

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**KOLOREKTAL KANSER TANISINDA
FEKAL VE PLAZMA TIMP-1, COX-2, MMP-7
KOMBİNASYONUNUN TÜMÖR BELİRTEÇİ
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. RABİA KIYAK

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Prof. Dr. GÜLGÜN OKTAY

İZMİR-2012

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından **2011.KB. SAG. 010** sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

Tablo Listesi.....	i
Şekil Listesi.....	ii
Grafik Listesi.....	iii
Kısaltmalar.....	iv
Teşekkür.....	vii
Özet.....	1
Abstract.....	3
<u>1. GİRİŞ VE AMAC</u>	5
<u>2. GENEL BİLGİLER</u>	7
2.1. KOLOREKTAL KANSER	7
2.1.1 Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi.....	7
2.1.2. Kolorektal Kanser risk faktörleri	7
2.1.3. Kolorektal Kanser Patogenezi.....	9
2.1.3.1. Genetik Değişiklikler.....	9
2.1.3.2. Adenomatöz Polipler.....	11
2.1.3.2.1. Tubuler adenomlar.....	12
2.1.3.2.2. Tubulovillöz adenomlar.....	12

2.1.3.2.3. Villöz adenomlar.....	12
2.1.3.3. FAP ve HNPCC (Lynch Sendromu).....	12
2.1.4. Kolorektal Kanser Tarama ve Tanı yöntemleri.....	13
2.1.4.1 Fekal Gizli Kan Testi.....	14
2.1.4.2. Fekal DNA Testleri	14
2.1.4.3 CEA (Karsinoembriyjenik antijen).....	15
2.1.4.3.1 CEA VE Kolorektal kanser.....	16
2.1.4.4 Kolonoskopi.....	16
2.1.4.5 Sigmoidoskopi.....	16
2.1.5 Kolorektal Kanser Evrelemesi.....	17
2.2 EKSTRASELLÜLER MATRİKS.....	18
2.3 MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR.....	19
2.3.1 Matriks Metalloproteinaz Ailesi.....	19
2.4 MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-7 (MMP-7).....	20
2.4.1 Kanser İnvazyonunda MMP-7'in Rolü.....	22
2.4.2 MMP-7'nin Kanser Büyümesindeki Rolü.....	23
2.4.3 Apoptozda MMP-7'in rolü.....	23
2.4.4 MMP-7'nin Anjiyogeneze rolü.....	24
2.4.5 Kolorektal Kanser ve MMP-7.....	25
2.5. MMP'lerin İnhibisyon.....	26
2.5.1 Metalloproteinazların Spesifik Doku İnhibitörleri (TIMP'ler).....	26

2.5.2 TIMP-1.....	28
2.5.2.1 TIMP-1 ve MMP İnhibisyonu.....	29
2.5.2.2 TIMP-1 ve Hücre Çoğalması.....	29
2.5.2.3 TIMP-1 ve Apoptozis.....	30
2.5.2.4 TIMP-1 ve Anjiogenezis.....	30
2.5.2.5 Kolorektal Kanserde TIMP-1'in yeri.....	31
2.5.2.6 TIMP-1'in Saptanması.....	32
2.6. Siklooksijenaz 2 (COX-2).....	32
2.6.1 Kanser Oluşumunda COX-2.....	33
2.6.2 COX-2'nin İnvazyon ve Metastazdaki Yeri.....	34

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. MATERYAL.....	35
3.2 YÖNTEMLER.....	40
3.2.1.Feçes Analizi.....	40
3.2.1.1. Feçes Ekstraksiyon Tamponu Hazırlanması	40
3.2.1.2. Feçes Ekstraksiyonu.....	40
3.2.1.3. Fekal Protein Tayini.....	41
3.2.2 TIMP-1 Ölçüm Yöntemi.....	43
3.2.3 MMP-7 Ölçüm Yöntemi.....	46
3.2.3 COX-2 Ölçüm Yöntemi.....	48
3.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	50

4. BULGULAR

4. 1. TANIMLAYICI BULGULAR.....	51
4.2. Kanser, Polip ve Kontrol Gruplarında Plazma TIMP-1, MMP- 7, COX-2 , CEA Düzeyleri	51
4.2.1. Kanser, Polip ve Kontrol Gruplarında Plazma CEA Düzeyleri.....	52
4.3. Polip grubunda plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeylerinin klinikopatolojik parametrelere göre karşılaştırılması.....	55
4.4 Kanser grubunda plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeylerinin klinikopatolojik parametrelere göre karşılaştırılması.....	55
4.5. Kanser, Polip ve Kontrol Gruplarında Fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA Düzeyleri.....	57
4.5.1. Kanser, Polip ve Kontrol Gruplarında fekal CEA düzeyinin Karşılaştırılması.....	58
4.6. Polip grubunda fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeylerinin klinikopatolojik parametrelere göre karşılaştırılması.....	60
4.7.Kanser grubunda fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeylerinin klinikopatolojik parametrelere göre karşılaştırılması.....	60
4.8. Fekal ve plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri arasındaki ilişki.....	.60
4.9.Plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA ROC eğrileri.....	61
4.10. Fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA ROC eğrileri.....	63
<u>5. TARTIŞMA.....</u>	65

<u>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</u>	71
<u>7.KAYNAKLAR ve EKLER</u>	72
7.1. KAYNAKLAR	72
7.2. EKLER	

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Önerilen Tarama Programları	14
Tablo 2: Fekal DNA belirteçleri	15
Tablo 3: TNM klasifikasyonu	17
Tablo 4: 5 Yıllık Sağkalım Oranları	18
Tablo 5: Matrilizin'in biyokimyasal süreçlerle ilişkisi	21
Tablo 6: TIMP'lerin moleküler özellikleri	27
Tablo 7: Kanserli olguların klinikopatolojik parametreleri.....	36
Tablo 8: Polipli olguların klinikopatolojik parametreleri	39
Tablo 9: Çalışmada kullanılan kitler.....	40
Tablo10: Protein tayininde kullanılan cihaz ve malzemeler.....	42
Tablo 11: Normal, Polip ve Kanser Gruplarında Plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri.....	51
Tablo 12: Polip ve kanser gruplarına ait plazma CEA düzeyleri.....	52
Tablo 13: Kontrol ve kanser gruplarına ait plazma CEA düzeyleri	53
Tablo 14: Kanser, Polip ve Kontrol Gruplarında fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri.....	56
Tablo 15: Kontrol ve kanser gruplarında fekal CEA düzeyleri	57

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Kolorektal kanserde genetik değişiklikler.....	10
Şekil 2: MMP-7 tarafından E-kadherin bağlantılarının kesilmesi	23
Şekil 3: MMP-7 aşırı ekspresyonu ve kolorektal normal mukozanın adenom ve karsinoma ilerlemesi.....	26
Şekil 4: TIMP-1'in yapısı	29
Şekil 5: Şekil 6. PGE ₂ 'nin etkileri	34

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: Feçes protein standart eğrisi.....	43
Grafik 2: Plazma TIMP-1 standart eğrisi	45
Grafik3: Feçes TIMP-1 standart eğrisi	45
Grafik4: Plazma MMP-7 standart eğrisi	47
Grafik 5: Feçes MMP-7 standart eğrisi	47
Grafik 6: Plazma COX-2 standart eğrisi	49
Grafik 7: Fekal COX-2 standart eğrisi	50
Grafik 8: Kanseri ile polip grubu arasındaki plazma CEA düzey farkları kutu grafiği(box-plot).....	53
Grafik 9: Kanseri ile kontrol grubu arasındaki plazma CEA düzey farkları kutu grafiği (box-plot).....	54
Grafik 10: Kanseri ile kontrol grubu arasındaki fekal CEA düzey farkları kutu grafiği (box-plot).....	58
Grafik 11. Plazma kontrol ve kanser grupları için ROC eğrilerinin altında kalan alan	60
Grafik 12. Plazma polip ve kanser grupları için ROC eğrilerinin altında kalan alan.....	61

KISALTMALAR

KRK: Kolorektal kanser

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

FAP: Ailesel Adenomatöz Polipozis Sendromu

HNPCC: Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanseri

NSAİİ: Non Steroid Antiinflatuar İlaçlar

APC: Adenomatöz Polipozis Koli

p53: Tümör Protein 53

FIT: Fekal İmmunokimyasal Testler

MMP: Matriks Metalloproteinaz

COX: Siklooksijenaz

TIMP: Metalloprotenazların Doku İnhibitörü

CEA: Karsino Embriyojenik antijen

DCC: Deleted in Colorectal Cancer

FOBT: Fekal Occult Blood Test

ESM: Ekstrasellüler Matriks

TNF- α : Tümör Nekroz Faktör- α

FasL : Fas Ligand **HB-EGF:** Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü

IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü **IGFBP:** İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayan Protein

ADAM: Bir Disintegrin ve Metalloproteinaz

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ERK : Ekstrasellüler Regülatör Kinaz

MAPK : Mitojen Aktivite Protein Kinaz'ı ve

PI3K: Fosfoinositol 3 kinaz

PTEN: Tensin Homolog İnhibitörleri

EGF: Epidermal Growth Faktör

PG: Prostaglandinler

PGE₂: Prostaglandin E₂

CaCo-2: Kolon Kanseri Hücre Hattı

ELISA: Enzim-linked immunosorbent assay

ROC: Receiver operating characteristic

AUC: Area under curve

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel birikimini benimle paylaşan, manevi desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen, yetişmemde emeği geçen başta Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Canan ÇOKER, Prof. Dr. Banu ÖNVURAL ve Biyokimya Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine;

Tez çalışmamın en başından sonlandırılması aşamasına kadar bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bilimsel birikimiyle bana yardımcı olan, motivasyonumu sürekli yüksek tutan değerli hocam Prof. Dr. Gülgün OKTAY'a

Uzmanlık eğitime başladığım ilk günden itibaren deneyim ve bilgilerinden yararlandığım, Prof. Dr. Sezer UYSAL, Doç. Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN ve Yrd. Doç. Dr. Tuncay KÜME 'ye;

Tez hastalarımın toplanması konusunda gösterdiği hassasiyetle bana destek olan Prof. Dr. Ömer TOPALAK ve Uzm. Dr. Göksel BENGİ' ye ve endoskopi ünitesi çalışanlarına;

Tez örneklerinin çalışılması aşamasında emeği geçen ve bana destek olan değerli arkadaşım Arş.Gör. .Didem KELEŞ 'e;

