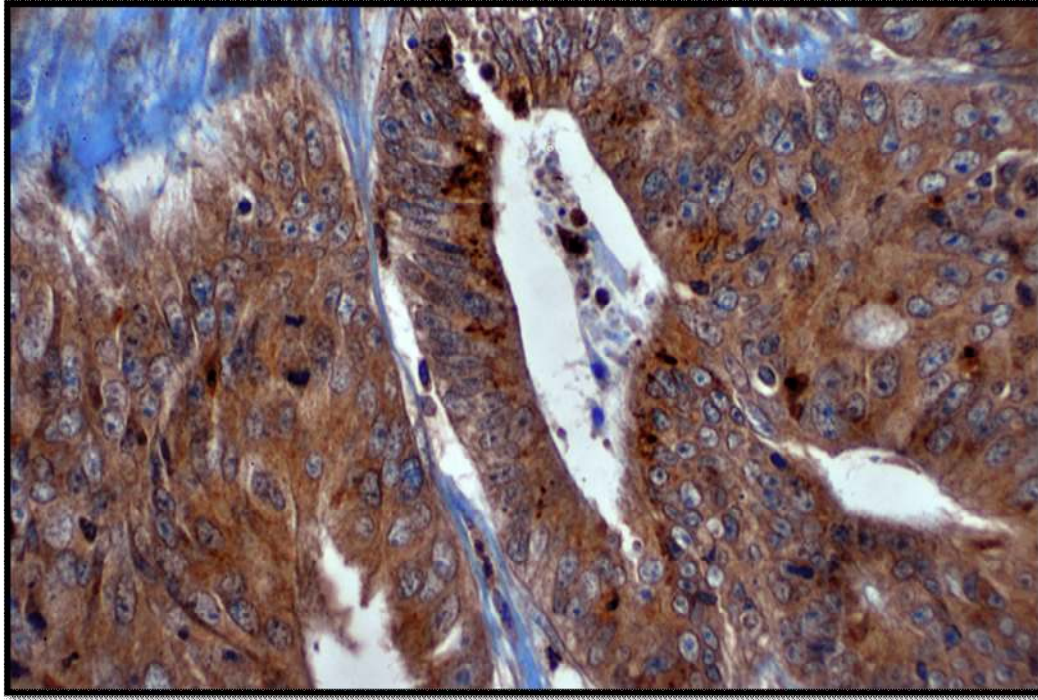
Şekil 4.13. Adenomda nodular Itch ekspresyonu. (x100)



Şekil 4.14. Adenomda noktasal Itch ekspresyonu. (x200)



Şekil 4.15. Karsinomda noktasal Itch ekspresyonu. (x400)



Şekil 4.16. Karsinomda noktasal ve granüler sitoplazmik Itch ekspresyonu. (x400)

Çizelge 4.7. Normal mukoza, adenom ve karsinom olgularında immünohistokimyasal ve rt-PCR ile Itch ekspresyonlarının gösterilmesi.

ITCH	NORMAL	ADENOM	KARSİNOM	P değeri
PCR				
0	20(100)	11 (36.7)	16 (32)	0.0001
1	0	15 (50)	19 (38)	
2	0	4 (13.3)	15 (30)	
Boyanma				
0	8 (40)	24 (80)	30(60)	0.01
1	12 (60)	6 (20)	20 (40)	
Boyanma Şiddeti				
0	8 (40)	24 (80)	30 (60)	0.054
1	4 (20)	1 (3.3)	4 (8)	
2	5 (25)	4 (13.3)	6 (12)	
3	3 (15)	1 (3.3)	10 (20)	
Boyanma Dağılımı				
Granüler	3 (25)	2 (33.3)	4 (20)	0.790
Noktasal	9 (75)	4 (66.7)	16 (80)	

PCR 0: değişmemiş, 1: azalmış, 2: artmış

Çizelge 4.8. Karsinom grubunda Itch'ın moleküler ve immünohistokimyasal ekspresyonunun klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi.

N		PCR (%)			EKSPRESYON	
PARAMETRELER		0	1	2	YOK	VAR
YAŞ						
64±12.353 ≥	22	7 (31.8)	6 (27.3)	9 (40.9)	14 (63.6)	8 (36.4)
64±12.353 <	28	5 (17.9)	12 (42.9)	11 (39.3)	18 (64.3)	10 (35.7)
CİNS						
Kadın	17	6 (35.3)	7 (41.2)	4 (23.4)	12 (70.6)	5 (29.4)
Erkek	33	6 (18.2)	11 (33.3)	16 (48.5)	20 (60.6)	13 (39.4)
LOKALİZASYON						
Çekum:	8	0	3 (37.5)	5 (62.5)	5 (62.5)	3 (37.5)
Kolon	16	5 (31.2)	5 (31.2)	6 (37.5)	10 (62.5)	6 (37.5)
Sigmoid:	16	3 (30)	3 (30)	4 (40)	7 (70)	3 (30)
Rektum:	10	4 (25)	7 (43.8)	5 (31.2)	10 (62.5)	6 (37.5)
DİFERANSİYASYON *						
İYİ DİFERANSİYE	24	5 (20.8)	5 (20.8)	14 (58.3)	14 (58.3)	10 (41.7)
ORTA DİFERANSİYE	13	3 (23.1)	5 (38.5)	5 (38.5)	10 (76.9)	3 (23.1)
KÖTÜ DİFERANSİYE	13	4 (30.8)	8 (61.5)	1 (7.7)	8 (61.5)	5 (38.5)
İNVAZYON						
T1	7	2 (20)	0	5 (71.4)	1 (14.3)	6 (85.7)
T2	10	2 (20)	(30)	5 (50)	7 (70)	3 (30)
T3	23	5 (21.7)	11 (47.8)	7 (30.4)	15 (65.2)	8 (34.8)
T4	10	24 (30)	18 (36)	20 (40)	9 (90)	1 (10)
LNM*						
Yok	19	5 (26.3)	2 (10.5)	12 (63.2)	9 (47.4)	10 (52.6)
Var	31	7 (22.6)	16 (88.9)	8 (25.8)	23 (74.2)	8 (25.8)
METASTATİK LDS						
1.54±0.7 ≥	26	7 (26.9)	7 (26.9)	12 (46.2)	12 (53.8)	12 (46.2)
1.54±0.7 <	24	5 (20.8)	11 (45.8)	8 (33.3)	18 (75)	6 (25)
LENFATİK İNV.						
Yok	37	7 (18.9)	13 (35.1)	17 (45.9)	22 (59.5)	15 (40.5)
Var	13	5 (38.5)	5 (38.5)	3 (23.1)	10 (76.9)	3 (23.1)
VASKÜLER İNV.						
Yok	42	8 (19)	16 (38.1)	18 (42.9)	27 (64.3)	15 (35.7)
Var	8	4 (50)	2 (25)	2 (25)	5 (62.5)	3 (37.5)
PERİNÖRAL İNV.						
Yok	31	8 (25.8)	10 (32.3)	13 (41.9)	20 (64.5)	11 (35.5)
Var	19	4 (21.1)	8 (42.1)	7 (36.8)	12 (63.2)	7 (36.8)
REAKTİF LDS						
18.28±0.7 ≥	27	7 (25.9)	12 (44.4)	8 (29.6)	17 (63)	10 (37)
18.28±0.7 <	23	5 (21.7)	6 (26.1)	12 (52.2)	15 (65.2)	8 (34.8)
EVRE*						
1+2	24	5 (20.8)	4 (16.7)	15 (62.5)	12 (50)	12 (50)
3+4	26	7 (26.9)	14 (53.8)	5 (19.1)	20 (76.9)	6 (23.1)
METASTAZ						
Yok	26	7 (26.9)	7 (26.9)	12 (46.2)	15 (57.7)	11 (42.3)
Var	24	5 (20.8)	11 (45.8)	8 (33.3)	17 (70.8)	7 (29.2)
YAŞAM SÜRESİ*						
60.62±26.68 ≥	26	7 (26.9)	3 (11.5)	16 (61.5)	12 (46.2)	14 (53.8)
60.62±26.68 <	24	5 (20.8)	15 (62.5)	4 (16.7)	20 (83.3)	4 (16.7)

N: sayı; LNM: Lenf düğümü metastazı, LDS: Lenf düğümü sayısı; İNV: İnvazyon PCR 0: değişmemiş, 1: azalmış, 2: artmış

*p<0.01

Çizelge 4.9. Karsinom grubunda Itch'ın immünohistokimyasal ekspresyon şiddetinin klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi.

N		BOYANMA ŞİDDETİ (%)			
PARAMETRELER		0	1	2	3
YAŞ					
64±12.353 ≥	22	15 (68.2)	3 (13.6)	4 (18.2)	0
64±12.353 <	28	18 (64.3)	2 (7.1)	2 (7.1)	6 (21.4)
CİNS					
Kadın	17	21 (63.6)	4 (12.1)	3 (9.1)	5 (15.2)
Erkek	33	12 (70.6)	1 (5.9)	3 (17.6)	1 (5.9)
LOKALİZASYON					
Çekum:	8	5 (62.5)	1 (12.5)	0	2 (25)
Kolon	16	10 (62.5)	2 (12.5)	3 (18.8)	1 (6.2)
Sigmoid:	16	10 (62.5)	2 (12.5)	2 (12.5)	2 (12.5)
Rektum:	10	8 (80)	0	1 (10)	1 (10)
DİFERANSİYASYON					
İYİ DİFERANSİYE	22	14 (58.3)	4 (16.7)	2 (8.3)	4 (16.7)
ORTA DİFERANSİYE	13	10 (76.9)	1 (7.7)	1 (7.7)	1 (7.7)
KÖTÜ DİFERANSİYE	13	9 (69.2)	0	3 (23.1)	1 (7.7)
İNVAZYON					
T1	7	1 (14.3)	2 (28.6)	1 (14.3)	3 (42.9)
T2	10	7 (70)	1 (10)	1 (10)	1 (10)
T3	23	16 (69.6)	1 (4.3)	4 (17.4)	2 (8.7)
T4	10	9 (90)	1 (10)	0	0
LNM					
Yok	19	9 (47.4)	4 (21.1)	2 (10.5)	4 (21.1)
Var	31	24 (77.4)	1 (3.2)	4 (12.9)	2 (6.5)
METASTATİK LDS					
1.54±0.7 ≥	26	14 (53.8)	3 (11.5)	4 (15.4)	5 (19.2)
1.54±0.7 <	24	19 (79.2)	2 (8.3)	2 (8.3)	1 (4.2)
LENFATİK İNV.					
Yok	37	23 (62.2)	4 (10.8)	5 (13.5)	5 (13.5)
Var	13	10 (76.9)	1 (7.7)	1 (7.7)	1 (7.7)
VASKÜLER İNV.					
Yok	42	28 (66.7)	4 (4.5)	5 (11.9)	5 (11.9)
Var	8	5 (62.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)
PERİNÖRAL İNV.					
Yok	31	21 (67.7)	4 (12.9)	4 (12.9)	2 (6.5)
Var	19	12 (63.2)	1 (5.3)	2 (10.5)	4 (21.1)
REAKTİF LDS					
18.28±0.7 ≥	27	18 (66.7)	3 (11.1)	4 (14.8)	2 (7.4)
18.28±0.7 <	23	15 (65.2)	2 (8.7)	2 (8.7)	4 (17.4)
EVRE					
1+2	24	12 (50)	5 (20.8)	3 (12.5)	4 (16.7)
3+4	26	21 (80.8)	0	3 (11.5)	2 (7.7)
METASTAZ					
Yok	26	16 (61.5)	1 (3.8)	4 (15.4)	5 (19.2)
Var	24	17 (70.8)	4 (16.7)	2 (8.3)	1 (4.2)
YAŞAM SÜRESİ					
60.62±26.68 ≥	26	12 (46.2)	5 (19.2)	3 (11.5)	6 (23.1)
60.62±26.68 <	24	21 (87.5)	0	3 (12.5)	0

N: sayı; LNM: Lenf düğümü metastazı, LDS: Lenf düğümü sayısı; İNV: İnvazyon

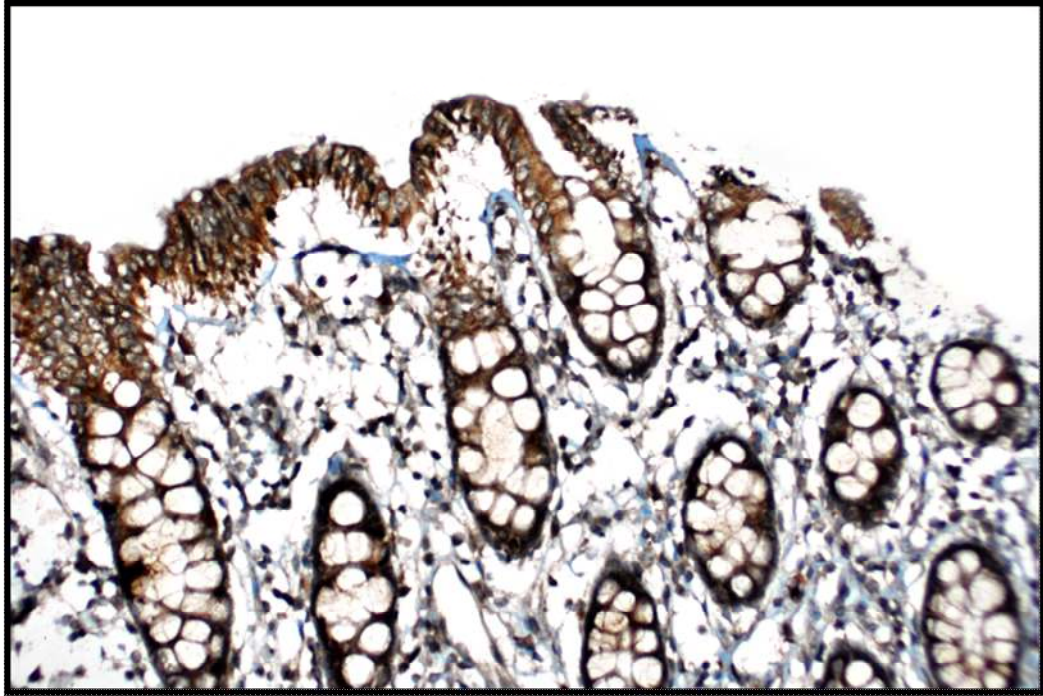
Çizelge 4.10. Karsinom grubunda İtch'in boyanma lokalizasyonunun klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi.

N		BOYANMA LOKALİZASYONU (%)		
PARAMETRELER		0	NOKTASAL	GRANÜLER
YAŞ				
64±12.353 ≥	22	15 (68.2)	1 (4.5)	6 (27.3)
64±12.353 <	28	18 (64.3)	2 (7.1)	8 (28.6)
CİNS				
Kadın	17	12 (70.6)	0	5 (29.4)
Erkek	33	21 (63.6)	3 (9.1)	9 (27.3)
LOKALİZASYON				
Çekum:	8	5 (62.5)	1 (12.5)	2 (25)
Kolon	16	10 (62.5)	1 (6.2)	5 (31.5)
Sigmoid:	16	10 (62.5)	1 (6.2)	5 (31.2)
Rektum:	10	8 (80)	0	2 (20)
DİFERANSİYASYON				
İYİ DİFERANSİYE	22	14 (58.3)	3 (12.5)	7 (29.2)
ORTA DİFERANSİYE	13	10 (76.9)	0	3 (23.1)
KÖTÜ DİFERANSİYE	13	9 (69.2)	0	4 (30.8)
İNVAZYON				
T1	7	1 (14.3)	2 (28.6)	4 (57.1)
T2	10	7 (70)	0	3 (30)
T3	23	16 (69.6)	1 (4.3)	6 (26.1)
T4	10	9 (90)	0	1 (10)
LNM				
Yok	19	9 (47.4)	3 (15.8)	7 (36.8)
Var	31	24 (77.4)	0	7 (22.6)
METASTATİK LDS				
1.54±0.7 ≥	26	14 (53.8)	1 (3.8)	11 (42.3)
1.54±0.7 <	24	19 (79.2)	2 (8.3)	3 (12.5)
LENFATİK İNV.				
Yok	37	23 (62.2)	2 (5.4)	12 (32.4)
Var	13	10 (76.9)	1 (7.7)	2 (15.4)
VASKÜLER İNV.				
Yok	42	28 (66.7)	2 (4.8)	12 (28.6)
Var	8	5 (62.5)	1 (12.5)	2 (25)
PERİNÖRAL İNV.				
Yok	31	21 (67.7)	3 (9.7)	7 (22.6)
Var	19	12 (63.2)	0	7 (36.8)
REAKTİF LDS				
18.28±0.7 ≥	27	18 (66.7)	3 (11.1)	6 (22.2)
18.28±0.7 <	23	15 (65.2)	0	8 (34.8)
EVRE				
1+2	24	12 (50)	3 (12.5)	9 (37.5)
3+4	26	21 (80.8)	0	5 (19.2)
METASTAZ				
Yok	26	16 (61.5)	0	10 (38.5)
Var	24	17 (70.8)	3 (12.5)	4 (16.7)
YAŞAM SÜRESİ				
60.62±26.68≥	26	12 (46.2)	3 (11.5)	11 (42.3)
60.62±26.68<	24	21 (87.5)	0	3 (12.5)

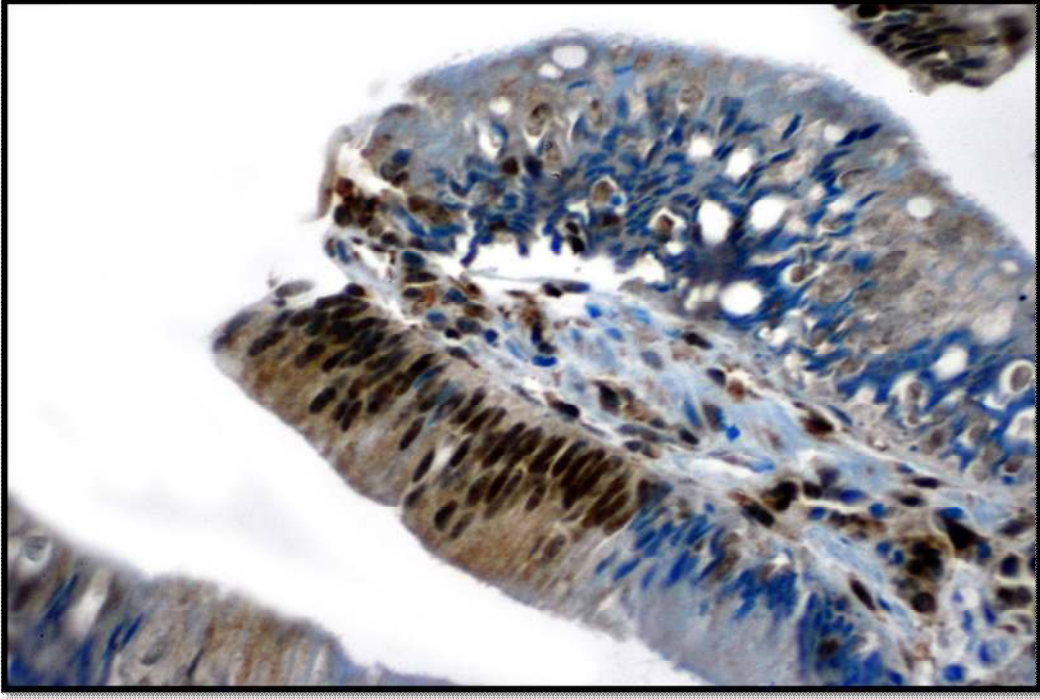
N: sayı; LNM: Lenf düğümü metastazı, LDS: Lenf düğümü sayısı; İNV: İnvazyon

Siah proteinin immunohistokimyasal ekspresyonu sitoplazmik olmakla birlikte, bazı olgularda hem sitoplazmik hem de nükleer boyanma bir kaç olguda ise sadece nükleer boyanma izlendi (Şekil 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22) . Hem PCR, hem de immünohistokimyasal ekspresyon değerlendirildiğinde normal dokularla karşılaştırıldığında adenomlarda Siah protein ekspresyonu azalırken; adenokarsinom olgularında Siah ekspresyonunun arttığı saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.11).

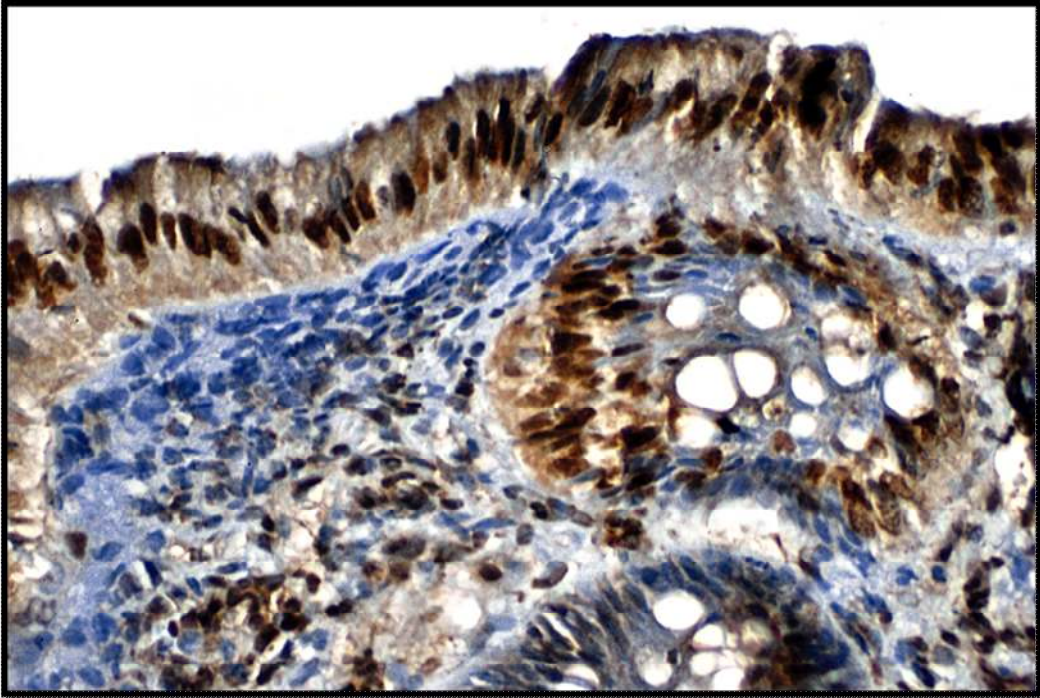
Karsinom grubunda Siah-1'in hem moleküler hem de immünohistokimyasal olarak ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, lokalizasyon, invazyon, metastatik lenf düğümünün sayısı, lenfatik, vasküler, perinöral invazyon, reaktif lenf düğümü sayısı ve uzak metastaz arasında ilişki izlenmedi ($p>0.05$). Diferansiyasyon, lenf düğümü metastazı, evre ve 5 yıllık hastalıksız sağ kalım ile Siah-1 ekspresyonu arasında hem moleküler hem de immunohistokimyasal olarak istatistiksel anlamlı korelasyon saptandı ($p<0.05$) (Çizelge 4.12). Siah-1 boyanma şiddeti ve lokalizasyonu ile belirli bir fark saptanmadı (Çizelge 4.13 ve 4.14).



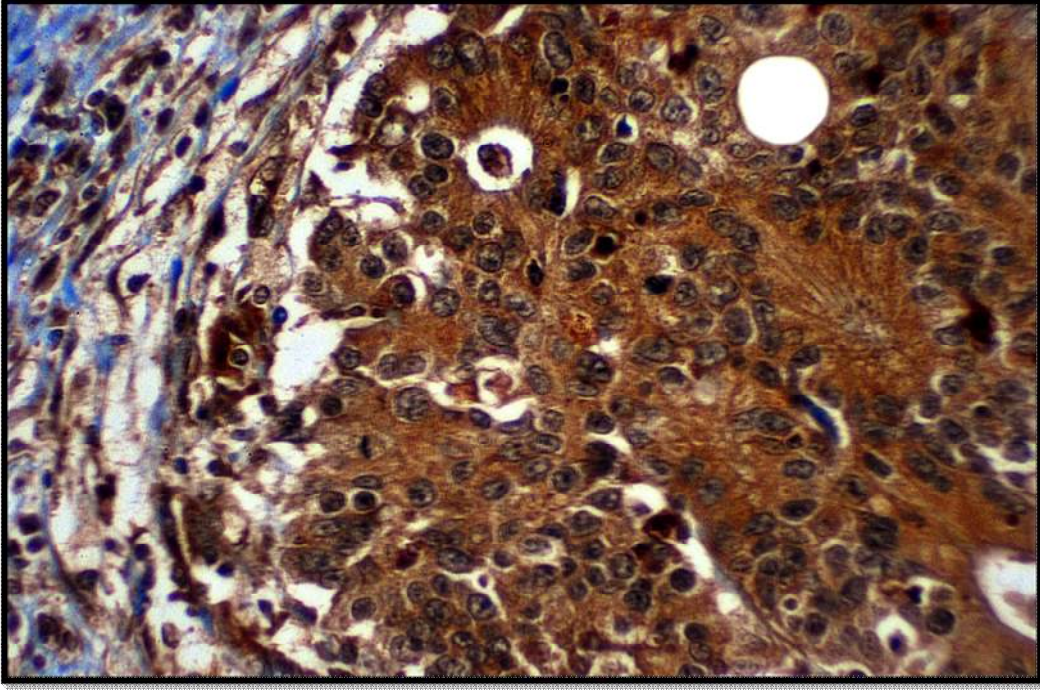
Şekil 4.17. Normal mukozada Siah-1 ekspresyonu. (x100)



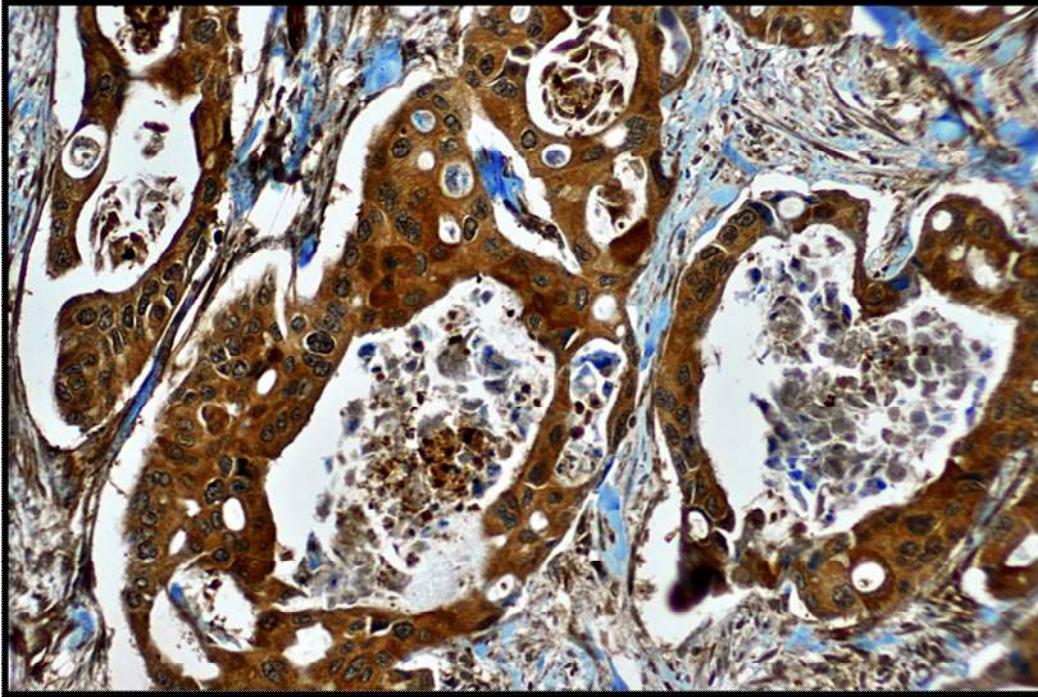
Şekil 4.18. Adenomda nükleer ve sitoplazmik Siah-1 pozitifliği. (x200)