Bilgisayar yazılım programlarıyla tez yazımımı kolaylaştıran arkadaşım Dr. Ali YILDIRIM'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca arkadaşlık ve dostluklarını esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma, bana her konuda destek olan ve hep yanımda olan gerçek dostlarım Dr. Nur Hilal YUSUFOĞLU ve Dr. Ayşegül SAMUR'a;

Tez ve diğer tüm evraklarımın takibinde büyük duyarlılık gösteren, güler yüzüyle bana moral veren anabilim dalı sekreterimiz Sayın Eda OLUM'a;

Beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olduklarını hissettiren, manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem ve kardeşime; tez yazımı sırasında anlayışla bana destek olan eşim OĞUZHAN KIYAK ve hayatımın anlamı canım kızıma en içten dileklerle teşekkür ederim

Dr. Rabia KIYAK

ÖZET

Kolorektal kanser (KRK) dünyada en sık görülen kanserlerden biridir. 50 yaşından sonra görülme sıklığı giderek artar. Genelde asemptomatik seyretmesi nedeni ile erken tanı oldukça güçtür. Ekstrasellüler matriksin yıkımı invazyon ve metastazdaki en önemli adımdır. Matriks metalloproteinazlar (MMP) ve onların doku inhibitörleri (TIMP) arasındaki dengenin bozulması invazyonun oluşumunda önemlidir. Matrilizin (MMP-7) kolorektal poliplerin kansere dönüşümünde indükleyici rol oynar. Erken evre kolorektal kanserde artışı gösterilmiştir. TIMP-1'in MMP inhibisyonu dışında antiapoptotik etkisi gibi tümör oluşumunu artırıcı etklileri olduğu gösterilmiştir. TIMP-1'i kolorektal kanserde arttığını, CEA 'ya göre duyarlılığının daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Fekal TIMP-1 ve CEA'nın KRK'de duyarlılıkları saptanmıştır. Siklooksijenaz-2 (COX-2) artışının kolorektal karsinogenez basamağında etkili olduğu gösterilmiştir. Birçok çalışmada kolorektal kanserde COX-2 artışı gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda feçesde COX-2 ve MMP-7 mRNA ekspresyonları gösterilmiştir. CEA şu an için KRK'de kullanılan tek biyokimyasal belirteçtir. Duyarlılığının ve özgüllüğünün düşük olması nedeni ile tanıda değil takipte kullanılır. Gaita gizli kan testi KRK için duyarlılığı düşük noninvaziv bir testtir. Tanı amaçlı kullanılan kolonoskopi hastalar için rahatsızlık verici, pahalı ve invaziv bir yöntemdir.

Bu çalışmanın amacı fekal ve plazma MMP-7, COX-2, TIMP-1 ve CEA düzeylerinin kantite edilmesi, kontrol, polip ve kanser grubu arasındaki farkların ve bu belirteçlerin tanı değerinin ortaya konmasıdır. Polip ve kanser grubu için klinikopatolojik değişkenlerle MMP-7, COX-2, TIMP-1 ve CEA düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir.

Çalışma grubuna 33 kontrol, 23 polip, 15 kanser hastasının plazma örnekleri ile aynı hastalardan elde edilebilen 16 kontrol, 8 polip, 8 kanser feçes örneği alındı. Fekal ekstraksiyon sonrası elde edilen süpernatantlar ve plazma örnekleri ELISA ile çalışıldı.

Plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 düzeyleri açısından kontrol, polip ve kanser grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Plazma CEA düzeyleri kanser grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ($p=0,008$) ve polip grubuna göre anlamlı ($p=0,012$) yüksek bulundu. Plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2, CEA düzeyleri ile klinikopatolojik değişkenler arasında anlamlı fark görülmedi. Fekal ve plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2, CEA düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı. Plazma CEA, COX-2, TIMP-1 ve MMP-7 için kanser ve kontrol grubu arasında ROC eğrisinde eğri altında kalan alan farkları sırasıyla, 0.728, 0.571, 0.480 ve 0.359 dur. Polip ve kanser grubu arasında plazma CEA, TIMP-1, MMP-7 ve COX-2

ROC eğrisinde eğri altında kalan alan farkları sırasıyla 0.735, 0.614, 0.516 ve 0.396'dır. Fekal CEA düzeyleri kanser grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ($p=0,027$) yüksek bulundu. Fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 düzeyleri açısından kontrol, polip ve kanser grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Fekal CEA, MMP-7, TIMP-1 ve COX-2 için kanser ve kontrol grubu arasında ROC eğrisinde eğri altında kalan alan farkları sırasıyla, 0.769, 0.466, 0.463 ve 0.425dir. Fekal polip ve kanser grubu arasında CEA, COX-2, MMP-7 ve TIMP-1 ROC eğrisinde eğri altında kalan alan farkları sırasıyla 0.750, 0.625, 0.438 ve 0.196 dır.

Sonuç olarak plazma CEA düzeyleri kolorektal kanserde kullanılan tek belirteç olduğunu kanıtlar niteliktedir. Plazma CEA, TIMP-1 ve MMP-7 polip ve kanser ayırımında tanı değerine sahiptir. Fekal CEA'nın yüksek olması kolorektal kanser için yeni bir belirteç olabilir. Fekal TIMP-1 ve COX-2 de polip ve kanseri ayırmada tanı değerine sahiptir. Plazma ve fekal belirteçlerin tanı değerini arttırmak amacıyla geniş çaplı klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, fekal ve plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2, CEA, ELISA

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers in the world. The incidence increases progressively after the age of 50. Its early diagnosis is difficult because of its usually remain asymptomatic. The degradation of extracellular matrix is the most important step in invasion and metastasis. The imbalance between matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMP) is important in the formation of invasion. Matrilizin (MMP-7) plays an inducing role in the transformation of colorectal polyps to cancer. It has been shown that MMP-7 increases in early-stage of colorectal cancer. TIMP-1 has also antiapoptotic effect which inhibits tumor growth. There are studies showing that TIMP-1 increases in colorectal cancer and has a higher sensitivity according to CEA. The sensitivities of fecal TIMP-1 and CEA in CRC was determined. It was shown that the increase of cyclooxygenase-2 (COX-2) is effective in the steps of colorectal carcinogenesis. The increase of COX-2 in colorectal cancer are shown in many studies. COX-2 and MMP-7 mRNA expression in the feces are shown in recent studies. CEA is the unique biochemical marker currently used in CRC. Due to the low specificity and sensitivity, it is used in follow-up but not in diagnosis. Fecal occult blood test is a noninvasive test to detect low sensitivity for CRC. Colonoscopy is used for diagnosis and it is uncomfortable, expensive and invasive procedure for patients.

The purpose of this study is to quantify fecal and plasma MMP-7, COX-2, TIMP-1 and CEA levels in colorectal cancer, polyps and control patients and also to analyze the differences between these groups and the diagnostic value of these markers. In addition, we aimed to assess the relationship between clinicopathologic variables for cancer and polyps and MMP-7, COX-2, TIMP-1, CEA levels.

For working group, plasma samples were taken from 33 controls, 23 polyps, 15 cancer patients and fecal samples were taken from 16 controls, 8 polyps, 8 cancer. Fecal supernatants obtained from extraction and plasma samples were determined by ELISA. Plasma TIMP-1, MMP-7, COX-2 levels were not observed statistically significant difference between control, polyps and cancer patients. Plasma CEA levels were significantly higher in the cancer group than control group ($p = 0.008$) and than polyp group ($p = 0.012$). There was no difference between plasma TIMP-1, MMP-7, COX-2, CEA levels and clinicopathological variables. There was no statistical correlation between fecal and plasma TIMP-1, MMP-7, COX-2, CEA levels. In the control and cancer group, the differences the area under the curve in ROC curve for plasma CEA, COX-2, TIMP-1 and MMP-7 are 0.728, 0.571, 0.480 and 0.359, respectively. Between polyps and cancer groups, the differences the area under the curve in ROC curve for plasma CEA, TIMP-1, MMP-7 and COX-2 are 0.735, 0.614, 0.516 and 0.396, respectively. Fecal CEA levels were higher in the cancer group than the control group ($p = 0.027$). Fecal TIMP-1, MMP-7, COX-2 levels were not observed statistically significant difference between control, polyps and cancer patients. For fecal CEA, MMP-7,

TIMP-1 and COX-2 in cancer and the control group, the differences between the ROC curve area under the curve are 0.769, 0.466, 0.463 and 0.425. Between polyps and cancer group, the differences the area under the curve in ROC curve for fecal CEA, COX-2, MMP-7 and TIMP-1 are 0.750, 0.625, 0.438 and 0.196, respectively.

As a result, plasma CEA levels are the unique marker in colorectal cancer. Plasma CEA, TIMP-1 and MMP-7 have value of diagnostic differentiation of colorectal cancer and polyps. Fecal CEA may be a new marker for colorectal cancer. Fecal TIMP-1 and COX-2 have diagnostic value of the distinguish from cancer to polyps. In order to increase the diagnostic value of plasma and fecal markers, a large-scale clinical studies are needed.

Key words: colorectal cancer, fecal and plasma TIMP-1, MMP-7, COX-2, CEA, ELISA

1. GİRİŞ ve AMAC

Kolorektal kanserler (KRK); dünyanın değişik toplumlarında farklı sıklıkta görülen onkolojik bir problemdir. Kalın bağırsak kanser prevalansı tüm maligniteler arasında üst sıralarda yer almaktadır. Kolorektal karsinomun görülme sıklığı 50 yaşından sonra giderek artmakta ve 80 yaşından sonra en yüksek değerine ulaşmaktadır. İstatistiksel bilgilerin güvenilir olduğu ABD’de kolorektal kanser; erkeklerde prostat ve akciğer, kadınlarda meme ve akciğer kanserinden sonra üçüncü sıklıkta görülen kanser türüdür [1]. Kansere bağlı ölümler arasında kolorektal karsinom, akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır [2]. Kolorektal kanserlerin kesin tanısı kolonoskopi ve biyopsi ile sağlanır. 50 yaş üzeri kişilerde gaitada gizli kan ve kolonoskopi ile tarama yapılır. Sıklıkla kullanılan CEA (Karsino Embriyonik Antijen) ise tanıda değil takipte kullanılır

Erken tanıda yaygın olarak kullanılan biyokimyasal belirteçin olmaması araştırmaları bu yöne yönlendirmiştir. Ayrıca erken tanı mortaliteyi azaltmakta etkilidir. Postoperatif kolorektal kanserli hastalarda hem rekürrens ve metastazın erken saptanmasında hem de önleyici tedavi seçiminde biyokimyasal belirteçlere ihtiyaç vardır [3].