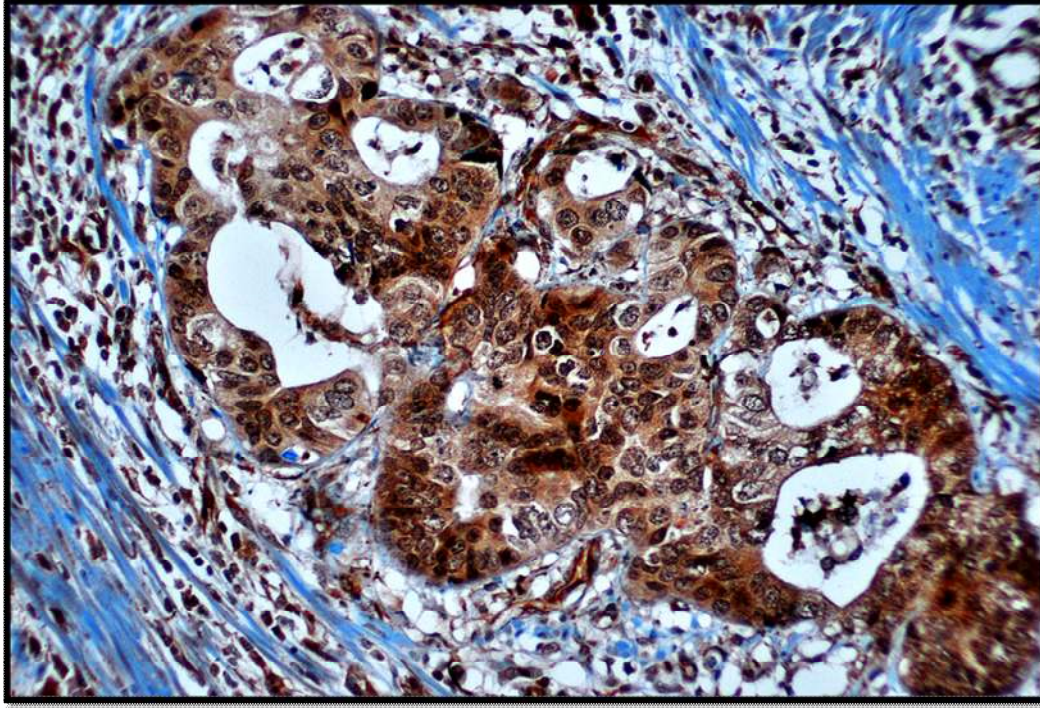
Şekil 4.19. Adenomda nükleer ve sitoplazmik Siah-1 pozitifliği. (x200)



Şekil 4.20. Karsinomda nükleer ve sitoplazmik Siah-1 pozitifliği. (x400)



Şekil 4.21. Karsinomda nükleer ve sitoplazmik Siah-1 pozitifliği. (x400)



Şekil 4.22. Karsinomda nükleer ve sitoplazmik Siah-1 pozitifliği. (x400)

Tablo 4.11. Normal mukoza, adenom ve karsinom olgularında Siah'ın immunohistokimyasal ve PCR ile ekspresyonlarının gösterilmesi.

SIAH	NORMAL	ADENOM	KARSİNOM	P değeri
PCR				
0	20 (100)	6 (20)	10 (20)	0.001
1	0	13 (43.3)	13 (26)	
2	0	11 (36.7)	27 (54)	
Boyanma				
0	15 (75)	19 (63.3)	21 (42)	0.024
1	5 (25)	11 (36.7)	29 (58)	
Boyanma Şiddeti				
0	15 (75)	19 (63.3)	21 (42)	0.166
1	1 (5)	2 (6.7)	10 (20)	
2	2 (10)	4 (13.3)	11 (22)	
3	2 (10)	5 (16.7)	8 (16)	
Boyanma Dağılımı				
S	0	2 (18.2)	8 (27.69)	0.365
B	5 (100)	9 (81.8)	21 (72.4)	

PCR 0: değişmemiş, 1: azalmış, 2: artmış)

Çizelge 4.12. Karsinom grubunda Siah-1'in moleküler ve immünohistokimyasal ekspresyonunun klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi.

N		PCR (%)			EKSPRESYON	
PARAMETRELER		0	1	2	YOK	VAR
YAŞ						
64±12.353 ≥	22	4 (18.2)	5 (22.7)	13 (59.1)	7 (31.8)	15 (68.2)
64±12.353 <	28	6 (21.4)	8 (28.6)	14 (50)	14 (50)	14 (50)
CİNS						
Kadın	17	3 (17.6)	4 (23.5)	10 (58.8)	15 (45.5)	18 (54.5)
Erkek	33	7 (21.2)	9 (27.3)	17 (51.5)	6 (35.3)	11 (64.7)
LOKALİZASYON						
Çekum:	8	2 (25)	2 (25)	4 (50)	4 (50)	4 (50)
Kolon	16	3 (18.8)	4 (25)	9 (56.2)	6 (37.5)	10 (62.5)
Sigmoid:	16	2 (12.5)	4 (25)	10 (62.5)	6 (37.5)	10 (62.5)
Rektum:	10	3 (30)	3 (30)	4 (40)	5 (50)	5 (50)
DİFERANSİYASYON *						
İYİ DİFERANSİYE	24	7 (29.2)	10 (41.7)	7 (29.2)	16 (66.7)	8 (33.3)
ORTA DİFERANSİYE	13	2 (15.4)	1 (7.7)	10 (76.9)	3 (23.1)	10 (76.9)
KÖTÜ DİFERANSİYE	13	1 (7.7)	2 (15.4)	10 (76.9)	2 (15.4)	11 (84.6)
İNVAZYON						
T1	7	2 (28.6)	2 (28.6)	3 (42.9)	4 (51.7)	3 (42.9)
T2	10	1 (10)	4 (40)	5 (50)	4 (40)	6 (60)
T3	23	5 (21.7)	4 (17.4)	5 (50)	9 (39.1)	14 (60.9)
T4	10	2 (20)	3 (30)	5 (50)	4 (40)	6 (60)
LNM*						
Yok	19	6 (31.6)	8 (42.1)	5 (26.3)	13 (68.4)	6 (31.6)
Var	31	4 (12.9)	5 (16.1)	22 (71)	8 (25.8)	23 (74.2)
METASTATİK LDS						
1.54±0.7 ≥	26	4 (15.4)	6 (23.1)	16 (61.5)	9 (34.6)	17 (65.4)
1.54±0.7 <	24	6 (25)	7 (29.2)	11 (45.8)	12 (50)	12 (50)
LENFATİK İNV.						
Yok	37	7 (18.9)	6 (16.2)	24 (64.9)	12 (32.4)	25 (67.6)
Var	13	3 (23.1)	7 (53.8)	3 (23.1)	9 (69.2)	4 (30.8)
VASKÜLER İNV.						
Yok	42	8 (19)	9 (21.4)	25 (59.5)	16 (38.1)	26 (61.9)
Var	8	2 (25)	4 (50)	2 (25)	5 (62.5)	3 (37.5)
PERİNÖRAL İNV.						
Yok	31	5 (16.1)	9 (29)	17 (54.8)	13 (41.9)	18 (58.1)
Var	19	5 (26.3)	4 (21.1)	10 (52.6)	8 (42.1)	11 (57.9)
REAKTİF LDS						
18.28±0.7 ≥	27	5 (18.5)	5 (18.5)	17 (63)	10 (37)	17 (63)
18.28±0.7 <	23	5 (21.7)	8 (34.8)	10 (43.5)	11 (47.8)	12 (52.2)
EVRE*						
1+2	24	7 (29.2)	8 (33.3)	9 (37.5)	14 (58.3)	10 (41.7)
3+4	26	3 (11.5)	5 (19.2)	18 (69.2)	7 (26.9)	19 (73.1)
METASTAZ						
Yok	26	4 (15.4)	6 (23.1)	16 (61.5)	9 (34.6)	17 (65.4)
Var	24	6 (25)	7 (29.2)	11 (45.8)	12 (50)	12 (50)
YAŞAM SÜRESİ*						
60.62±26.68 ≥	26	8 (30.8)	10 (38.5)	8 (30.8)	16 (61.5)	10 (38.5)
60.62±26.68 <	24	2 (8.3)	3 (12.5)	19 (79.2)	21 (42)	19 (79.2)

N: sayı; LDS: Lenf düğümü sayısı; LNM: Lenf düğümü metastazı, İNV: İnvazyon. PCR 0: değişmemiş, 1: azalmış, 2: artmış

* p<0.01

Çizelge 4.13. Karsinom grubunda Siah-1'in immünohistokimyasal boyanma şiddetinin klinkopatolojik parametreler ile ilişkisi.

N		BOYANMA ŞİDDETİ (%)			
PARAMETRELER		0	1	2	3
YAŞ					
64±12.353 ≥	22	7 (31.8)	4 (18.2)	7 (31.8)	4 (18.2)
64±12.353 <	28	14 (50)	6 (21.4)	4 (14.3)	4 (14.3)
CİNS					
Kadın	17	6 (35.3)	6 (35.3)	3 (17.6)	2 (11.8)
Erkek	33	15 (45.5)	4 (12.1)	8 (24.2)	6 (18.2)
LOKALİZASYON					
Çekum:	8	4 (50)	1 (12.5)	1 (12.5)	2 (25)
Kolon	16	6 (37.5)	4 (25)	4 (25)	2 (12.5)
Sigmoid:	16	6 (37.5)	4 (25)	3 (18.8)	3 (18.8)
Rektum:	10	5 (50)	1 (10)	3 (30)	1 (10)
DİFERANSİYASYON					
İYİ DİFERANSİYE	22	16 (66.7)	3 (12.5)	2 (8.3)	3 (23.1)
ORTA DİFERANSİYE	13	3 (23.1)	3 (23.1)	4 (30.8)	3 (23.1)
KÖTÜ DİFERANSİYE	13	2 (15.4)	4 (30.8)	5 (38.5)	2 (15.4)
İNVAZYON					
T1	7	4 (57.1)	1 (14.3)	1 (14.3)	1 (14.3)
T2	10	4 (40)	2 (20)	3 (30)	1 (10)
T3	23	9 (39.1)	4 (17.4)	4 (17.4)	6 (26.1)
T4	10	4 (40)	3 (30)	3 (30)	0
LNM					
Yok	19	13 (68.4)	2 (10.5)	0	4 (21.1)
Var	31	8 (25.8)	8 (25.8)	11 (35.5)	4 (12.9)
METASTATİK LDS					
1.54±0.7 ≥	26	9 (34.6)	7 (26.9)	6 (23.1)	4 (15.4)
1.54±0.7 <	24	12 (50)	3 (12.5)	5 (20.8)	4 (16.7)
LENFATİK İNV.					
Yok	37	12 (32.4)	8 (21.6)	9 (24.3)	8 (21.6)
Var	13	9 (69.2)	2 (15.4)	2 (15.4)	0
VASKÜLER İNV.					
Yok	42	16 (38.1)	10 (23.8)	9 (21.4)	7 (16.7)
Var	8	5 (62.5)	0	2 (25)	1 (12.5)
PERİNÖRAL İNV.					
Yok	31	13 (41.9)	7 (22.6)	6 (19.4)	5 (16.1)
Var	19	8 (42)	3 (15.8)	5 (26.3)	3 (15.8)
REAKTİF LDS					
18.28±0.7 ≥	27	10 (37)	8 (29.6)	8 (29.6)	1 (3.7)
18.28±0.7 <	23	11 (47.8)	2 (8.7)	3 (13)	7 (30.4)
EVRE					
1+2	24	14 (58.3)	3 (12.5)	3 (12.5)	4 (16.7)
3+4	26	7 (26.9)	7 (26.9)	8 (30.8)	4 (15.4)
METASTAZ					
Yok	26	9 (34.6)	5 (19.2)	5 (19.2)	7 (26.9)
Var	24	12 (50)	5 (20.8)	6 (25)	1 (4.2)
YAŞAM SÜRESİ					
60.62±26.68 ≥	26	16 (61.5)	4 (15.4)	3 (11.5)	3 (11.5)
60.62±26.68 <	24	5 (20.8)	6 (25)	8 (33.3)	5 (20.8)

N: sayı; LNM: Lenf düğümü metastazı, LDS: Lenf düğümü sayısı; İNV: İnvasyon

Çizelge 4.14. Karsinom grubunda Siah-1'in immünohistokimyasal lokalizasyonunun klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi.

N		BOYANMA LOKALİZASYONU (%)		
PARAMETRELER		0	S+N	S
YAŞ				
64±12.353 ≥	22	7 (31.8)	3 (13.6)	12 (54.5)
64±12.353 <	28	14 (50)	5 (17.9)	9 (32.1)
CİNS				
Kadın	17	6 (35.3)	5 (29.4)	6 (35.3)
Erkek	33	15 (45.5)	3 (9.1)	15 (45.5)
LOKALİZASYON				
Çekum:	8	4 (50)	2 (25)	2 (25)
Kolon	16	6 (37.5)	3 (18.8)	7 (43.8)
Sigmoid:	16	6 (37.5)	1 (6.2)	9 (56.2)
Rektum:	10	5 (50)	2 (20)	3 (30)
DİFERANSİYASYON				
İYİ DİFERANSİYE	22	16 (66.7)	2 (8.3)	6 (25)
ORTA DİFERANSİYE	13	3 (23.1)	3 (23.1)	7 (53.8)
KÖTÜ DİFERANSİYE	13	2 (15.4)	3 (23.1)	8 (61.5)
İNVAZYON				
T1	7	4 (57.1)	1 (14.3)	2 (28.6)
T2	10	4 (40)	2 (20)	4 (40)
T3	23	9 (39.1)	3 (13)	11 (47.8)
T4	10	4 (40)	2 (20)	4 (40)
LNM				
Yok	19	13	2 (10.5)	4 (21.1)
Var	31	8 (25)	6 (19.4)	17 (54.8)
METASTATİK LDS				
1.54±0.7 ≥	26	9 (34.6)	5 (19.2)	12 (46.2)
1.54±0.7 <	24	12 (50)	3 (12.5)	9 (37.5)
LENFATİK İNV.				
Yok	37	12 (32.4)	6 (16.2)	19 (51.4)
Var	13	9 (69.2)	2 (15.4)	2 (15.4)
VASKÜLER İNV.				
Yok	42	16 (38.1)	8 (19)	18 (42.9)
Var	8	5 (62.5)	0	3 (37.5)
PERİNÖRAL İNV.				
Yok	31	13 (41.9)	6 (19.4)	12 (38.7)
Var	19	8 (42.1)	2 (10.5)	9 (47.4)
REAKTİF LDS				
18.28±0.7 ≥	27	10 (37)	7 (25.9)	10 (37)
18.28±0.7 <	23	11 (47.8)	1 (4.3)	11 (47.8)
EVRE				
1+2	24	14 (58.3)	1 (4.2)	9 (37.5)
3+4	26	7 (26.9)	7 (26.9)	12 (46.2)
METASTAZ				
Yok	26	9 (34.6)	3 (11.5)	14 (53.8)
Var	24	12 (50)	5 (20.8)	7 (29.2)
YAŞAM SÜRESİ				
60.62±26.68≥	26	16 (61.5)	2 (7.7)	8 (30.8)
60.62±26.68<	24	5 (20.8)	6 (25)	13 (54.2)

N: sayı; LNM: Lenf düğümü metastazı, LNM: Lenf nodu metastazı,
LDS: Lenf düğümü sayısı; İNV: İnvazyon

Notch, Numb, Itch ve Siah-1'in PCR ekspresyonları arasındaki korelasyon Spearman's testi ile incelendiğinde Notch ile Numb ($r: -0.4$, $p<0.05$) ve Itch ($r: -0.3$, $p<0.05$) arasında negatif, Siah-1 ile pozitif korelasyon ($r: 0.5$, $p<0.01$) olduğu izlendi. Numb ile Itch arasında ise pozitif korelasyon ($r: 0.8$, $p<0.01$) izlendi.

Her bir parametrenin beş yıllık hastalıksız sağ kalım analizi log rank testi ile analiz edildi. Beş yıllık hastalıksız sağ kalım iyi diferansiye adenokarsinom tanılı olgularda 64,58 ay, orta diferansiye adenokarsinom tanılı olgularda 55,0 ay ve kötü diferansiye tanılı olgularda 38,92 ay bulunmuştur (Şekil 4.23).

Beş yıllık hastalıksız sağ kalım lenf nodu metastazı olanlar da 54,16 ay olmayanlar ise 71.16 ay olarak izlendi (Şekil 4.24).

Benzer olarak düşük evreli kolon adenokarsinomlu hastalarda beş yıllık hastalıksız sağ kalım 66.79 ay, yüksek evreli adenokarsinom tanılı olgularda ise 34,92 ay bulunmuştur (Şekil 4.25).

Beş yıllık hastalıksız sağ kalım PCR ile Notch protein düzeylerinde değişme olmayanlarda 53.67 ay, azalanlarda 65 ay, artanlarda ise 49.81 ay olarak izlendi (Şekil 4.26). Notch immunekspresyonu olan olgularda beş yıllık hastalıksız sağ kalım 39,28 ay, ekspresyon saptanmayan olgularda ise 61,38 ay bulunmuştur (Şekil 4.27).

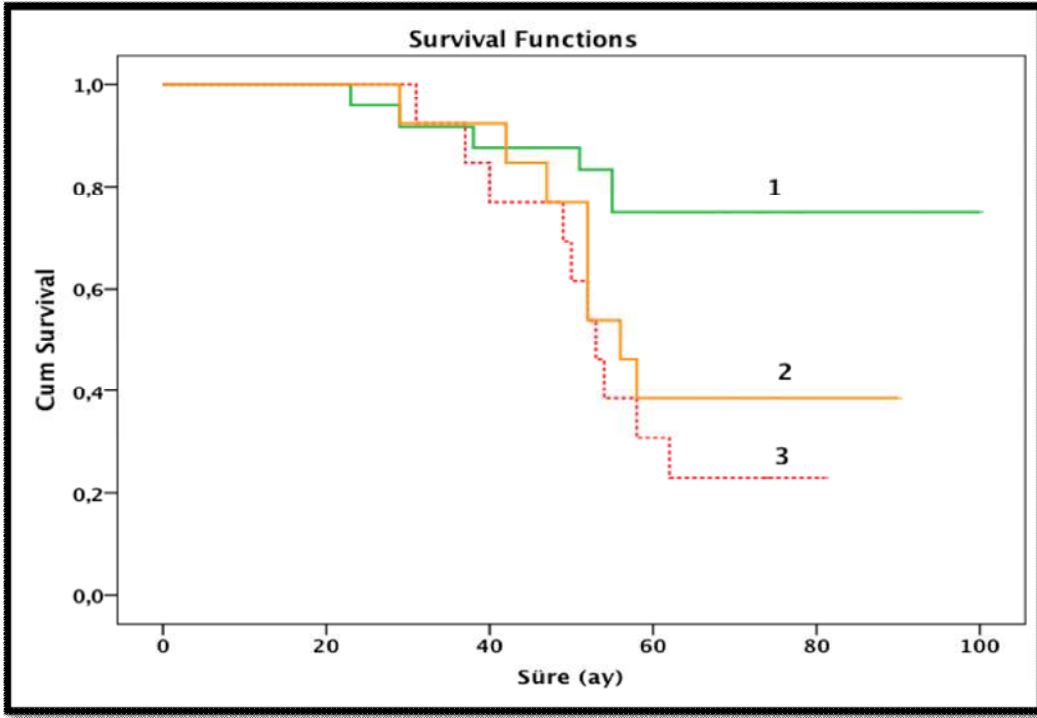
Beş yıllık hastalıksız sağ kalım PCR ile Numb protein düzeyi azalan olgularda 43,65 ay iken, Numb artışı olan olgularda 68,17 ay olarak saptandı (Şekil 4.28). Numb immunreaksiyonu olan olgularda 65,13 ay immunreaksiyon saptanmayanlarda ise 43,85 ay olarak belirlendi (Şekil 4.29).

Itch'in PCR ile protein düzeyi değişmeyenlerde beş yıllık hastalıksız sağ kalım 66.75 ay, azalanlarda ise 41.45 ay olarak izlendi (Şekil 4.30). Itch immun reaksiyon saptanan olgularda beş yıllık hastalıksız sağ kalım 67.15 ay saptanmayanlarda 46.27 ay olarak saptandı (Şekil 4.31).

Beş yıllık hastalıksız sağ kalım Siah-1 protein düzeyleri değişmeyenlerde 60.70 ay, azalanlarda 54.08 ay, artanlarda ise 38.93 ay bulundu (Şekil 4.32). Siah immunekspresyonu saptanan olgularda ise beş yıllık hastalıksız sağ kalım 42.23 ay, saptanmayan olgularda 62.24 ay olarak izlendi (Şekil 4.33).

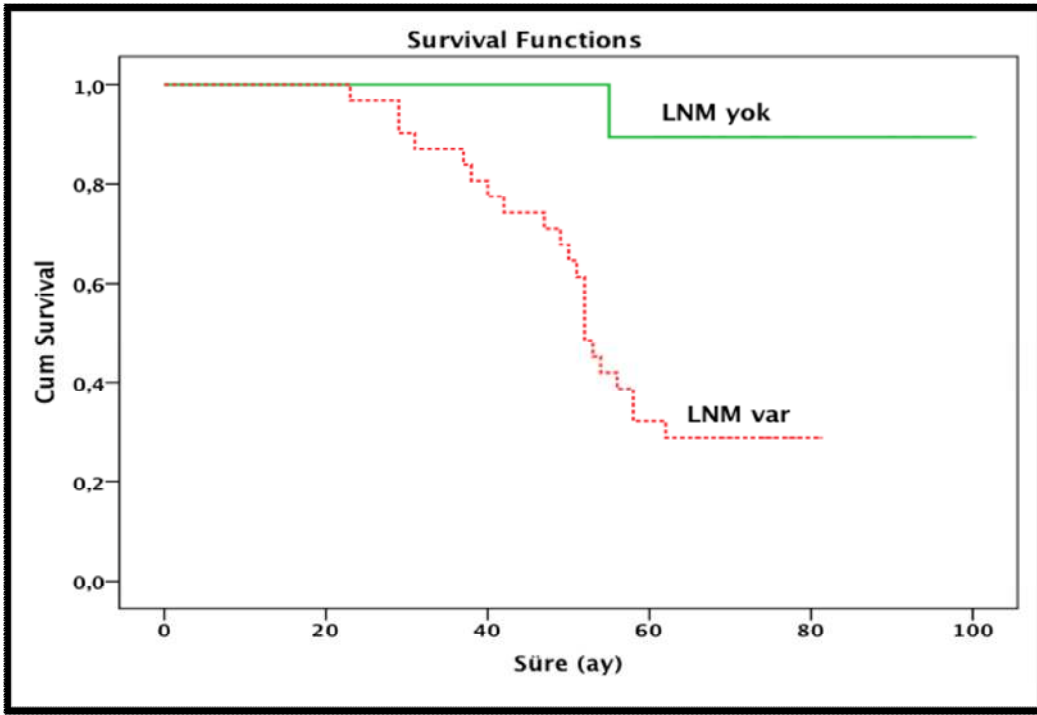
Diğer parametreler ile beş yıllık hastalıksız sağ kalım arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Log rank analizinde anlamlı bulunan parametreler çok değişkenli Cox regresyon analizi ile incelendiğinde lenf nodülü metastazının varlığı Notch ve Numb protein ekspresyonlarının bağımsız prognostik parametreler olduğu izlendi (Çizelge 4.33).

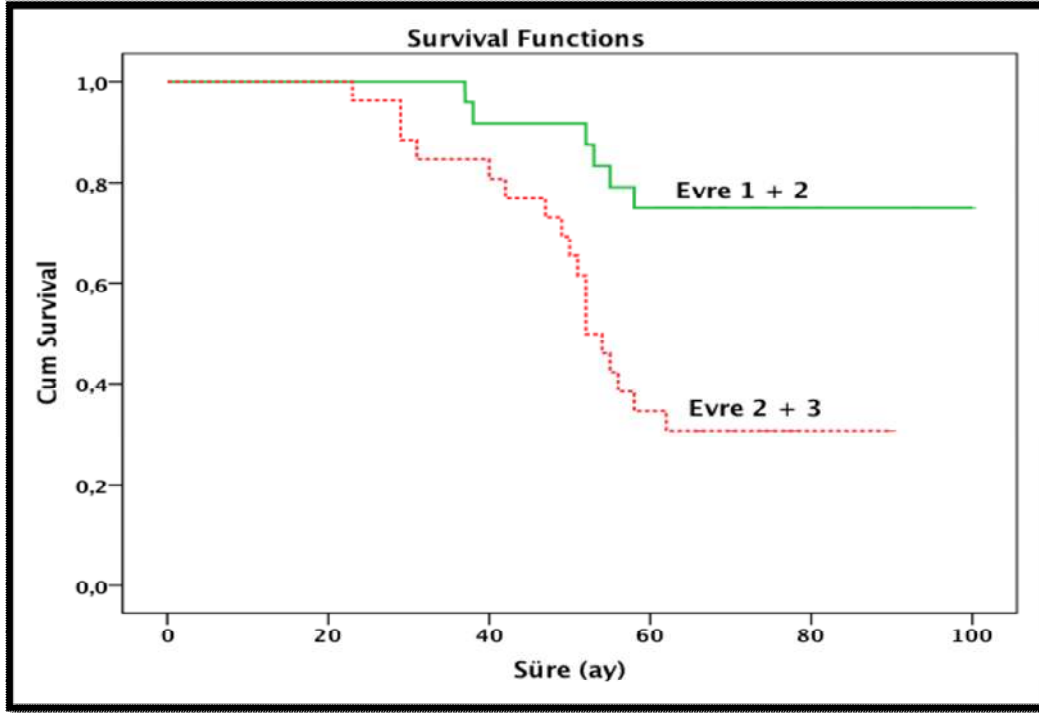


Şekil 4.23. Diferansiasyon ile beş yıllık hastalıksız sağkalım ilişkisi.

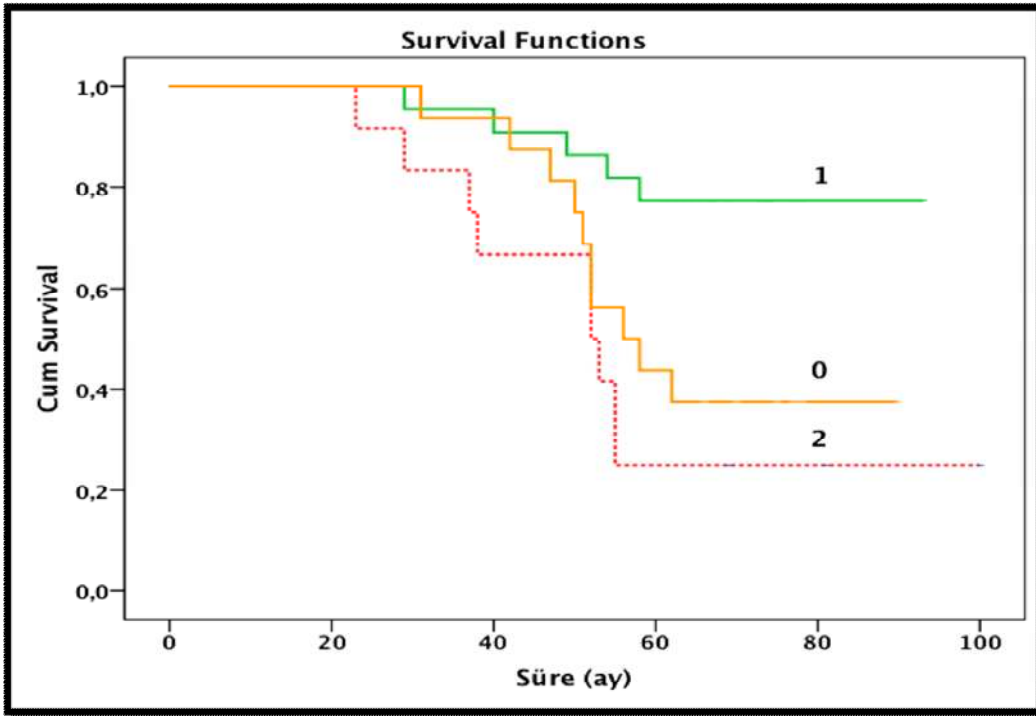
1: iyi diferansiye adenokarsinom, 2: orta derecede diferansiye adenokarsinom, 3: kötü diferansiye adenokarsinom



Şekil 4.24. Lenf nodu metastazı ile beş yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi.