Ekstrasellüler matriks (ECM); hücrelerin arasında bulunan ve onları destekleyen kompleks bir yapıdır. Ekstrasellüler matriks’in ve bazal membranın yıkılması tümör invazyonu ve metastazında önemli bir adımdır [4]. Matriks metolloproteazlar (MMP), ekstrasellüler matriks ile bazal membran komponentlerini parçalayan çinko bağımlı endopeptidaz ailesidir [5]. MMP’lar dokunun yeniden yapılanması yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerde rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar. MMP-7 ile kolorektal kanserli olgular arasında hem tümör büyümesi hemde uzak metastazla anlamlı ilişki bulunmuştur [6]. Yapılan araştırmalarda normal kolonik mukozanın adenomatöz ve karsinomatöz mukozaya dönüşümünde MMP-7 ekspresyonunun hızlı artışı gösterilmiştir [7]. TIMP-1 (spesifik metolloprotenaz doku inhibitörleri) düzeyleri; yapılan deneysel çalışmalarda sağlıklı donörlerde normal referans değerleri içinde iken kolorektal kanserli hastalarda anlamlı yüksek bulunmuştur [7].

NSAİ ilaçların kolorektal kanser riskini azalttığı bilinir. Bunu da COX-2 inhibisyonu ile gerçekleştirirler. Bu ilaçların başlıca etki mekanizması, prostaglandin yapmından sorumlu

siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe etmektir. COX'ın 2 izoformu bulunmaktadır (COX 1-2). COX-2'in kolorektal adeno karsinom'da normal mukoza ile karşılaştırıldığında ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Kolorektal kanserli hastaların % 85'inde COX-2 aşırı ekspresyonu görülür[8]. Son yapılan bir çalışmada ise fekal MMP-7 mRNA ve COX-2 mRNA saptanmasının kolorektal kanseri erken evrede saptamak için yüksek duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür [9].

Biz çalışmamızda kolorektal kanser ve kolon polipi tanısı almış hasta grubu ile sağlıklı (kontrol) bireylerde fekal ve plazma TIMP-1, COX-2, MMP-7, CEA düzeyleri arasındaki farklılıkları değerlendirmeyi hedefledik.

Bu çalışmadaki amacımız;

1. Kanser, polip ve kontrol grubunda fekal ve plazma TIMP-1, COX-2, MMP-7, CEA düzeylerini karşılaştırmak
2. Fekal ve plazma TIMP-1, COX-2, MMP-7, CEA düzeylerinin polipli olgularda polip tipi ve boyu, KRK'li olgularda klinikopatolojik değişkenlikler (Yaş, cins, tümör yerleşimi, boyutu, evre, lenf nodu metastazı, diferansiyonu, uzak metastaz, evre, lenfatik ve perinöral invazyon) ile karşılaştırmaktır.
3. Fekal ve Plazma TIMP-1, COX-2, MMP-7, CEA'nın tanısal değerini saptamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KOLOREKTAL KANSER

Kolorektal kanserler (KRK); dünyanın değişik toplumlarında farklı sıklıkta görülen onkolojik bir sağlık sorunudur. Kalın barsak kanserinin prevalansı tüm maligniteler arasında üst sıralarda yer almaktadır [1]. İstatistiksel bilgilerin güvenilir olduğu Amerika Birleşik devletlerin (ABD) de kolorektal kanser; erkeklerde prostat ve akciğer, kadınlarda meme ve akciğer kanserinden sonra üçüncü sıklıkta görülen kanser türüdür [1]. Birleşik devletler (ABD) de tahmini olarak her yıl 134.000 yeni tanı konan ve yaklaşık 55.000 ölüme sebep olan bu hastalık kanser ile ilişkili ölümlerin yaklaşık %15'inden sorumludur [10]. Kolorektal kanserlerin gelişiminde hem genetik hem de çevresel faktörlerin rolü vardır. Kolorektal kanserlerinin büyük çoğunluğunu (%98) adenokarsinomlar oluşturmaktadır [10]. Adenokarsinomlarda hemen her zaman adenomatöz bir polip zemininden gelişmektedir [10].

2.1.1. KOLOREKTAL KANSER EPİDEMİYOLOJİSİ

Kolorektal karsinomların insidansı 60-70 yaşlarında en yüksek düzeyine ulaşır. Hastaların %20'sinden daha azı 50 yaşın altındadır [10]. Erkeklerde akciğer, prostat, kolorektal kanser, kadınlarda ise akciğer, meme, kolorektal kanser kanserden ölümlerde en yaygın ilk üç kanser tipidir [11].

Avustralya, Yeni Zelanda, Kanada, ABD ve Avrupanın bir kısmında KRK insidansı yüksek iken Çin, Hindistan Afrikanın bir kısmı, Güney Amerika gibi ülkeler de insidans düşüktür [12]. Kolorektal kanser gelişiminde hem genetik hem de çevresel faktörlerin rolü vardır [10]. Dünya popülasyonunda, kolorektal kanser % 9,4 ve kadınlarda % 10,1 oranında görülür [12]. ABD'de kadın ve erkek KRK insidansı 1980-1990 yılları arasında stabil iken 1998-2005 arasında erkekler için yılda %2,8 kadınlar için yılda % 2,2 azalmıştır. Bu azalışın nedeni geliştirilen tarama programları ile prekanseröz poliplerin erken tanınmasıdır [12].

2.1.2. KOLOREKTAL KANSER RİSK FAKTÖRLERİ

Birçok risk faktörü kolorektal kanser ile ilişkilidir. Herediter faktörler ve yaş önlenemez risk faktörleridir [12]. KKK sıklığının Yeni Zelanda, Danimarka, İsveç gibi batı ülkelerinde Hindistan, Japonya gibi doğu ülkelerine göre yüksek olması çevresel faktörleri özellikle de diyet alışkanlıklarını düşündürmektedir [10].

Batı tarzı beslenme özellikle yüksek hayvansal yağ alımı major risk faktörüdür. Kırmızı etten zengin diyet KKK riskini artırır. Kırmızı etin yüksek ısıda pişirilmesi heterosiklik amin ve polisiklik aromatik hidrokarbon oluşumuna yol açar. Bu bileşikler kanserojen özelliktedir [12]. Ayrıca sebze ve meyvenin az tüketilmesi de KKK için risk faktörüdür. Diyetle lifli yiyeceklerin bulunması kolorektal kanser insidansını azaltır. Lifin koruyucu etkisi fekal içeriği dilüe etmesi, dışkı kitlesini arttırması ve dışkının bağırsaktan geçiş zamanını azaltması, böylece karsinojen maddenin mukoza ile daha az temas etmesini sağlar [12].

Fiziksel inaktivite ve vücut ağırlığının fazla olması kolorektal kanser riskini artırır. Düzenli egzersiz bağırsak hareketlerini artırır. Sigara içimi ve düzenli alkol alımı kolorektal kanser riskini artırır. Kolon ve rektumda büyük poliplerin bulunması uzun süreli sigara içimi ile ilişkilidir [13].

Yaş da önemli bir risk faktörüdür. Kolorektal kanser %90 oranında 50 yaşından sonra görülür [12].

İnflamatuvar barsak hastalıkları olan Crohn ve Ülseratif kolit de kolorektal kanser riskini artırır. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında görece risk 4 ila 20 kat artış gösterir [12]. Bundan dolayı bu hastalığa sahip kişiler sıklıkla taranmalıdır.

Ailesinde kolon kanseri ve adenomatöz polip öyküsü olan bireylerde kanser gelişim riski %20 daha fazladır. Kolorektal kanser ya da adenomatöz polip öyküsü birinci derece yakınlarında iki ya da daha çok sayıda ve tanı 60 yaşından önce ise risk daha fazladır [14].

Kolorektal kanser etyolojisinde %5-10 herediter faktörler sorumludur. Yaygın olarak görülen genetik hastalıklar ailesel adenomatöz polipozis sendromu (FAP) ve herediter non-polipozis kolorektal kanser (HNPCC) diğer adıyla Lynch sendromudur [12]. HNPCC

sendromu DNA tamir yolunu içeren genlerde (MLH1-MLH2) mutasyon olması sonucu görülür [15]. FAP'a ise tümör süpresör gen APC'de mutasyon olması neden olur [12]. HNPCC MLH1-MLH2 mutasyonları diğer kanser risklerini (rahim, mide, ince barsak, pankreas böbrek ve üreter) arttırır. APC ile ilişkili polipozis sendromları otozomal dominant geçişlidir.

Koruyucu faktörlere baktığımızda diyet, fiziksel aktivite, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur.

Diyetle düşük oranda fiber (lif) alan toplumlarda gıdadaki total fiber alımını iki katına çıkarmakla KRK riskinin %40 oranında düşürülebileceği ileri sürülmüştür [16].

Kolon kanseri gelişiminde aspirin ve non steroid antiinflamatuvar ilaçların (NSAİİ) koruyucu etkisini gösteren önemli çalışmalar mevcuttur. Düzenli aspirin kullanımının (en az 10 yıl) kolon kanserinden koruyucu etkiye sahip olduğu gözlenmiştir [17]. Bu grup ilaçlar ile siklooksijenaz-2 inhibisyonu olmakta, sonuçta apoptozis artmakta ve tümör hücresi büyümesi azalmaktadır [17].

2.1.3. KOLOREKTAL KANSER PATOGENEZİ

Günümüzde kolon karsinogenezinde patogenetik olarak birbirinden farklı iki ayrı yol olduğu bilinmektedir: APC/ β -katenin yolu (ya da adenom-karsinom sekansı) ve mismatch tamir (ya da mikrosatellit instabilite) yolu. Her iki yolda da birden fazla sayıda mutasyonun aşamalı olarak birikimi söz konusudur. Bununla birlikte, bu mutasyonların gerçekleştiği genler ve mutasyonların birikim mekanizmaları farklıdır [10].

Adenom-karsinom sekansı olarak da adlandırılan birinci yol, APC/ β -katenin yolu ya da kromozom instabilitesi yolu, bir seri onkogende ve tümör baskılayıcı gende mutasyonların aşamalı olarak gerçekleşmesine ve birikimine neden olan bir kromozomal dengesizlik ile karakterizedir [10]. Kolon kanserinin moleküler gelişimi morfolojik olarak tanımlanabilen aşamalar ile gerçekleşir. Önce epitel proliferasyonu meydana gelir. Bu aşamadan sonra küçük adenomlar oluşur ve daha displastik hale gelerek sonunda invaziv kansere dönüşürler. Adenom-karsinom sekansı olarak adlandırılan bu olay sporadik kolon tümörlerinin %80'ini oluşturmaktadır.

2.1.3.1. Genetik Değişiklikler

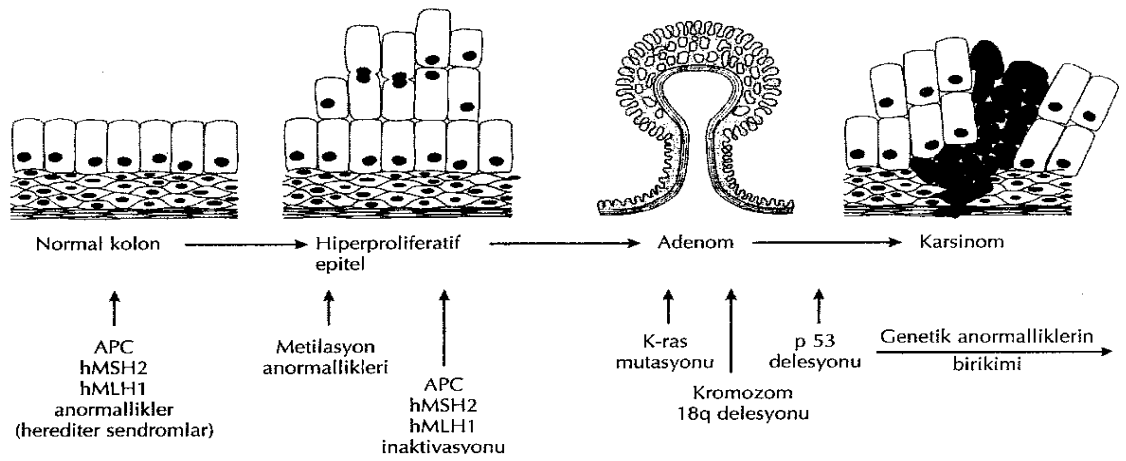
APC tümör baskılayıcı gen kaybının adenom oluşumunda en erken olay olduğu düşünülmektedir. Adenomların meydana gelebilmesi için APC geninin her iki kopyası da kaybedilmelidir. APC proteinin fonksiyonları β -katenin ile yakından ilişkilidir. Normal APC β -katenin yıkımını sağlarken, APC'nin fonksiyon kaybı durumunda biriken β -katenin yer değiştirerek MYC ve siklin D1 gibi çeşitli genlerde transkripsiyonu aktive eder ve hücre proliferasyonunu hızlandırır [10].

K-RAS mutasyonu 1 cm'den küçük adenomların %10'nundan azında görülürken, 1 cm'den büyük adenomların ve karsinomların %50'sinde mevcuttur. Mutasyona uğramış RAS geni aktif halde sabit kalır ve mitotik sinyalleri iletmeye devam eder, apoptozu engeller [10].

p53 tümör baskılayıcı genin kaybına kolon kanserlerinin %70-80'inde rastlanılmaktadır. Bu kayıp adenomlarda seyrek görüldüğünden p53 mutasyonlarının geç bir olay olduğu düşünülmektedir [10].

Bu değişikliklere ek olarak, kolorektal karsinom gelişiminde adenom-karsinom yolunda tümör baskılayıcı genlerin metilasyon derecesinde değişiklikler meydana gelmektedir [10]

Genetik lezyonların varlığı ile karakterize ikinci yol DNA mismatch tamir genleri ile ilişkilidir. Sporadik vakaların %10-15'inde saptanmıştır. KRK gelişiminde en önemli nokta DNA mismatch tamir genlerinin inaktivasyonu sonucu DNA tamirinde meydana gelen aksaklıklardır. Beş DNA mismatch tamir geninden (MSH2, MSH6, MLH1, PMS1 ve PMS2) birindeki kalıtsal mutasyonlar herediter nonpolipozis kolon karsinomu (HNPCC) ile sonuçlanır. Bu genlerden MLH1 ve MSH2, en sık ilişkili bulunan genlerdir [10].



Şekil 1. Kolorektal kanserde genetik değişiklikler [18]

2.1.3.2. Adenomatöz Polipler

Polipler, mukozanın anormal maturasyonu, inflamasyonu ya da yapısal bozukluğu sonucu meydana gelebilirler. Bunlar, non-neoplastik poliplerdir ve malignite potansiyeline sahip değildirler. Epitelyal proliferasyon ya da displazi sonucu meydana gelen poliplere adenomatöz polip ya da adenom adı verilir. Bunlar gerçek neoplastik lezyonlar olup, karsinom öncülleridir [10].

Poliplerin büyük bir çoğunluğu, özellikle kolondakiler sporadik olarak meydana gelir. Sıklıkları yaşla birlikte artar. Kalın bağırsaktaki bütün epitelyal poliplerin yaklaşık %90' ını non-neoplastik polipler oluşturmaktadır. Bunlar 60 yaş ve üstündeki kişilerin yarısından fazlasında bulunurlar [10].

Adenomlar, genelde saplı küçük poliplerden, çoğunlukla sesil (sapsız) büyük lezyonlara kadar değişen çeşitli yapı ve büyüklüklerde neoplastik poliplerdir. Kolondaki adenomların yaygınlığı 60 yaştan sonra %40-50'ye yükselmektedir. Adenomlu bir hastada kolorektal karsinom gelişme riski normalden 4 kat artmıştır [10]. Bütün adenomatöz lezyonlar epitelyal proliferasyondan ve hafiften ağıra, karsinom transformasyonuna kadar değişen derecelerde displaziden kaynaklanan lezyonlardır. KRK kanserlerin çoğu adenomatöz polip zemininden gelişmektedir.[10]

Adenomatöz polipler epitelyal karakterleri temel alınarak subtiplere ayrılır:

1. Tubuler adenomlar
2. Tublovillöz adenomlar
3. Villöz adenomlar

2.1.3.2.1. Tubuler adenomlar

Kolonda herhangi bir bölgeden kaynaklanabilirler, fakat yaklaşık yarısı rektosigmoidde yer almaktadır. Çoğu tubuler yapıda olan, mukozayı taklit eden glandlardan oluşur. Rastlanma oranı yaşla beraber artar. Adenomların en küçük olanları sesildir ve çapları 0,3 cm'yi geçmez. Endoskopik incelemede saptanabilirler [10].

2.1.3.2.2. Tubulovillöz adenomlar

Tubuler ve villöz bölgelerin karışımından oluşmuşlardır. Bir sapa sahip olma sıklıkları, boyutları, displazi derecesi ve intramukozal ya da invaziv karsinom taşıma riski açısından bakıldığında, bu lezyonlar tubuler ve villöz adenomlar arasında intermedier bir yere sahiptirler.

2.1.3.2.3. Villöz adenomlar

Daha büyük ve daha kötü huylu epitelyal poliplerdir. Daha çok yaşlı hastalarda en sık olarak rektumda ve rektosigmoidde görülseler de, herhangi bir bölgede yerleşebilirler. Bu

lezyonların %40'ında invaziv karsinoma rastlanır. Karsinom sıklığı polibin boyutları ile yakından ilişkilidir [10].

2.1.3.3. FAP ve HNPCC (Lynch Sendromu)

Hereditör nonpolipozis kolorektal kanser, otozomal dominant geçişli bir hastalıktır. Tüm kolorektal kanserlerin %2-4'ünü oluşturur [19]. Kolon kanseri ve polipleri sporadik olgularla karşılaştırıldığında daha genç başlangıçlı ve daha çok proksimal kolonda lokalizedir [19]. Bu kişiler ortalama 45 yaşında kanser tanısı almakta yaş ilerledikçe risk artmaktadır. DNA mismatch tamir genlerinde MLH1 ve MLH2 genlerinde %90 oranında germline mutasyonlar, daha az olarak MSH6 ve PMS2 genlerinde mutasyonlar saptanmış [20]. Bu sendromdaki hastaların %80'inde kanser gelişmektedir. Bu tip hastalarda ekstra kolonik endometrium, mide, ince barsak, over ürener yolların kanserleri sıktır [20]. Lynch sendromunun moleküler özelliği mikrosatellit instabilite göstermesidir [20].

Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) genetik geçişli KRK sendromların 2.en yaygın nedenidir. 5q21 kromozumundaki adenomatöz polipozis koli (APC) genindeki mutasyonlar sonucu olur [10]. Aynı gendeki mutasyonlar ile olan klinik bulgular geniş bir spektrum içinde kendini gösterir. FAP'ta karakteristik olarak erken dönemde yüzlerce adenomatöz polip mevcuttur. Bu bireyler ortalama 39 yaşında KRK tanısı alırlar [19]. FAP, Gardner sendromu (epidermoid kist, osteomlar, dental anomaliler ve / veya desmoid tümör ve FAP birlikteliği) ve Turcot sendromu (FAB ve santral sinir sistemi tümörleri) APC germline mutasyonun sonucudur [19].

2.1.4. KOLOREKTAL KANSER TARAMA VE TANI YÖNTEMLERİ

Kolorektal kanserlerin saptanması ve tanı konması rektal tuşe ile muayene ve dışkıda gizli kan varlığının incelenmesi başta olmak üzere çeşitli tanı yöntemlerinin uygulanmasını gerektirir [10]. Kolon kanserinin patogenezi ve doğal seyrinin tam anlaşılabilmesi, özellikle yüksek risk grubundaki hastalar için, yaşam şansının belirlenmesi için yararlı tarama araçları geliştirilmelidir [21].

Tanı anında Duke evre A ve B'deki hastalar için 5 yıllık yaşam şansı %82-93, Duke evre C' deki hastalar için % 55-60, uzak organ metastazı olan Duke evre D'de yaşam şansı %

5-8'dir. Tarama programları ile erken evrede tümörün saptanması yaşam oranları artmıştır [22]. Gaitada gizli kan (GGK) taramalarının KKK 'de mortaliteyi %15-20 oranında azalttığı görülmüştür [23].