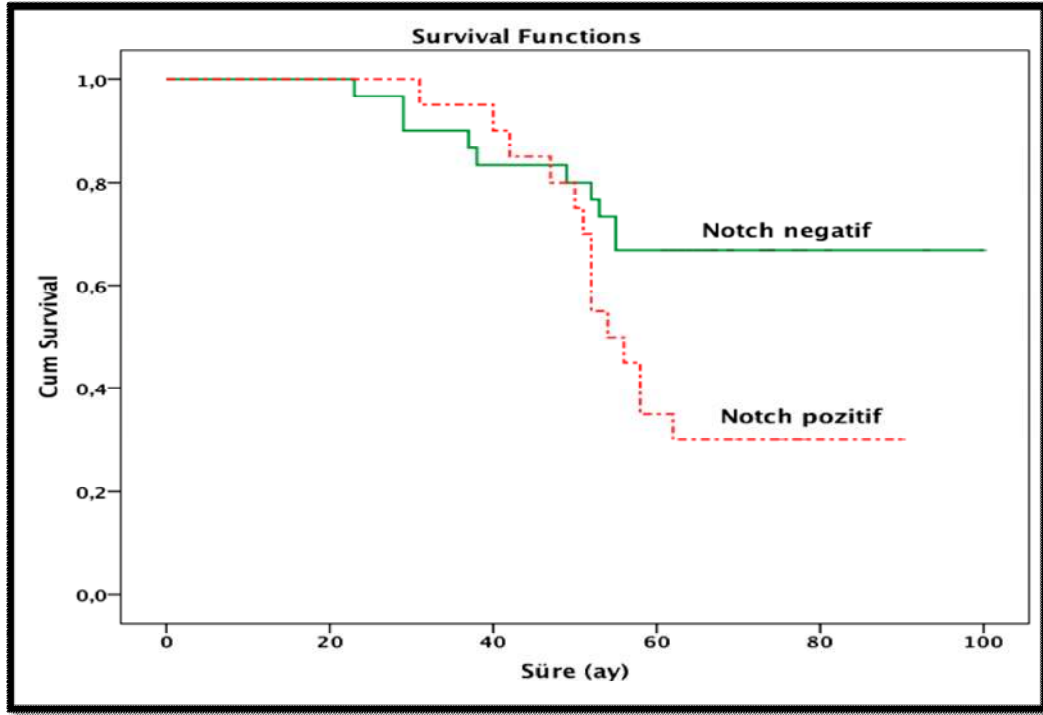


Şekil 4.25. Evre ile beş yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi.

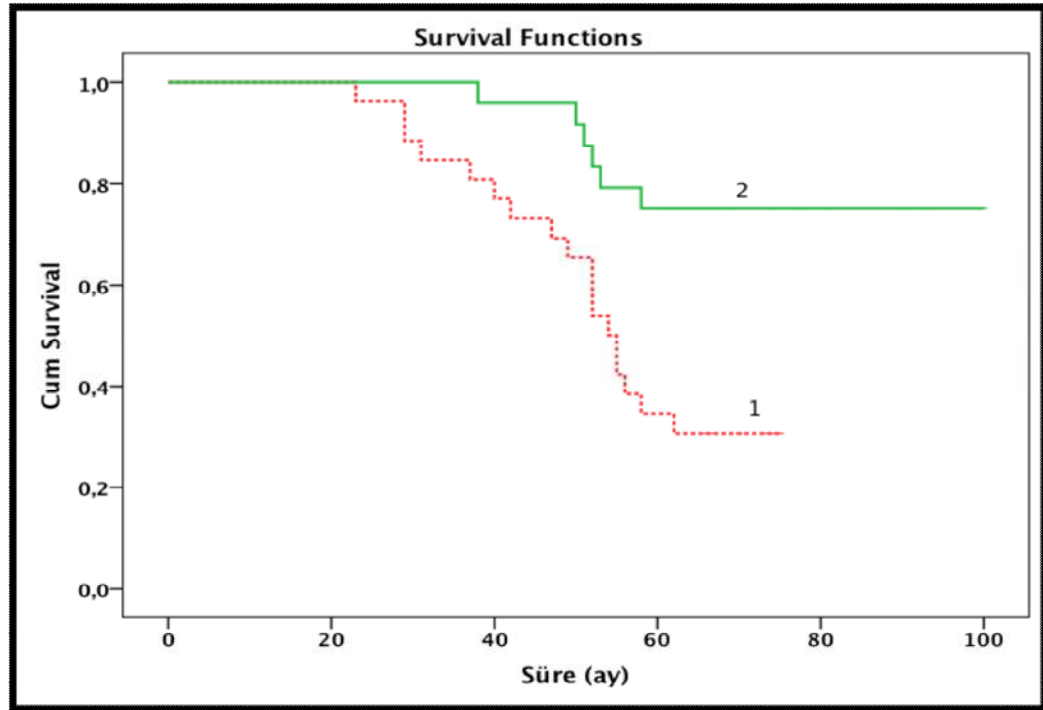


Şekil 4.26. Notch protein düzeyi ile beş yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi.

0: değişmemiş, 1: Notch protein düzeyi azalmış, 2: Notch protein düzeyi artmış

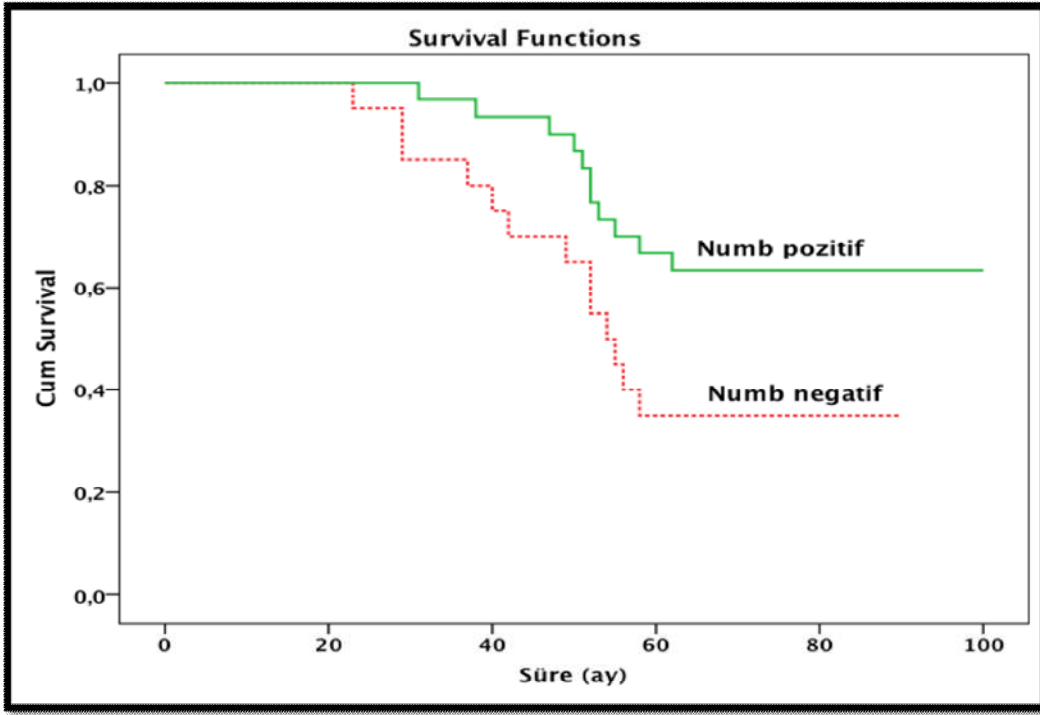


Şekil 4.27. Notch immünekspresyonu ile beş yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi.

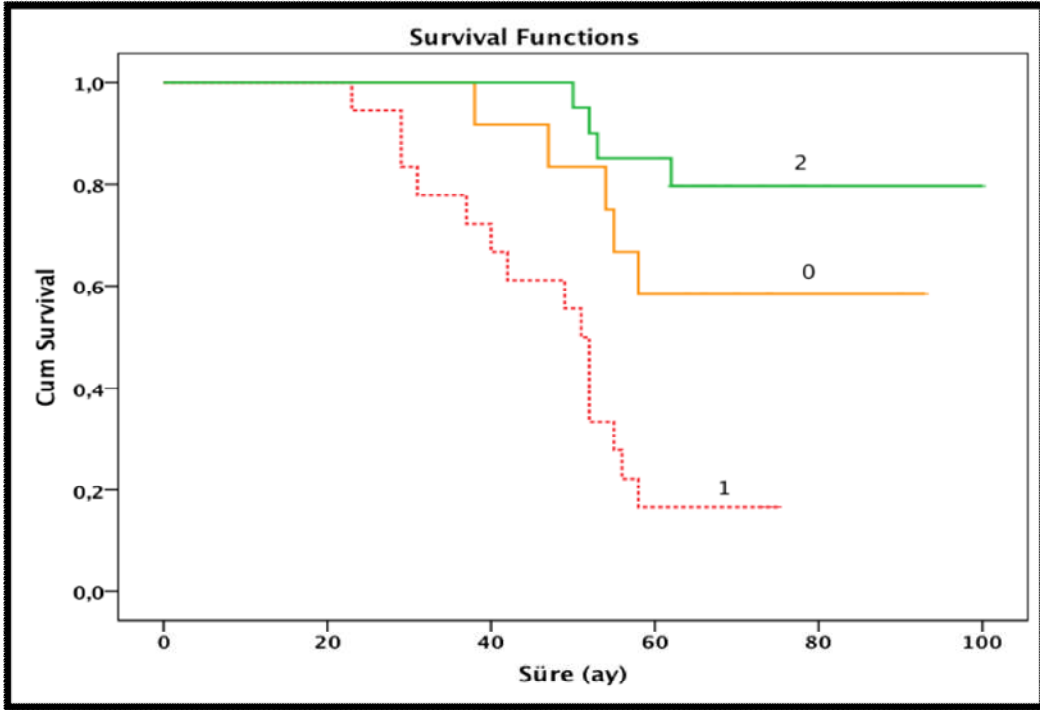


Şekil 4.28. Numb protein düzeyi ile beş yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi.

1: Numb protein düzeyi azalmış, 2: Numb protein düzeyi artmış

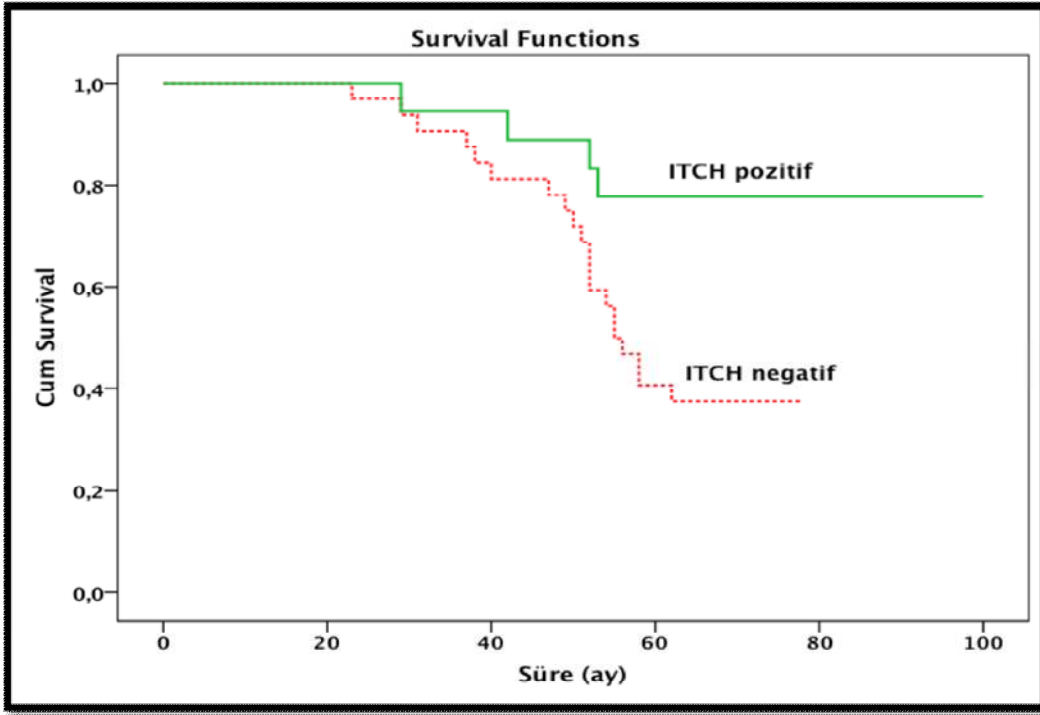


Şekil 4.29. Numb immunreaksiyonu ile beş yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi.