KKK taraması erken evrede tanı konması yanında KKK'in prekürsör lezyonları olan adenomların saptanmasını sağlamıştır. Adenomun kansere ilerlemesi yavaş bir süreçtir ve premalign evre de kanser saptanması sağlanır [24]. Uygulanan kanser tarama programları ile erken evrede tanı koymak mümkün olmaktadır. (Tablo 1)

KKK genelde ileri yaşta görülen bir hastalıktır. Olguların %50'si 70 yaş ve üzerinde, %25'i 80 yaş ve üzerindedir. Bundan dolayı KKK tarama yaşı için 50-74 arasına odaklanılmıştır [24].

Tablo 1. Önerilen Tarama Programları [24]

Kolonoskopi 10 yılda bir
Fleksibl sigmoidoskopi 5-10 yılda bir
Yıllık gaitada gizli kan ve fleksibl sigmoidoskopi 5 yılda bir
DCBE 5 yılda bir
Yıllık GGK takibi
DCBE: Double kontrast baryum enema

2.1.4.1 Fekal Gizli Kan Testi

Dışkıda kan varlığının saptanması hemoglobinin peroksidaz aktivitesini algılayan gualak temelli bir test ile sağlanır [25]. Kolorektal kanseri (polip ya da kanser)saptamada tek

başına gualak testinin duyarlılığı düşüktür, %30 ile 50 arasındadır [23]. Pozitif çıkan test sonuçları kolonoskopi ile araştırılmalıdır.

Fekal immunokimyasal testler (FIT) ise insan hemoglobinine spesifik antikorlar içerir. İmmunokimyasal testler insan hemoglobinine spesifik olması, diyet kısıtlaması gerektirmemesi nedeni ile kolayca uygulanabilmektedir [25]. Son yıllarda 21.805 asemptomatik Japon hastalarda FIT'in kanseri saptama oranı %65,8 (spesifite %95'de)'dir [26].

2.1.4.2. Fekal DNA Testleri

FIT yanında fekal DNA analizi KRK tanısında önerilmektedir [26]. Son yapılan bir çalışmada ise fekal MMP (matriks metalloprotenaz)-7 mRNA ve COX (siklooksijenaz) -2 mRNA ekspresyonunun saptanmasının kolorektal kanseri erken evrede saptamada yüksek duyarlılığa sahip olduğu görülmüş [9]. Ayrıca Karl ve ark. 2008 yılında yaptıkları çalışmada yeni fekal protein belirteçleri ve bunların kombinasyonları denenmiş.

Bu çalışmada TIMP (metalloprotenazların doku inhibitörü) -1, CEA, S100A12, hemoglobin, hemoglobin-haptoglobin, kalprotektin gibi proteinler KRK'li hastaların fekal örneklerinde ölçülmüş. TIMP-1 dışkıda gizli kanı pozitif olan hastalarda %72 (%95 spesifite) duyarlı olduğu saptanmıştır [26]

Tablo 2. Fekal DNA belirteçleri [27]

Belirteç	KRK’de görülme sıklığı	Açıklama
K-ras	%40-60	Non-neoplastik hücre çoğalmasında da görülebilir
APC	%70	Erken lezyonların saptanması için yararlı bir belirteç olabilir
P53	%40-60	Geç evre KRK
L-DNA	?	KRK’de apoptozun azaldığını gösterir
BAT 26	?	MSI belirteçi

2.1.4.3 CEA (Karsinoembriyojenik antijen)

Üzerinde en fazla çalışılan tümör belirleyici olan karsinoembriyojenik antijen (CEA)’dir. Tek zincirden oluşan bir glikoproteindir. Normal erişkin insan hücrelerinde, fetüste ve bazı kanser hücrelerinde üretilmektedir. Antijenik özelliğini yapısının % 60’ını oluşturan karbonhidrat içeriği sağlamaktadır. CEA hastalığın evresine bağlı olarak artar ve erken evrede düşük pozitiflik oranına sahiptir[28]. CEA düşük duyarlılığı ve spesifitesinden dolayı geniş çaplı kitle taraması yapmak için uygun değildir.

2.1.4.3.1 CEA ve Kolorektal kanser

KRK’li hastalarda en eski ve en yaygın kullanılan serum belirteçidir. Seri CEA ölçümleri yaşam şansı üzerinde anlamlı olarak etkin, diğer takip testleri (radyoloji ve kolonoskopi) ile karşılaştırıldığında ucuz ve zahmetsizdir [27]. Yeni klavuzlar kolorektal

kanserli evre 2 ve 3'deki hastalar için tanıdan sonraki ilk 3 yılda en az 2-3 ayda bir ölçülmesini önermektedir [27]. ASCO (Amerikan Society of Clinical Oncology) belirlediği klavuzda CEA yükseldiğinde yeniden testi tekrarlamak gerekir, daha sonra metastaz varlığının değerlendirilmesi yapılmalıdır [27].

CEA şu an için önerilen tek serum belirteçidir; CEA'nın tanı değerini güçlendirici, bağımsız biyolojik belirteçlere ihtiyaç vardır [29] . Son yıllarda öne çıkan TIMP (doku metalloproteinaz inhibitörü -1) yüksek seviyeleri ile kanser hasta sonuçları ilişkili bulunmuş. Yüksek TIMP-1 seviyeleri ile yüksek rekürrens riski ve kötü sağkalım arasında ilişki saptanmış [30]. Literatür tarandığında TIMP-1'nin yüksek seviyelerinin KRK'de sağkalım kötü prognoz, uzak metastazla ilişkisinin kanıtlandığı çalışmaya rastlanılmaktadır.

2.1.4.4 Kolonoskopi

Kolonoskopi poliplerin tanısını, çıkarılmasını ve kolon boyunca saptanan kanserlerden biyopsi alınmasını sağlar. Kolonoskopi altın standart olmasına rağmen diğer testlere göre daha pahalı, daha riskli ve daha rahatsızlık vericidir [26].

2.1.4.5 Sigmoidoskopi

Sigmoidoskopinin ulaşabildiği mesafede kolorektal kanserlerin üçte ikisi saptanmaktadır [31]

2.1.5 KOLOREKTAL KANSER EVRELEMESİ

Kolorektal karsinomun tek ve en önemli prognostik göstergesi, tanının konduğu anda tümörün yayılım aşamasıdır yani evresidir. İlk olarak KRK evrelendirilmesi 1932 yılında Dukes tarafından önerildi. Amerikan kanser komisyonu (The American joint Comission on Cancer –AJCC) evrelemede TNM klasifikasyonunu kullanmaktadır [10].

Hastalarda tümörün invazyon derecesi ve tutulan lenf düğümü sayısı arttıkça prognoz kötüleşmektedir [10]. (Tablo 3)

Tablo 3. TNM klasifikasyonu [10]

Tümör(T)
Tis = İn situ(mukozada sınırlı)
T1= Submukoza invazyonu
T2= Muskularis propria invazyonu
T3= Subserozaya invazyonu
T4= Çevre dokularda ve yapılarda invazyon

Lenf nodları (N)
0 = Lenf nodu tutulumu yok
1= 1-3 adet lenf nodu pozitifliği
2= 4 ya da daha fazla lenf nodu pozitifliği

Uzak Metastaz(M)
0= Metastaz yok
1= Herhangi bir uzak metastaz varlığı

Tablo 4. 5 Yıllık Sağkalım Oranları [10]

T1= %97

T2= %90

T3= %78

T4= %63

Herhangi bir T, N1; M0 = %66

Herhangi bir T; N2; M0 = %37

Herhangi bir T; N3; M0 = veri yok

Herhangi bir bölgede M1 = %4

2.2 EKSTRASELLÜLER MATRİKS

Ekstraselüler matriks (ESM) hücreleri ve hücre-hücre arası ilişkileri destekleyen yapıdır. Ekstraselüler matriks'in ve bazal membranın yıkılması tümör invazyonu ve metastazında önemli bir adımdır [10]. ESM kollajen, elastin, proteoglikanlar ve diğer moleküllerden oluşmuştur. Hücre büyümesi ve migrasyonunda ESM'in yeniden yapılanması kritik rol oynar. ESM'in yıkılımı proteolitik enzimlerle kontrol altına alınmıştır [32].

2.3 MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

2.3.1 Matriks Metalloproteinaz Ailesi

Matriks metalloproteinazlar (MMP) ESM ile bazal membran komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren homolog bir enzim ailesidir.

Nötral pH da fonksiyon gösterirler. İnaktif zimojen formda (proMMP) sekrete edilirler ve proteolitik aktivasyona ihtiyaç duyarlar [33].

MMP'ler embriyogenezis, hücre hareketliliği, anjiogenezis, ovulasyon, embryo implantasyonu, menstrüasyon ve endometriyal çoğalma gibi fizyolojik durumlar da önemli rol oynamaktadır [34]. MMP'ler yukarıda geçen fizyolojik olayların yanında tümör invazyonu ve metastazı gibi bir takım patolojik olaylarda rol oynarlar [35].

MMP'ler karakteristik olarak multidomain yapıya sahiptir.

1- Pre pro domain

2- Prodomain

3-Katalitik domain

4-Menteşe bölgesi

5-Hemopexin domain

Hücreden salgılanma sırasında sinyal peptit direkt salınır. Propeptit ise pro MMP'nin latent formda kalmasını sağlar, katalitik bölge ise yüksek korunmuş Zn⁺ bağlayan bölge, menteşe bölgesi ise prolinden zengin bölgedir. Hemopeksin benzeri bölge ise MMP'lerin substrat spesifitesini belirler ve endojen inhibitörlerle etkileşimini belirler [36]. Katalitik bölgenin aktif merkezinde çinko atomu ve çinko atomuna bağlı korunmuş sistein aminoasiti bulunur.

Basit olarak substrat spesifikliğine, dizi benzerliğine, domain yapısına göre MMP'ler 6 gruba ayrılmıştır.

1. Kollajenazlar

2. Stromelizinler

3. Jelatinazlar

4. Matrilizinler

5. Membran-tip MMP'ler (MT-MMP)

6.Diğer MMP'ler

2.4 MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-7 (MMP-7)

Matriks metalloproteinaz MMP -7 matrilizin olarak da bilinir ESM'in proteolitik aktivite sergiler [32]. Anjiogenez, metastaz, invazyon, hücre büyümesi tümör oluşumunun birçok basamağında yer alır ve kanser dokusunda sıklıkla eksprese olur.

MMP-7(Matrilizin) 28 kDa ağırlığında proenzim olarak salgılanır; N terminalinden 9 kDa 'luk prodomain parçası kaldırılarak aktive olur.