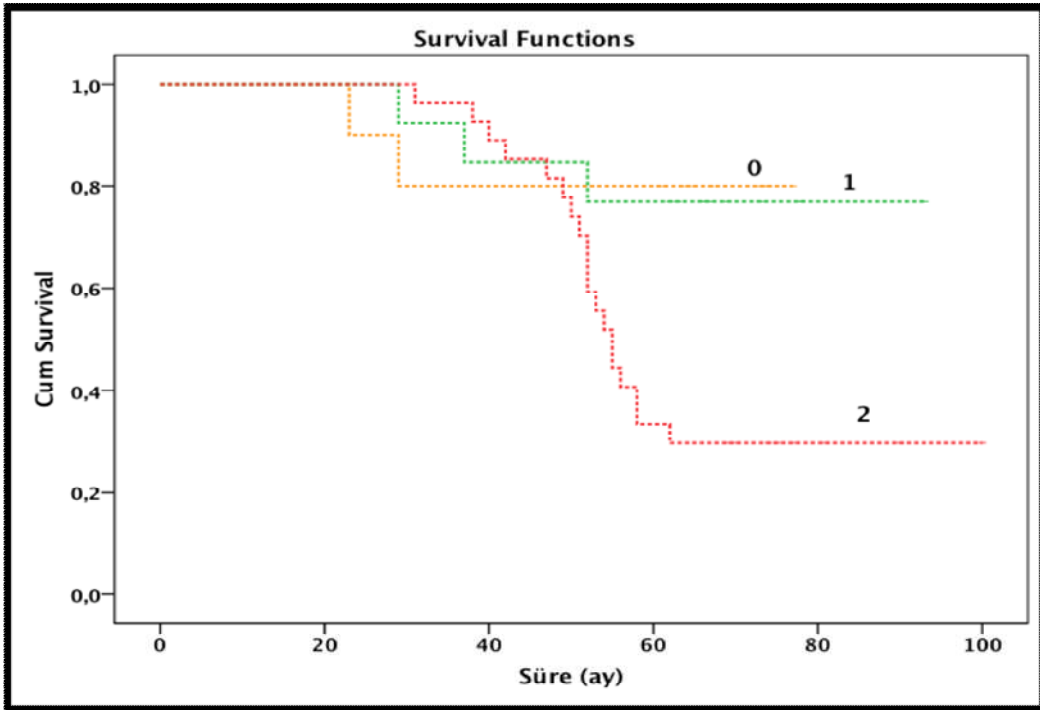


Şekil 4.30. Itch protein düzeyinin beş yıllık hastalıksız sağ kalım ilişkisi.

0: değişmemiş, 1: azalmış, 2: artmış

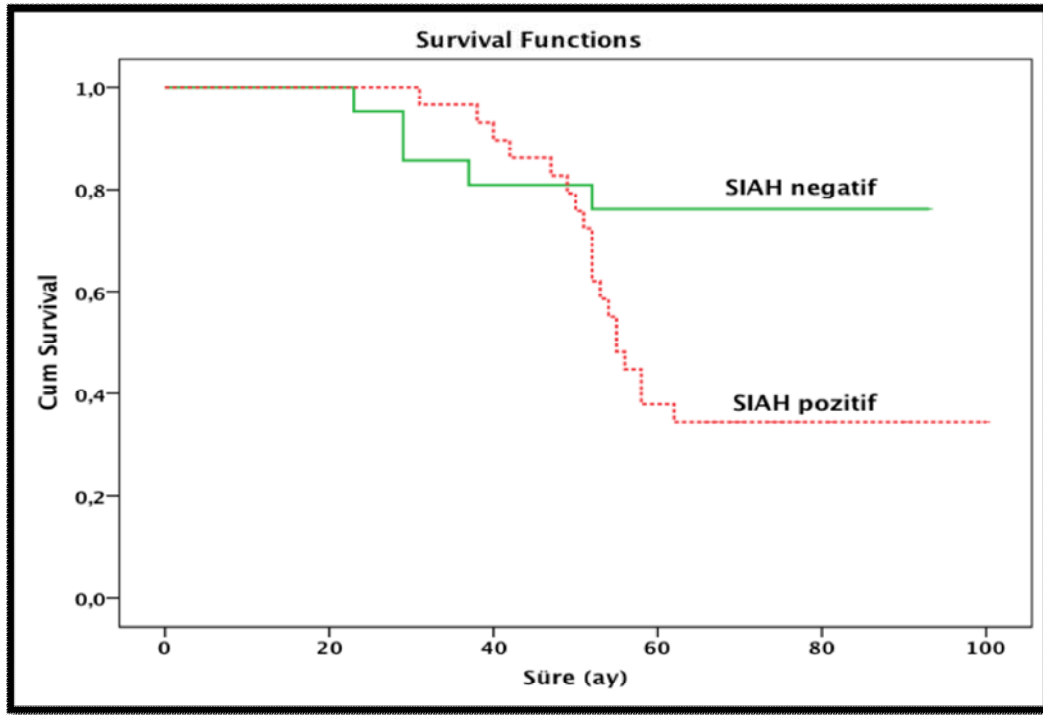


Şekil 4.31. Itch immunreaksiyonunun beş yıllık hastalıksız sağ kalım ile ilişkisi.



Şekil 4.32. Siah protein düzeyinin beş yıllık hastalıksız sağ kalım ile ilişkisi.

0: Siah protein düzeyi değişmemiş, 1: Siah protein düzeyi azalmış, 2: Siah protein düzeyi artmış



Şekil 4.33. Siah immunreaksiyonunun survey analizi ile ilişkisi.

Çizelge 4.15. Cox regresyon analizinde bağımsız prognostik faktörler.

PARAMETRE	Regresyon Katsayısı	P değeri	Relatif Risk
LNM	2,406	0.001	11,088
Notch PCR	1,579	0.03	3,677
Numb PCR	-1,166	0.01	0,561

5. TARTIŞMA

KRK 3. sıklıkta görülmesine ve çok sayıda tedavi seçenekleri olmasına rağmen, kanser ile ilişkili ölüm nedenleri arasında 4. sıradadır (1,2). Yeni tedavi rejimleri geliştirilmesine rağmen kolorektal kanserlerin yaklaşık %50'sinde rekürrens görülmektedir. Tümör rekürrensinden sorumlu primer neden kemoterapiye dirençli kanser kök hücreleri olduğu düşünülmektedir (6,7). Kolorektal kanserlerde çok sayıda kanser kök hücresi saptanmıştır. Bunlar arasında da Notch yolağı ve bu yolağın regülatörleri olan Numb, Itch ve Siah önemli yer tutmaktadır. Notch sinyalinin, kök hücrenin korunmasında, hücre kaderinin belirlenmesinde, diferansiasyonunda, proliferasyonunda önemli rolleri vardır (9,61,78). Notch normal barsak gelişiminde önemlidir ve kriptlerde saptanabilir (51,86). Barsaklarda Notch hedef geni olan Hes1 ekspresyonuna bağlı olarak amplifiye hücrenin absorbtif epitel mi yoksa sekretuar hücre mi olacağı belirlenir (87,88). Notch yolağının inhibisyonu ile proliferasyon kaybı ve goblet hücrelerine dönüşüm artarken; Notch overekspresyonu kriptlerde proliferasyona neden olur ve goblet hücrelerine dönüşüm azalır (10). Notch sinyalinin barsakta hem kaybı, hem de overekspresyonu karsinogenez açısından önemli olabilmektedir (10).

Bu çalışmada normal kolon mukozasında Notch protein düzeylerinde değişme saptanmamıştır. Bulgularımız Gao ve arkadaşlarının kolon normal mukozal epitelinde Notch1'in ve Jagged1'in ekspresyonunu izlememeleri ile uyumludur (54).

Bizim çalışmamızda adenomlarda Notch ekspresyonu artmış olarak izlenmiştir. Önceki deneysel çalışmalarda Apc mutant farelerin adenomlarında Notch ile ilişkili Hes1 aşırı ekspresyonu izlenirken, γ -sekretaz inhibitörlerinin adenomlarda goblet hücre diferansiasyonunu artırarak, adenom epitelinde proliferasyonu azalttığı gösterilmiştir (54,98,100). Ancak Notch yolağı ve regülatörlerinin adenomlarda ekspresyonlarının incelendiği yeterli çalışma mevcut değildir. Bu nedenle adenomlarda izlediğimiz bulguların ileride yapılacak çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca çalışmamızda; adenom tanılı hasta grubunda Notch protein düzeyinin normal dokuya oranla arttığı saptanırken, Numb, Itch ve Siah protein düzeylerinin azaldığı saptanmıştır. Bu bulgular Notch sinyal yolağında rolü olan Numb, Itch ve Siah-1'in karsinogenezde de etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Önceki bir çalışmada 65 kolorektal adenokarsinomlu hastanın tamamında immunohistokimyasal olarak Notch-1 ve Jagged1'in sitoplazmik ekspresyonunu

saptanmıştır (54). Yaptığımız çalışmada ise 50 kolorektal adenokarsinomlu hastada PCR ile Notch protein ekspresyonu olguların %44'ünde artmıştır ve immünohistokimyasal olarak olguların %64'ünde sitoplazmik pozitiflik saptanmıştır. Notch protein düzeylerinin normal doku ile karşılaştırıldığı zaman adenom ve karsinom olgularında istatistiksel olarak anlamlı arttığı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda immünohistokimyasal olarak normal kolon mukozasında Notch1 ekspresyonu saptanmazken tümörün grade'i arttıkça boyanma oranı ve şiddeti artmıştır (98,101). Bizim çalışmamızda da kötü diferansiye adenokarsinom olgularında anlamlı olarak Notch protein düzeylerinde artış mevcuttur. Ayrıca ileri evre KRK hastalarda da Notch protein ekspresyonunun arttığı saptanmıştır.

Reedijk ve arkadaşları kolorektal kanserlerde Hes1 mRNA seviyesini ve Notch aktivasyonunun hastalığın seyri ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (99). Bizim çalışmamızda da adenokarsinom tanılı hastalarda Notch negatif hastaların pozitif olanlara göre daha uzun survivala sahip oldukları saptanmıştır.

Qiao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da KRK hastalarda Notch ligandlarından jagged1 ekspresyonunun primer KRK hastalarda, metastatik KRK hastalardan daha yüksek olduğu not edilmiştir (54,99). Bizim çalışmamızda Notch ekspresyonu ile uzak metastaz arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar izlenmese de lenf nodu metastazı ile arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu bulgular Notch'un KRK'in metastatik potansiyeli ile ilişkili olduğunu desteklemektedir.

Numb; meme, akciğer, testis, tükrük bezi gibi birçok erişkin dokuda eksprese olmaktadır (12,105). Numb farelerin barsağında villus kript aksında saptanmıştır ve intestinal epitel hücrelerinde Notch yolağını inhibe ederek goblet hücrelerine dönüşümünde rol almaktadır (105). Numb ayrıca intestinal hücrelerde müsin sekresyonunu artırır ve epitel bariyerinin bütünlüğünün korunmasına yardımcı olmaktadır (12,105,110). Meng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kolon kanserli hastalarda Notch-1 ekspresyonu saptanırken Nocth yolağının negatif regülatörü olan Numb düzeylerinin azaldığı bulunmuştur (105). Bizim çalışmamızda adenomlarda ve karsinomlarda Numb protein düzeyleri azalmış olarak saptanmıştır. Tümör diferansiasyonu azaldıkça Numb protein düzeylerinde de azalma saptanmıştır. Lenf nodu metastazı saptanan olgularda Numb protein düzeyinde azalma bulunmuştur. Yüksek evreli KRK hastalarda da Numb düzeylerinde azalma saptanmıştır. Numb pozitif olan vakalarda 5 yıllık hastalıksız sağ kalım Numb negatif olanlara göre daha yüksek

saptanmıştır. Numb; Notch yolağının önemli negatif regülatörlerinden biridir ve bizim hipotezimize göre normal mukozadan adenokarsinoma doğru ilerledikçe Numb düzeylerinde azalma, Notch düzeylerinde artış beklenmektedir. Yaptığımız çalışmada da Numb ile Notch proteini ters korele olarak bulunmuş ve adenokarsinomlarda Numb düzeyi azalmıştır.

Itch bir E3 ubiquitin ligazdır ve önemli ileti yolaklarında görev almaktadır. Notch yolağının regülatörlerinden biridir (124). Itch Numb proteininin aktivitesini düzenler ve Notch seviyesini azaltır (12,125,127). Kolonda henüz Itch ile yapılmış çalışma mevcut değildir. Bizim çalışmamızda Itch seviyesi kolon mukozasında değişmemiş olarak saptanmıştır. Adenomlarda Itch seviyesi Numb ile birlikte azalırken, Notch ile arasında ters ilişki mevcuttur. Itch düzeyi adenokarsinomlu vakalarda ise azalmış olarak saptanmıştır. Ayrıca adenokarsinomda tümör diferansiasyonu arttıkça Itch düzeyleri azalmaktadır. Yine lenf nodu metastazı olmayan hastalarda Itch düzeylerinde artış izlenmiştir. Erken evre olgularda Itch düzeyi yüksek iken, ileri evreli hastalarda Itch düzeyi azalmıştır. Itch seviyeleri artan hasta grubunda beş yıllık hastalıksız sağ kalımın daha uzun olduğu belirlenmiştir.

Notch sinyal yolağının düzenleyicilerden biri de Siah-1'dir. Ancak Siah Numb aracılığı ile Notch sinyal yolağını düzenlemektedir (12). Siah-1 Numb degradasyonuna yol açar ve bu da sitoplazma ve nukleustaki Notch'un endojen hücre yüzeyine dağılmasına neden olur. Böylelikle Notch ilişkili transkripsiyonel aktivite arttırılmış olur (12,109,121). Bilgilerimize göre Siah-1 ve KKK ile yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda kolon mukozasında Siah-1 seviyesinde değişme saptanmamıştır. Adenom vakalarında ise Siah-1 protein düzeylerinde azalma saptanmıştır. KKK'lu vakalarda Siah-1 protein ekspresyonunda artış saptanmıştır. Siah-1 ekspresyonu kötü diferansiye tümörlerde daha fazladır. Lenf nodu metastazı olan hasta grubunda Siah-1 seviyelerinde artış saptanmıştır. Siah-1 ekspresyonu izlenmeyen veya azalmış olan olgularda beş yıllık hastalıksız sağ kalım daha uzundur.

6. SONUÇLAR

Çalışmaya 2005-2009 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 50 (elli) adet kolon rezeksiyon materyalleri ile adenokarsinom tanısı almış, 30(otuz) adet adenom tanısı almış ve 20 adet normal kolon mukoza örneklerinden oluşan toplam 100 adet olgu incelenmiştir.

1. Notch ekspresyonunun (PCR ve immünohistokimyasal) adenomlarda ve kolorektal adenokarsinomlarda yükseldiği saptanmıştır.
2. Notch'un immünohistokimyasal olarak boyanma şiddeti ve lokalizasyonunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi saptanmamıştır.
3. Notch ekspresyon artışı (PCR ve immünohistokimyasal); diferansiasyon kaybı olan, lenf nodu metastazı izlenen, ileri evre tümörlerde daha fazla görülmüştür.
4. Notch ekspresyonu (PCR ve immünohistokimyasal) düzeyi arttıkça 5 yıllık hastalıksız sağ kalım azalmıştır.
5. Numb ekspresyonunun (PCR ve immünohistokimyasal) adenomlarda ve kolorektal adenokarsinomlarda azaldığı saptanmıştır.
6. Numb proteininin immünohistokimyasal olarak boyanma şiddeti ve lokalizasyonunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi saptanmamıştır.
7. Numb ekspresyonunun (PCR ve immünohistokimyasal) azalması; diferansiasyon kaybı olan, lenf nodu metastazı izlenen, ileri evre tümörlerde daha fazla görülmüştür.
8. Numb ekspresyonunun (PCR ve immünohistokimyasal) düzeyi arttıkça 5 yıllık hastalıksız sağ kalım artmıştır.
9. Itch protein ekspresyonu (PCR ve immünohistokimyasal) adenom ve karsinom vakalarında azalmış olarak saptanmıştır.
10. Itch immünohistokimyasal olarak boyanma şiddeti ve lokalizasyonunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi saptanmamıştır.
11. Itch proteinin azalması; diferansiasyonun kaybı olan, lenf nodu metastazı izlenen, ileri evre tümörlerde daha fazla görülmüştür.
12. Itch ekspresyon (PCR ve immünohistokimyasal) düzeyi azaldıkça 5 yıllık hastalıksız sağ kalım azalmıştır.
13. Siah-1 ekspresyonunun (PCR ve immünohistokimyasal) adenomlarda ekspresyonu azalırken; adenokarsinom olgularında arttığı saptanmıştır.

14. Siah-1 proteininin immunohistokimyasal olarak boyanma şiddeti ve lokalizasyonunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi saptanmamıştır.
15. Siah-1 protein artışı; diferansiasyonun kaybı olan, lenf nodu metastazı izlenen tümörlerde daha fazla görülmüştür.
16. Siah-1 ekspresyonunun (PCR ve immünohistokimyasal) düzeyi arttıkça 5 yıllık hastalıksız yaşam süresi azalmıştır.
17. Çalışma grubumuzda lenf nodülü metastazı, Notch ve Numb protein ekspresyonu bağımsız prognostik faktörler olarak belirlenmiştir.
18. Notch karsinogenez ve tümör progresyonunda rol oynar. Numb, Itch ve Siah-1 Notch'un bu etkisinin düzenlenmesinde rol oynuyor olabilir.

7. ÖZET

Kolorektal Adenom ve Karsinomlarda Kök Hücre Faktörleri Olan Notch, Numb, Itch ve Siah-1'in Birbirleri ve Klinikopatolojik Parametreler ile İlişkilerinin Gösterilmesi

Kolorektal karsinomlar gastrointestinal sistemin en sık rastlanan tümörleridir ve kanser ile ilişkili ölüm nedenleri arasında 4. sıradadır. Tümör rekürrensinden sorumlu primer neden kemoterapiye dirençli kanser kök hücreleri olduğu düşünülmektedir. Kanser kök hücrelerine bağlı oluşan direncin ortadan kaldırılarak kanserin tedavi edilmesini hedefleyen çalışmalar giderek artmaktadır. Kanser kök hücrelerindeki en önemli yolaklardan biri de Notch yoluğadır. Anormal Notch sinyali karsinogeneizde hücrelerin kendi kendini yenilemesine ve normal kök hücrelerin regölasyonunun bozulmasına neden olur. Notch sinyali birçok kanser türünde saptanmıştır. Notch sinyali kanser hücrelerinin büyümesinde, invazyonunda ve metastazında etkili bulunmuştur. Bundan yola çıkılarak Notch sinyal inaktivasyonunun kanser tedavisinde kullanılabileceğı öne sürölmüştür.

Bu çalışmaya 2005-2009 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Faköltesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 50 adet adenokarsinom tanısı almış, 30 adet adenom tanısı almış ve 20 adet normal kolon mukoza örneklerinden oluşan toplam 100 adet olgu dahil edilmiştir. Her bir vaka Notch, Numb, Itch ve Siah ile immunohistokimya ve rt-PCR ile incelendi. Kolon adenokarsinom olguları; yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, tümör grade, patolojik evre, pTNM evrelemesi, lenf nodu metastazı, lenfovasküler, perinöral invazyon ve klinikopatolojik parametrelerine göre değerlendirildi. Çalışmamızda Notch ekspresyonu ile tümör diferansiasyonu (p: 0.001) ve survival (p:0,001) arasında zıt korelasyon, lenf nodu metastazı (p:0,001) ve evre (p:0,005) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı. Kolon adenokarsinomlarında spearman korelasyon testine göre Notch protein ekspresyonunun artışı; Siah ile pozitif korele iken, Itch ve Numb ile zıt koreledir.

Sonuç olarak; normal doku ile karşılaştırıldığında kolon karsinomunda Notch ve Siah protein ekspresyon artışı saptanırken, Numb ve Itch protein düzeylerinde azalma bulunmuştur. Notch'un kolon karsinomu gelişiminde önemli bir yolak olduğu ve tümörün artan agresivitesi ve kötü prognozuyla da ilişkili olduğu bulunmuştur. Kolon

kanser tedavilerinde Notch yolağının hedeflenmesi, tümör metastazının değerlendirilmesi ve sağkalımın uzatılması açısından önemlidir.

Anahtar kelimeler: Kolorektal karsinom, Notch, Numb, Itch, Siah, immunohistokimya.

8. ABSTRACT

Demonstration of Associations Among Notch, Numb, Itch And Siah-1 (Stem Cell Factors) Expression and Their Relations with Clinicopathological Parameters in Colorectal Adenomas and Carcinomas

Colorectal carcinoma is the most frequent tumor of the gastrointestinal system, and ranks 4th among cancer related deaths. Chemotherapy resistant cancer stem cells are considered to be the primary cause of tumor recurrence. Studies aiming to treat cancer by eliminating the resistance caused by cancer stem cell are reported increasingly. One of the most important pathway in the cancer stem cell is the Notch pathway. Abnormal Notch signaling causes cellular self-renewal in carcinogenesis and disruption of regulation of normal stem cells. Notch signaling has been detected in many types of cancer and have been found to be effective in growth, invasion and metastasis of cancer cells. Consequently, Notch signal inactivation has been proposed as a candidate for use in cancer treatment.

The expression of Notch, Numb, Itch and Siah-1 were investigated in 50 colorectal carcinomas (CRC), 30 adenomas and 20 normal colonic tissues both by immunohistochemistry and RT-PCR analysis.

Colonic adenocarcinoma cases were evaluated for age, sex, localization of tumor, tumor size, tumor grade, pathological stage, pTNM staging, lymph node metastasis, lymphovascular and perineural invasion and clinicopathological parameters. In our study, an inverse correlation between tumor differentiation (p: 0.001) and survival (p: 0.001); and a statistically significant positive correlation between lymph node metastasis (p: 0.001) and stage (p:0.005) were found. According to Spearman correlation test, Notch protein expression in colon adenocarcinomas was positively correlated with Siah, and inversely correlated with Itch and Numb.

In conclusion; in colonic carcinomas, compared to normal tissues, Notch and Siah protein expression was found to be increased whereas Numb and Itch protein levels were decreased. Notch was found to be an important pathway in colon cancer formation, and was also found to be associated with increasing aggressiveness of the tumor and bad

prognosis. Targeting Notch pathway for treatment of colon cancer is important for evaluation of tumor metastases and prolonging survival.

Key words: Colorectal carcinoma, Notch, Numb, Itch, Siah, immunohistochemistry.

9. KAYNAKLAR

- 1) Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300.
- 2) Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361: 2449-60.
- 3) Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept, *J Clin Invest* 2010; 120: 41-50.
- 4) Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
- 5) Wu XZ. Origin of cancer stem cells: the role of self-renewal and differentiation. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 407-14.
- 6) Roy S, Majumdar AP. Signaling in colon cancer stem cells. *J Mol Signal* 2012; 7: 11.
- 7) Ricci-Vitiani L, Fabrizi E, Palio E, De Maria R. Colon cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87: 1097-104.
- 8) Öktem G, Uslu S, Uysal A, Bilir A, Ayla Ş, Soner BC, Çal Ç. Kanser Kök Hücreleri ve Notch Yolağında Umut Veren Ortak Embriyonik Dönem inhibisyonu. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2009; 40(1): 23-7.
- 9) Wang Z, Li Y, Banerjee S, Sarkar FH. Emerging role of Notch in stem cells and cancer. *Cancer Lett* 2009; 279: 8-12.
- 10) Perdigoto CN, Bardin AJ. Sending the right signal: Notch and stem cells. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 2307-22.
- 11) O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106-10.
- 12) Pece S, Confalonieri S, Romano P, Di Fiore PP. NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1815: 26-43.
- 13) Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 10158-63.
- 14) Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 2009; 69: 3382-9.
- 15) Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6414-8.
- 16) Reedijk M, Odorcic S, Zhang H, Chetty R, Tennert C, Dickson BC, et al. Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma. *Int J Oncol* 2008; 33: 1223-9.
- 17) Buğra D. Kolon Anatomisi. Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D (Editörler). *Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları İstanbul: Türk Kolon ve Rektum Cerrahi Derneği* 2003; 21-30.

- 18) Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Listrom MB. Gastrointestinal Pathology an Atlas and Text. In: Fenoglio-Presier CM. The Normal Anatomy of the Colon, Nonneoplastic Lesions of the Colon, Carcinomas and other Epithelial and Neuroendocrine Tumours of the Large Intestine. 2th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1999; 747-61.
- 19) Harpaz N, Saxena R. Modern Surgical Pathology. In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM. Gastrointestinal Tract, Large Intestine. Vol 1, 1st ed: Saunders 2003; 749-852.
- 20) Bozfakioğlu Y, Müslümanoğlu M. Cerrahi Gastroenteroloji. Edit. Değerli Ü, Bozfakioğlu Y. Kolon Hastalıkları. 4. baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 1997; 142-68.
- 21) TC Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı Yayın No:582 Ankara.
- 22) Owen DA. Alimentary Canal and Associated Organs. D.Carter, JK Greenson, HA Oberman, V Reuter, MH Stoler, S Emills. eds. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, Philadelphia, USA Lippincott Williams Wilkins 2004; 1368-432.
- 23) Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Female Reproductive System 10th Ed. A Times Mirror Company, Mosby 2011; 731-810.
- 24) Bosman FT, Carnerio F, Hruban RH. World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System, IARC Press, Lyon, France 2010; 131-81.
- 25) Kumar, Abbas, Fausto. The female genital tract. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed, China: Elsevier Saunders 2005; 797-892.
- 26) Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A. Imlications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. Nat Rev Clin Oncol 2009; 6: 519-27.
- 27) Rex DK, Johnson DA, Anderson JC. American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening. Am J Gastroenterol 2009; 104(3): 739-50.
- 28) Greenson JK, Huang SC, Herron C, Moreno V. Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. Am J Surg Pathol 2009; 33: 126-33.
- 29) Kirchner T, Reu S. Development of molecular-pathologic entities of colorectal Cancer. Pathologie 2008; 29(2): 264-69.
- 30) Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. Histopathology 2007; 50: 113-30.
- 31) Makinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. Histopathology 2007; 50: 131-50.
- 32) Chirieac LR, Shen L, Catalano PJ, Issa JP, Hamilton Sr. Phenotype of microsatellite-stable colorectal carcinomas with CpG Island methylation. AM J Surg Pathol 2005; 29: 429-36.
- 33) Hisamori S, Nagayama S, Kita S, Kawamura J. Rapid progression of submucosal invasive micropapillary carcinoma of the colon in progressive systemic sclerosis: report of a case. Jpn J Clin Oncol 2009; 39: 399-405.
- 34) Lebe B, Küpelioğlu A. Kolorektal adenomlardaki HGM ve MUC2 müsin değişikliklerinin immünohistokimyasal yöntemle araştırılması ve karsinom gelişimindeki rolü (54 olgu). Türk Patoloji Dergisi 2001; 17(1-2): 38-42.