MMP-7 polarize glandüler epitelyumdan eksprese edilen MMP ailesinin bir üyesidir [37]. Bundan dolayı MMP-7 fonksiyonu, basolateral ya da apikal (her ikiside) kompartmana salınarak birçok substratla etkileşime girebilir. MMP-7 normal meme ve parotid bezlerin duktal ve glandüler epitelinden, karaciğer, pankreas, prostat, peribronşial bezlerden temel olarak eksprese edilmektedir [38]. İmmünohistokimyasal analizlerde hücre yüzeyi ya da hücre içinde glandüler epitelde primer olarak apikal ve lümende çok az da basolateral boyama gözlenmiştir [38]. MMP-7 doğuştan bağışıklıkta, akciğer ve bağırsak gibi organlarda prodefinsinler gibi antibakteriyel peptitleri aktive ederek koruyucu rol oynar [39]. Tümör progresyonu sırasında benign ve malign tümörlerin epitelinden eksprese edilebilmektedir. MMP-7 proteoglikanlar, agrekan, vitronektin, tip IV kollajeni gibi geniş bir ESM substrat spesifikliğine sahiptir (Tablo 6) [40]. Matrilizin diğer MMP'ler gibi hücre yüzey moleküllerinin ektodomainini kesmede önemli rol oynar. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α) Fas ligand (FasL), heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF), E-kadherin ve β 4-integrin moleküllerin ektodomainini keser. TNF- α , FasL, ve HB-EGF apikal bölgede lokalize; E-kadherin, β 4-integrin ve çeşitli ECM komponentleri bazolateralde lokalizedir[32]. Matrilizin sekresyon mekanizması henüz net değildir [38]. Latent MMP-7 öncelikle basolateral kompartmana salınır. MMP-7 apikal kompartmanda daha aktiftir [32]

Tablo 5. Matrilizin'in biyokimyasal süreçlerle ilişkisi [32]

Fonksiyon	Substrat	Lokalizasyon
Degradasyon	Elastin	ESM
	Tip IV kollojen	ESM
	Fibronektin	ESM
	Vitronektin	ESM
	Agrekan	ESM
	Proteoglikan	ESM
	IGFBP-1-2-3-4-5-6	Serum
	Plazminojen	Serum
Aktivasyon	ADAM 28	Lenfosit, bazı kanser hücreleri
	İntensin α 1 a-defensin	İnce bağırsak kriptlerindeki Paneth hücreleri
	proMMP-2	Çeşitli
	pro MMP-9	Çeşitli
Kesme	β 4 – integrin	Hücre yüzeyi

	E-kadherin	Hücre yüzeyi
	FasL	Hücre yüzeyi
	ProHB-EGF	Hücre yüzeyi
	TNF- α prekürsörü	Hücre yüzeyi

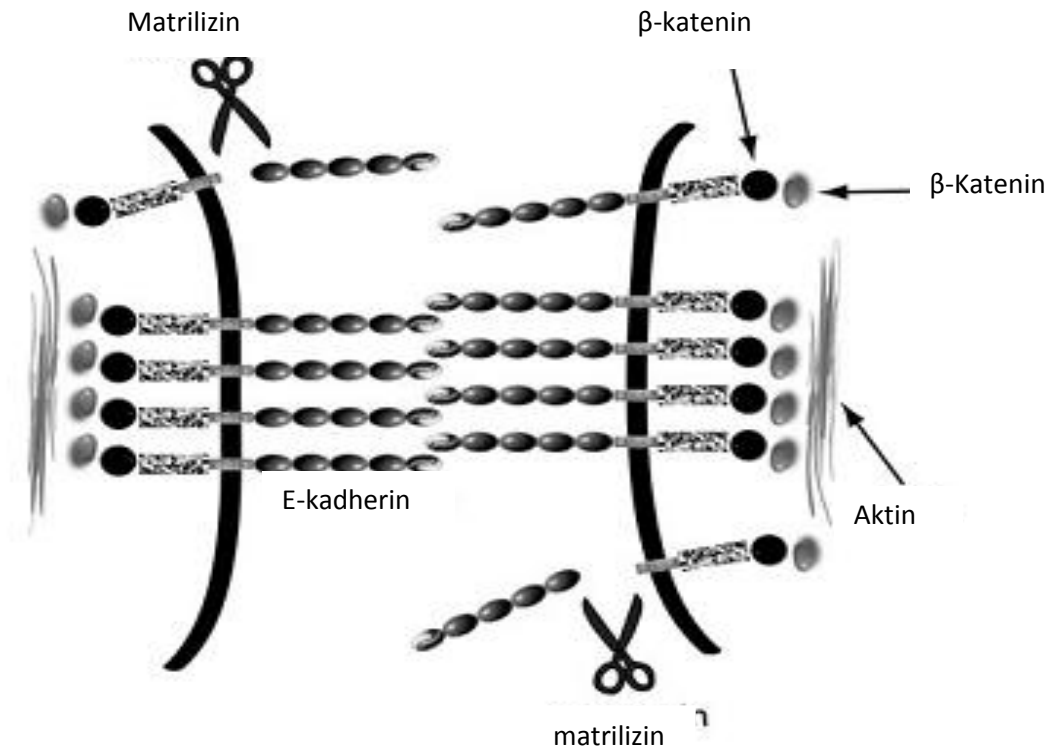
MMP'lerin çoğu predominant olarak stromal hücrelerden üretilmesine rağmen MMP-7'yi de kapsayan bazı MMP'ler tümör hücrelerinden eksprese olmaktadır. Bu üretim tedavi hedefi ve agresif fenotip için biyolojik belirteç olarak yararlı olabilir.

MMP-7 çeşitli epitelyal ve mezenkimal tümörlerde overeksprese edilebilmektedir. MM-7 sindirim sisteminin invaziv kanserlerinde özefagus [41], mide [42], kolon [43], karaciğer [44], ve pankreas [45] aşırı ekspresyonu bulunmuş. Kolorektal kanserde neoplastik bezlerin lümenal yüzlerinde apikal boyanma saptanırken, kanser hücrelerinin stoplazmasında invazyon öncesi diffüz ve basolateral boyanma görülmektedir [46].

2.4.1 Kanser İnvazyonunda MMP-7'in Rolü

MMP-7 kanser invazyonuna ESM substratlarını proteolitik olarak parçalayarak kanser büyümesine yol açar. Matrilizin ekspresyonu ile özefagus, mide, kolon, karaciğer ve pankreas kanser invazyonu arasında ilişki bulunmuştur.

Matrilizin non-ESM proteinleri aktive ederek tümör invazyonunun düzenlenmesini sağlamaktadır. Transmembran protein olan E-kadherin kateninlerin stoplazmik ucu ile etkileşerek hücre adezyonunda pozitif düzenlenmesinde rol oynar. MMP-7 ve MMP-3 E-kadherinin ektodomaini keserek çözünür hale getirir [47]. Çözünür E-kadherin parakrin yolda E-kadherinin fonksiyonlarını inhibe ederek tümör hücrelerinin invazyonunu ve migrasyonunu arttırır.



Şekil 2: MMP-7 tarafından E-kadherin bağlantılarının kesilmesi [32]

2.4.2 MMP-7'nin Kanser Büyümesindeki Rolü

MMP-7 tümörleşmenin erken evresinde etkilidir [48]. MMP-7 HB-EGF'ün ektodomainini keserek olgun hale getirir, bu da ErbB4 reseptörünü aktive ederek hücre çoğalmasını artırır ve apoptozu inhibe eder [49].

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) tümör oluşumunda mitojenik ve antiapoptotik etkileri ile önemli rol oynar. IGF'nin biyoaktifliği IGF bağlayan proteinlerle etkileşerek düzenlenir. Son yıllarda matrilizinin tüm IGFBP (1-6)'i parçaladığı böylece kanser hücrelerinin büyümesini ve yaşamasını sağladığı bildirilmiştir [50].

ADAM 28 matrilizinin substratıdır. MMP-7 tarafından aktive olan ADAM 28, IGF-3'ün hem serbest hem de IGF-I ve IGF-II ile kompleks oluşturan formunu parçalayabildiği belirlenmiştir.

2.4.3 Apopitozda MMP-7'in rolü

Apoptoz programlı hücre ölümüdür. FasL, Fas reseptörünün transmembran uyarıcısıdır ve ana apoptoz tetikleyicisidir. Önceki çalışmalarda MMP-7 nin membrana bağlı FasL (mFasL) ektodomani parçaladığı bulunmuştur [51]. Çözünür sFasL'nin salınması, çevre hücrelerde apoptozu indükler. Çözünür sFasL'nin mFasL'ye kıyasla daha düşük apoptotik potansiyel taşıması ve çoğu kanser hücrelerinin sinyal iletim kaskatında bulunan bazı proteinlerin düzeyindeki anormallikler nedeni ile Fas aracılı apoptozda rölatif olarak dirençlidir.

2.4.4 MMP-7'nin Anjiyogeneze rolü

Anjiyogeneze yeni kan damarı gelişimi ve yeniden damarlanma ile ilişkili bir süreçtir. Anjiyogeneze esnasında MMP'ler yeni kapiller damarların oluşumunda önemli rol oynar. İmmünohistokimya ve in situ hibridizasyon yöntemi ile matrilizin pozitif tümör hücrelerinin yanında vasküler endotelial hücrelerde matrilizin mRNA ve proteini saptanmıştır [52]. Gastrik kanserde matrilizin ekspresyonu ile mikro damar yoğunluğunda artış immünohistokimyasal olarak gösterilmiş ve korele bulunmuştur [53].

Diğer taraftan MMP'lerin antinajiyogenetik etkileri de vardır. MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12 dolaşımda anjiyogeneze inhibitörü olan anjiostatin fragmenti üretebilmek için plazminojeni parçalama yeteneğine sahiptir. Anjiostatin endotelial hücre çoğalmasını azaltır ve endotel hücre apoptozunu indükleyerek tümör büyümesini inhibe eder. Endostatin diğer bir anjiyogeneze inhibitörüdür. Endostatin içeren bir fragment tip XVII kollajen İn vitro MMP-20, MMP-13, MMP-9, MMP-7 ve MMP-3; in vivo MMP-7 tarafından oluşturulmaktadır [54].

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) anjiyogenin potent mediyatörlerinden biridir. MMP-3, MMP-9, MMP-7, MMP-19 VEGF'nin matrix bağımlı isoformlarını ayırır ve çözünebilir formları salgılar.