- 35) Galon J, Costes A, Sanchez- Cabo F, Kirilovsky A. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960-4.
- 36) Puppa G, Maisonneuve P, Sonzogni A. Pathological Assessment of pericolonic tumor deposits in advanced colonic carcinoma: relevance to prognosis and tumor staging. *Mod Pathol* 2007; 20: 843-55.
- 37) Puppa G, Caneva A, Colombari R. Venous invasion detection in colorectal cancer: which technique?. *J Clin Pathol* 2009; 62: 102-3.
- 38) Leopoldo S, Lorena B, Cinzia A, Gabriella DC, Angela LB, Renato C, et al. Two subtypes of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: clinicopathological and genetic features. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1429-39.
- 39) Sharifi N, Ghaffarzadegan K, Ayatollahi H. Evaluation of Angiogenesis in Colorectal Carcinoma by CD34 Immunohistochemistry Method and its Correlation with Clinicopathologic Parameters. *Acta Medica Iranica* 2009; 47(3): 161-4.
- 40) Govindarajan A, Baxter NN. Lymph node Evaluation in early-stage colon cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2008; 7: 240-6.
- 41) Walther A, Houlston R, Tomlinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. a metaanalysis. *Gut* 2008; 57: 941-50.
- 42) Burgart LJ. Colorectal polyps and other precursor lesions; need for an expanded view. *Gastroenterol Clin N Am* 2000; 31(4): 959-70.
- 43) Jass JR. Gastrointestinal polyposis. Clinical, pathological and molecular features. *Gastroenterol Clin North Am* 2007; 36: 927-46.
- 44) Cho NL, Redston M, Zabuer AG, Carothers AM. Aberrant crypt foci in the adenoma prevention with celecoxib trial. *Cancer Prev Res* 2008; 1: 21-31.
- 45) Leslie A, Carey F.A, Partt NR. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *RJC British Journal of Surgery* 2002; 89(7): 845-60.
- 46) Lievre A, Laurent-Puig P. Genetics: Predictive value of KRAS mutations in chemoresistant CRC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 306-7.
- 47) Zaanen A, Cuilliere-Dartigues P, Guilloux A. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann Oncol* 2010; 21(4): 772-80.
- 48) Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008; 29: 673-80.
- 49) Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009; 58: 90-6.
- 50) Kakarala M, Wicha MS. Cancer Stem Cells: Implications for Cancer Treatment and Prevention. *The Cancer Journal* 2007; 13: 271-5.

- 51) Miyamoto S, Rosenberg DW. Role of Notch signaling in colon homeostasis and carcinogenesis. *Cancer Sci* 2011; 102: 1938-42.
- 52) Li L, Neaves WB. Normal Stem Cells and Cancer Stem Cells: The Niche Matters. *Cancer Res* 2006; 66: 4553-7.
- 53) Ohlstein B, Spradling A. Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science* 2007; 315: 988-92.
- 54) Gao J, Liu J, Fan D, Xua H, Xiong Y, Wang Y et al. Up-regulated expression of Notch1 and Jagged1 in human colon adenocarcinoma. *Pathologie Biologie* 2011; 59: 298–302.
- 55) Wang Z, Li Y, Sarkar FH. Notch signaling proteins: legitimate targets for cancer therapy. *Curr Protein Pept Sci* 2010; 11: 398-408.
- 56) Chillakuria CR, Sheppardb D, Leab SM, Handforda PA. Notch receptor–ligand binding and activation: Insights from molecular studies. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2012; 23: 421-8.
- 57) Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, Just U. The Notch signaling pathway: Molecular basis of cell context dependency. *European Journal of Cell Biology* 2011; 90: 572–81.
- 58) Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 678-89.
- 59) Axelson H. Notch signaling and cancer: emerging complexity. *Seminars in Cancer Biology* 2004; 14: 317–9.
- 60) Nam Y, Aster JC, Blacklow SC. Notch signaling as a therapeutic target. *Current Opinion in Chemical Biology* 2002; 6: 501–9.
- 61) Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(10): 756-67.
- 62) Sjölund J, Manetopoulos C, Stockhausen MT, Axelson H. The Notch pathway in cancer: Differentiation gone awry. *European Journal of Cancer* 2005; 41: 2620–9.
- 63) Baron M. An overview of the Notch signaling pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2003; 14: 113–9.
- 64) Bray SJ. Notch signaling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 678-89.
- 65) Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D, Carcangiu ML, Banks A, et al. Human Ligands of the Notch Receptor. *American Journal of Pathology* 1999; 154: 785–94.
- 66) Kadesch T. Notch Signaling: A Dance of Proteins Changing Partners. *Experimental Cell Research* 2000; 260: 1–8.
- 67) Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* 2011; 138: 3593-612.
- 68) Wu L, Griffin JD. Modulation of Notch signaling by mastermind-like (MAML) transcriptional co-activators and their involvement in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 348-56.

- 69) Schweisguth F. Regulation of Notch Signaling Activity. *Current Biology* 2004; 14: 129–38.
- 70) Roy M, Pear WS, Aster JC. The multifaceted role of Notch in cancer. *Current Opinion in Genetics Development* 2007; 17: 52–9.
- 71) Brou C. Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands. *Experimental Cell Research* 2009; 315: 1549-55.
- 72) Wang Z, Li Y, Banerjee S, Sarkar FH. Exploitation of the Notch signaling pathway as a novel target for cancer therapy. *Anticancer Res* 2008; 28: 3621-30.
- 73) Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO Journal* 2001; 20: 3427-36.
- 74) Borggrefe T, Oswald F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 1631-46.
- 75) Chen Y, Fischer WF, Gill GN. Regulation of the ERBB-2 Promoter by RBPJk and NOTCH. *J Biol Chem* 1997; 272: 14110-4.
- 76) Oswald F, Liptay S, Adler G, Schmid RM. NF-kB2 Is a Putative Target Gene of Activated Notch-1 via RBP-Jk. *Molecular and Cellular Biology* 1998; 18: 2077–88.
- 77) Hansson EM, Lendahl U, Chapman G. Notch signaling in development and disease. *Seminars in Cancer Biology* 2004; 14: 320–8.
- 78) Mumm JS, Kopan R. Notch Signaling: From the Outside In. *Developmental Biology* 2000; 228: 151–65.
- 79) Fortini ME, Bilder D. Endocytic regulation of Notch signaling. *Current Opinion in Genetics Development* 2009; 19: 323–8.
- 80) Bolós V, Blanco M, Medina V, Aparicio G, Díaz-Prado S, Grande E. Notch signalling in cancer stem cells. *Clin Transl Oncol* 2009; 11: 11-9.
- 81) Kandachar V, Roegiers F. Endocytosis and control of Notch signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2012; 24: 534-40.
- 82) Ingrid E, Lucio M. Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 2013; 139: 95–110.
- 83) McGill MA, McGlade CJ. Mammalian Numb Proteins Promote Notch1 Receptor Ubiquitination and Degradation of the Notch1 Intracellular Domain. *J Biol Chem* 2003; 278: 23196-203.
- 84) Allen TD, Rodriguez EM, Jones KD, Bishop JM. Activated Notch1 induces lung adenomas in mice and cooperates with Myc in the generation of lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2011; 71(18): 6010-8.
- 85) Akiyoshi T, Nakamura M, Yanai K, Nagai S, Wada J, Koga K, et al. Gamma-secretase inhibitors enhance taxane-induced mitotic arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 131-44.

- 86) Ghaleb AM, Aggarwal G, Bialkowska AB, Nandan MO, Yang VW. Notch Inhibits Expression of the Krüppel-Like Factor 4 Tumor Suppressor in the Intestinal Epithelium. *Mol Cancer Res* 2008; 6(12): 1920–7.
- 87) Katoh M, Katoh M. Notch signaling in gastrointestinal tract. *International Journal of Oncology* 2007; 30: 247-51.
- 88) Koch U, Lehal R, Radtke F. Stem cells living with a Notch. *Development* 2013; 140(4): 689-704.
- 89) Fre S, Pallavi SK, Huyghe M, Laé M, Janssen KP, Robine S, et al. Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 6309-14.
- 90) Sikandar SS, Pate KT, Anderson S, Dizon D, Edwards RA, Waterman ML, Lipkin SM. NOTCH signaling is required for formation and self-renewal of tumor-initiating cells and for repression of secretory cell differentiation in colon cancer. *Cancer Res* 2010; 70: 1469-78.
- 91) Li JL, Harris AL. Notch signaling from tumor cells: A new mechanism of angiogenesis. *Cancer Cell* 2005; 8(1): 1-3.
- 92) Dufraigne J, Funahashi Y, Kitajewski J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene* 2008; 27: 5132–7.
- 93) Garcia A, Kandel JJ. Notch: A key regulator of tumor angiogenesis and metastasis. *Histol Histopathol* 2012; 27(2): 151–6.
- 94) Sonoshita M, Aoki M, Fuwa H, Aoki K, Hosogi H, Sakai Y, et al. Suppression of Colon Cancer Metastasis by Aes through Inhibition of Notch Signaling. *Cancer Cell* 2011; 19: 125–37.
- 95) Christofori G. Metastatic Colon Cancer Cells Negotiate the Intravasation Notch. *Cancer Cell* 2011; 19: 6-8.
- 96) Dotto GP. Notch tumor suppressor function. *Oncogene* 2008; 27(38): 5115–23.
- 97) Brennan K, Brown AMC. Is there a role for Notch signalling in human breast cancer?. *Breast Cancer Research* 2003; 5: 69-75.
- 98) Koch U, Radtke F. Notch and cancer: a double-edged sword. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 2746-62.
- 99) Qiao L, Wong BCY. Role of Notch signaling in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1979–86.
- 100) Miyamoto S, Nakanishi M, Rosenberg DW. Suppression of colon carcinogenesis by targeting Notch signaling. *Carcinogenesis* 2013; 34: 2415-23.
- 101) Bienz M, Clevers H. Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling. *Cell* 2000; 103: 311–20.
- 102) Curtin JC. Novel drug discovery opportunities for colorectal cancer. *Expert Opin Drug Discov* 2013; 8(9): 1153-64.

- 103) Pannuti A, Foreman K, Rizzo P, Osipo C, Golde T, Osborne B, Miele L. Targeting Cancer Stem Cells through Notch Signaling. *Clin Cancer Res* 2010; 16(12): 3141–52.
- 104) Chen Y, Fischer WF, Gill GN. Regulation of the ERBB-2 Promoter by RBPJk and NOTCH. *J Biol Chem* 1997; 272: 14110-4.
- 105) Meng RD, Shelton CC, Li YM, Qin LX, Notterman D, Paty PB, Schwartz GK. gamma-Secretase inhibitors abrogate oxaliplatin-induced activation of the Notch-1 signaling pathway in colon cancer cells resulting in enhanced chemosensitivity. *Cancer Res* 2009; 69: 573–82.
- 106) Zhang Y, Li B, Ji ZZ, Zheng PS. Notch1 regulates the growth of human colon cancers. *Cancer* 2010; 116: 5207-18.
- 107) Koduru S, Kumar R, Srinivasan S, Evers MB, Damodaran C. Notch-1 inhibition by Withaferin-A: a therapeutic target against colon carcinogenesis. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 202-10.
- 108) Yan B. Numb – From flies to humans. *Brain & Development* 2010; 32: 293–8.
- 109) Gulinoa A, Marcotullio LD, Screpantia I. The multiple functions of Numb. *Experimental Cell Research* 2010; 316: 900-6.
- 110) Yang Y, Zhu R, Bai J, Zhang X, Tian Y, Li X, et al. Numb modulates intestinal epithelial cells toward goblet cell phenotype by inhibiting the Notch signaling pathway. *Exp Cell Res* 2011; 317: 1640-8.
- 111) Giebel B, Wodarz A. Notch Signaling: Numb Makes the Difference. *Current Biology* 2012; 22: 134-5.
- 112) Pece S, Serresi M, Santolini E, Capra M, Hulleman E, Galimberti V, et al. Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol* 2004; 167: 215-21.
- 113) Carter S, Vousden KH. A role for Numb in p53 stabilization. *Genome Biol* 2008; 9: 221.
- 114) Nejad HJ, Norga KK, Bellen HJ. Numb: “Adapting” Notch for Endocytosis. *Developmental Cell* 2002; 3(2): 155-6.
- 115) Yogosawa S, Miyauchi Y, Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Mammalian Numb is a target protein of Mdm2, ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302: 869-72.
- 116) Brauckhoff A, Malz M, Tschaharganeh D, Malek N, Weber A, Riener MO, et al. Nuclear expression of the ubiquitin ligase seven in absentia homolog (SIAH)-1 induces proliferation and migration of liver cancer cells. *Journal of Hepatology* 2011; 55: 1049–57.
- 117) Grishina I, Debus K, Limones CG, Schneider C, Shresta A, García C, et al. SIAH-mediated ubiquitination and degradation of acetyl-transferases regulate the p53 response and protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1823: 2287–96.
- 118) Giovanelli HA, Faille A, Cruz GL, Nemani M, Deist FL, Germani A, et al. SIAH-1 inhibits cell growth by altering the mitotic process. *Oncogene* 1999; 18: 7101-9.

- 119) Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, et al. Siah-1 Mediates a Novel β -Catenin Degradation Pathway Linking p53 to the Adenomatous Polyposis Coli Protein. *Molecular Cell* 2001; 7: 927–36.
- 120) Giovanelli HB, Fernandez P, Veiga L, Podgorniak MP, Powell DJ, Candeias MM, et al. Distinct expression patterns of the E3 ligase SIAH-1 and its partner Kid/KIF22 in normal tissues and in the breast tumoral processes. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010; 29: 10.
- 121) Susini L, Passer BJ, Elbaz NA, Gershon TJ, Prieur S, Privat N, et al. Siah-1 binds and regulates the function of Numb. *PNAS* 2001; 98: 15067–72.
- 122) Ahmed AU, Schmidt RL, Park CH, Reed NR, Hesse SE, Thomas CF, et al. Effect of Disrupting Seven-in-Absentia Homolog 2 Function on Lung Cancer Cell Growth. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1606-29.
- 123) Zhao J, Wang C, Wang J, Yang X, Diao N, Li Q, et al. E3 ubiquitin ligase Siah-1 facilitates poly-ubiquitylation and proteasomal degradation of the hepatitis B viral X protein. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters* 2011; 585: 2943–50.
- 124) Qiu L, Joazeiro C, Fang N, Wang HY, Elly C, Altman Y, et al. Recognition and Ubiquitination of Notch by Itch, a Hect-type E3 Ubiquitin Ligase. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 35734–7.
- 125) Melino G, Gallagher E, Aqeilan RI, Knight R, Peschiaroli A, Rossi M, et al. Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death and Differentiation* 2008; 15: 1103–12.
- 126) Chastagner P, Israel A, Brou C. AIP4/Itch Regulates Notch Receptor Degradation in the Absence of Ligand. *Plos one* 2008; 3: e2735.
- 127) Marcotullio LD, Ferretti E, Greco A, Smaele ED, Screpanti I, Gulino A. Multiple Ubiquitin-Dependent Processing Pathways Regulate Hedgehog/Gli Signaling. *Cell Cycle* 2007; 6: 390-3.