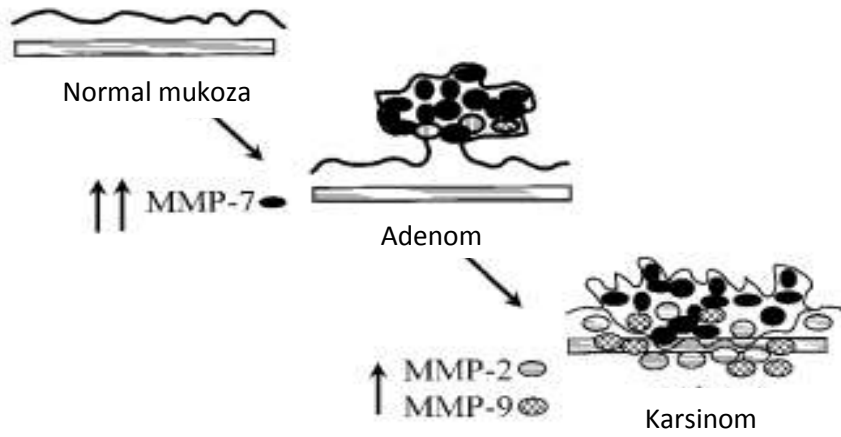
MMP-7 ve diğer MMP'ler tümör anjiyogenezi üzerinde hem proanjiyogenik hem de antianjiyogenik etki göstermektedir

2.4.5 Kolorektal Kanser ve MMP-7

Birçok erken evre kolorektal kanserde ve ilişkili hayvan modellerinde tümör oluşumunda MMP-7 birikiminin olduğu gözlenmiştir. Kolorektal adenomların varlığında hem matrilizin mRNA hemde matrilizin aktivitesi saptanmış ayrıca kolorektal adenom hücrelerinin stoplazmasında MMP-7 immunoreaktivitesi saptanmıştır [55]. MMP-7 yokluğunda intestinal tümör gelişimi baskılanır. KRK 'nin karaciğer metastazının oluşmasında MMP-7'nin rolü olduğu kanıtlanmıştır. Karaciğer metastazında hem MMP-7 mRNA'sı revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu ile kalitatif olarak, MMP-7 proteini immunoblotting, zimografi ve immunohistokimyasal kombinasyonu ile saptanmış [56]. FAP'li hastalarda tüm poliplerde büyüklüğü ya da displazi ne olursa olsun MMP-7 aşırı ekspresyonu saptanmış, bu ekspresyon hem büyüklük hem de displazi ile korele bulunmuştur [57]. Primer tümör hücrelerinin invazyonu ile MMP-7 ekspresyonu ilişkili bulunmuştur [57].

MMP-7 nin adenom-karsinom dönüşümünde erken dönemde yükseldiği görülmüştür, karsinom oluşumunda ise MMP-2 ve MMP-9 yüksekliği görülür [58]. (Şekil 3)

Son yapılan bir çalışmada ise fekal COX-2 ve MMP-7 mRNA düzeyleri kolorektal kanserli olgularda yüksek bulunmuştur [9].



Şekil 3: MMP-7 aşırı ekspresyonu ve kolorektal normal mukozanın adenom ve karsinoma ilerlemesi [58].

2.5. MMP'lerin İnhibisyonu

MMP'leri inhibe eden bazı faktörler tanımlanmıştır. Bunlardan biri, genel proteinaz inhibitörü olarak bilinen ve yüksek molekül ağırlığı nedeni ile dokulara girmesi zor olan α -2 makroglobulin diğeri ise antikollojenaz aktiviteye sahip serum C-reaktif proteindir [59]. Bunun yanı sıra bazı spesifik MMP'lerin doku inhibitörleri (TIMP'ler) tanımlanmıştır. İn vivo koşullarda, MMP aktivasyonunun regülasyonunda TIMP'ler önemli rol oynar [59].

2.5.1 Metalloproteinazların Spesifik Doku İnhibitörleri (TIMP'ler)

İnsan da 4 tane TIMP (1-2-3-4) tanımlanmıştır. Bunlar birçok doku ve vücut sıvısından eksprese edilebilir. TIMP'ler doğal MMP inhibitörleridir, MMP'ler ile nonkovalent 1:1 sitokiometrik kompleks oluştururlar [60]. TIMP'lerin farklı bir etkileri de proMMP'lerle etkileşirler ve ekspresyonlarını düzenlerler.

TIMP-1, TIMP-2 ve TIMP-4 çözünür formda iken TIMP-3 matrikse sıkıca bağlıdır. TIMP-4'ün ekspresyon paterni diğeri TIMP'lerden farklıdır çünkü TIMP-4 mRNA beyin ve kalpte lokalizedir [61]. TIMP'ler MMP'lere bağlanmanın yanında proMMP'lerle kompleks

oluşturarak MMP aktivasyonunu düzenler [62]. TIMP-1 proMMP-9 ile kompleks oluşturur. TIMP-2 proMMP-2 ile kompleks yapar enzim aktivasyonunu kolaylaştırır. TIMP-3 hem proMMP-2 hemde proMMP-9'a bağlanır. TIMP-4'de proMMP-2'nin c terminal parçasına b [62].

TIMP-1 ile TIMP-2'nin %40 aminoasid dizisi (özellikle N terminal bölgesi) homologdur [62]. (Tablo 7)

Tablo 6. TIMP'lerin moleküler özellikleri [62]

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Kromozomal lokalizasyon	Xp11.23-11,4	17q23-17q25	22q12.1-22q13.2	3p25
mRNA	0,9	3,5-1	5	1,4
Moleküler kütle (kDa)	28,5	21	22/27	22
N glikozilasyon bölgeleri	2	0	1	0
Protein lokalizasyonu	Çözünür	Çözünür/hücre yüzeyi	ESM	Çözünür/hücre yüzeyi
Pro MMP ile ilişkisi	proMMP-9	Pro MMP-2	proMMP-2/-9	proMMP-2
MMP'ler ile zayıf inhibisyon	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP	Yok		Yok

ADAM inhibisyon	MT5-MMP	Yok	ADAM 12 ADAM 17 ADAM 19 ADAM 10 ADAMTS-4,TS-	
	MMP-19 ADAM 10			
Ekspresyon	Uyarılabilir	Sabit	Uyarılabilir	Uyarılabilir

2.5.2 TIMP-1

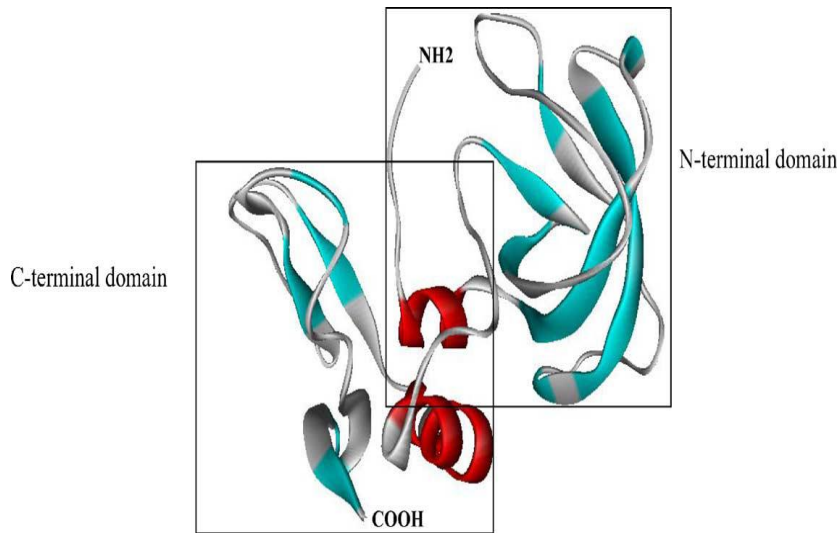
TIMP-1 6 disülfid bağına sahip 12 sistein rezidünün protein içinde iki domain yapı oluşturmasıyla meydana gelir. Bu disülfid bağları TIMP-1'e pH, sıcaklık, denature edici durumlara karşı dayanıklılık sağlar. N-terminal domain MMP inhibitör aktivitesi içerir [63]. TIMP-1 geni Xp 11.23-11.4'de lokalize 184 aminoasit içeren 28.5 kDa ağırlığında bir proteindir [64]. (Tablo 6)

TIMP-1 birçok doku, hücre ve vücut sıvısından salınmaktadır. TIMP-1 proteini prekürsör, serbest TIMP-1, proMMP-9 ile 1:1 sitokiometrik kompleks halinde yada membrana bağlı olmayan MMP'lerin proteolitik aktivitelerini inhibe edici halde bulunabilirler. Ekstrasellüler aralığa salınan TIMP-1 sinyal peptid içerir.

2.5.2.1 TIMP-1 ve MMP inhibisyonu

TIMP-1'in ana fonksiyonlarından biri MMP inhibisyonudur. MMP ailesi 25'den fazla üyesi tanımlanmış bazal membranı da kapsayan ekstrasellüler matriksin birçok komponentini parçalama yeteneğine sahip çinko bağımlı endopeptidazlardır [65]. TIMP-1 proteinin N terminal kısmı MMP inhibisyonun sorumludur. Murphy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada

Timp-1'in N terminal parçası ile rekombinant TIMP-1'nin MMP aktivitesini inhibe etme yetenekleri arasında fark bulunmamıştır. [63]. (Şekil 4)



Şekil 4: TIMP-1'in yapısı [62].

Hücre yüzeyinde TIMP-1'e spesifik bağlayıcı protein saptanmıştır. İnsan meme kansinomu hücre hattında (BC61) 80 kDa transmembran proteinin TIMP-1 için yüksek affinite gösterdiği bulunmuştur [66].

2.5.2.2 TIMP-1 ve Hücre Çoğalması

TIMP-1 MMP inhibisyonundan bağımsız olarak osteosarkoma, lenfoma, keratinosit, aortik düz kas ve meme kanseri hücrelerini kapsayan insan ve sığır hücre çoğalmasını uyarır. TIMP-1 hücre yüzeyine bağlanır; Ras sinyal iletim kaskadı başlatılır. Ras ekstrasellüler regülatör kinaz (ERK)'ın fosforilasyonunu artırır, Raf-1/tirozin kinaz/mitojen aktivite protein kinaz(MAPK)'ı ve fosfoinositol 3 kinaz (PI3K) sinyal yollarının aktivasyonu siklin D1 ekspresyonuna yol açar [66]. Tümör süpresör fosfataz ve Tensin(PTEN) homologu EGF(epidermal growth faktör) indüklediği TIMP-1 ekspresyonu Akt fosforilasyonunu önleyerek inhibe ettiği ve böylelikle IP3K yolunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Böylelikle araştırmacılar EGF'nin indüklenmesi ile ERK ve MAPK yolları tarafından TIMP-1

ekspresyonuna neden olduğunu gösterdiler [67]. TIMP-1'in alkalizasyonu ile proteinaz inhibitör etkisi elimine edildiği halde büyüme uyarıcı etkisi kaybolmamıştır. Farklı araştırma gruplarında büyüme uyarıcı etkisi doz bağımsız olabilir, K562 hücre hattıyla yapılan deneyde TIMP-1'in otokrin büyüme etkisi yapabileceği öne sürülmüştür [68].

Bu otokrin büyümenin TIMP-1'in MMP inhibisyonundan çok ekstrasellüler matrikse bağlı büyüme faktörlerinin salınımının inhibisyonu, büyüme faktörü bağlayan proteinlerin yıkımının inhibisyonu, sitokin yolunun inhibe olması TIMP-1'in antiapoptotik fonksiyonlarından kaynaklandığı belirtilmektedir [69].

2.5.2.3 TIMP-1 ve Apoptozis

Antiapoptotik mekanizma Rat ve insan stellat hücrelerinde TIMP-1 'in MMP'lerin aktivasyonunun inhibisyonu ile gösterilmiştir. Mutant TIMP-1 protein ile hem MMP inhibisyonu hem de antiapoptotik yeteneği olanaksız hale gelir [65]. Ekstrasellüler matriks'in MMP ile yıkımı apoptozisin moleküler etkileri (örn: kaspazlar) meme epitelyal hücrelerinde hem in vivo hem de in vitro apoptotik hücre ölümüne ve farklılaşmada azalmaya yol açar. TIMP-1 N-kadherin ayrılmasını inhibe eder böylelikle fibroblastların hücre hücre temasına aracılık eder ve apoptozis önlenir [65].

Burkit lenfomalı hücre hattında yapılan çalışmada MMP'den bağımsız antiapoptotik yol gösterilmiştir. Bu çalışmada TIMP-1 ekspresyonu ve apoptoza direnç arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Rekombinant TIMP-1'in apoptozisi inhibe etmesine ek olarak anti TIMP-1 antikoru TIMP-1 sekresyonunu inhibe eder ve 4 kat apoptozisi artırır [65]. Farklı çalışmalarda PI3 yoluyla ya da fokal adezyon kinaz'ın aktivasyonunun indüksiyonu ile TIMP-1'in sinyalinin başlatıldığı, Akt ve bad fosforile olduğu antiapoptotik protein Bcl-X_L ekspresyonunun arttığı, kaspas kaskadının aktivasyonunun önlediği gösterilmiştir [70].

2.5.2.4 TIMP-1 ve Anjiogenezis

Anjiogenik süreç (endotelyal büyüme, migrasyon ve ESM ile etkileşim); büyüme faktörleri, sitokinler, proteinazlar ve proteinaz inhibitörleri gibi birçok faktörden etkilenir. TIMP-1'in pro-anjiogenik etkileri yanı sıra anti-anjiogenik etkileri de rapor edilmiştir. Proanjiogenik mekanizma TIMP-1'in MMP inhibisyonundan kaynaklanabilir. Cornelius ve

ark.; plasminojen bağı MMP'nin farklı tiplerinin anjiogenezisin bilinen bir inhibitörü olan biyolojik fonksiyonlu anjiostatini oluşturduğunu göstermişlerdir. Wen ve ark. anjiogenezisin potent bir inhibitörü olan endostatinin MMP inhibitör ve elastaz aktivitesi aracılıklı olarak anjiogenezisi inhibe ettiğini göstermişlerdir. TIMP-1 anjiogenezis inhibitörlerini inhibe ederek anjiogenezisi stimüle eder [71].

TIMP-1'in antianjiogenik etkisinin MMP inhibisyonundan bağımlı ya da bağımsız olarak endotelial hücrelerin migrasyonun da azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Akahane ve ark.; hem TIMP-1 hemde sentetik MMP inhibitörlerinin doz bağımlı şekilde endotelial hücre migrasyonunu baskıladığını, böylece MMP inhibisyonu ile anjiogenezis inhibisyonu ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bu inhibisyon platelet endotelial hücre adezyon molekül-1 (PECAM-1) ve vasküler endotelial kadherin ekspresyonunun artması ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır [65].

2.5.2.5 Kolorektal kanserde TIMP-1'in yeri

Newell ve ark. adenom, insitu karsinom ve invaziv adenokarsinomda hem epitelyum hemde stromal hücrelerde TIMP-1 mRNA ekspresyon artışı gözlemlemişler. TIMP-1 mRNA ekspresyonu ile evre ilerlemesi arasında korelasyon gözlenmiş, TIMP-1'in mRNA ekspresyonunun stromal komponentte epitelyal komponentten anlamlı olarak fazla olduğu gözlenmiştir. Diğer araştırmacılar ise kolorektal adeno kanser (n=26) ve karaciğer metastazında (n=10) TIMP-1 mRNA ekspresyonunun stromada yüksek olduğunu bulmuşlardır. TIMP-1 mRNA ekspresyonun tümörü çevreleyen fibroblast benzeri hücrelerde görüldüğü kanser, epitelyal hücrelerinde sinyalin yok ya da çok zayıf olduğu gözlenmiştir [72]. Benzer şekilde immunohistokimyasal çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. TIMP-1 immunoreaktivitesi kolon adeno ca (n=20), kolon adenom (n=7), normal kolon (n=6) bağ dokusu ve bazal membranında tespit edilmiştir. Adenokarsinomlarda neoplastik hücre topluluklarına yakın stromada (fibroblast ve kollojen fibriller) güçlü TIMP-1 aktivitesi gözlenmiş, fakat neoplastik epitelyumun küçük bir kısmı boyanmıştır. Diğer bir çalışmada TIMP-1 protein ekspresyonu kolonik polip, adenom (n=29), hem de adenokarsinomda (n=25) stromal ve epitelyum hücrelerinde bulunmuştur. Bu çalışmada boyamanın yoğunluğu

hiperplastik polipten tubülovillöz adenoma ve adenokarsinoma doğru artış göstermektedir [73].

Kolorektal kanser izleminde klasik belirteç CEA önerilmektedir [74]. CEA post operatif kullanıldığında hastaların azımsanmayacak kısmında yüksek rekürrens riski, lokal rekürrens riski ve uzak metastazı saptamada kötü sonuçlar vermiştir [75]. Minimal rezidü hastalığı saptamak için yeni belirteçlere ihtiyaç vardır. Bu belirteçler erken müdahale ile birlikte hastaların çoğunda iyileşmeye olanak sağlamalıdır.

Erken tanıda yaygın olarak kullanılan biyokimyasal belirteçin olmaması araştırmaları bu yöne çekmiştir. Ayrıca postoperatif kolorektal kanserli hastalarda hem rekürrens ve metastazın erken saptanmasında ve önleyici tedavi seçiminde biyokimyasal belirteçlere ihtiyaç vardır. Doku ve vücut sıvılarında TIMP-1'in kantitasyonu için ölçüm yöntemleri mevcuttur. Özellikle TIMP-1'in güçlü antiapoptotik etkisi yeni antikanser tedavi hedefleri olabilir.

2.5.2.6 TIMP-1'in Saptanması

TIMP-1 vücut sıvılarında ve doku ekstraktında immunoassaylar kullanılarak saptanabilir. Preanalitik birçok değişkenden etkilenebilir. Bu değişkenler yaş, cinsiyet, etnik köken ve egzersizdir. TIMP-1 çalışmalarının çoğunda yaş ile artış bulunmuş, oysa Tayebjee ve ark. TIMP-1 seviyeleri ile yaş arasında ters ilişki bulmuşlar. Etnik kökenin TIMP-1 üzerine etkisi görülmezken egzersiz ile %10 kadar arttığı gözlenmiştir. Kan örneklerindeki TIMP-1 seviyeleri trombositlerdeki alfa granüllerde depolandığından kontaminasyondan etkilenir. Bu bağlamda TIMP-1 seviyeleri serum örneğinde plazmadan %30-75 daha fazla olabilir [76]. Son yıllarda fekal TIMP-1'in bazı fekal proteinlerle kombinasyonu incelenmeye başlanmıştır. Fekal örnekler immunoassaydan önce ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuşlardır [77]

2.6. Siklooksijenaz 2 (COX-2)

Eikozanoidler araşidonik asitten derive olan kimyasal maddelerdir. Tüm vücut hücreleri ve sıvılarında bulunurlar. Eikozanoid ailesi prostoglandinler (PG), prostosiklinler, lökotrienler, lipoksinleri kapsar. Bunların sentezi için iki enzimatik yol gereklidir; siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz. Prostaglandin, prostosiklin, tromboksan, COX-2

enzimleri tarafından sentezlenirler ve vazokonstriksiyon, vazodilatasyon, platelet agregasyonu ateş reaksiyonu ve ağrı hassasiyetine neden olurlar. Bilinen COX'nın iki tane izoformu vardır; COX-1 ve COX-2. Son yıllarda 3. form olarak COX-1'nin parçalanması ile oluşan COX-3 tanımlanmıştır [78]

Non selektif COX-1 ve COX-2 inhibitörlerinin uzun dönemde KRK oluşumundan bireyleri koruduğu bilinmektedir. COX-2 ekspresyonu adenomlarda %50, adenokarsinomlarda %85 oranında artmıştır [79]. Bu artış KRK'li hastalarda kötü prognozla ilişkilidir [80]. Düzenli NSAİİ (Non steroid antiinflamatuvar ilaç) kullanımının KRK gelişme riskini %40-50 azalttığı gösterilmiştir [80]. Kolon tümörlerinde yüksek COX-2 ekspresyonu görülürken aspirin kullanımının bu riski azalttığı bulunmuştur [81]. Özellikle COX-2 aşırı ekspresyonu olan tümörlü hastalarda tanıdan sonra da aspirin kullanımı önerilmektedir [81].

COX-1 birçok dokudan yapısal olarak eksprese edilirken COX-2 normal dokuda (santral sinir sistemi, böbrek ve seminal veziküller hariç) saptanamaz, fakat çeşitli inflamatuvar ve mitojenik uyarı ile indüklenebilir [78]. COX-2'nin ekspresyonu antiinflamatuvar sitokinler (IL4, IL10, IL13) ve steroidler tarafından baskılanır [78]. Pro inflamatuvar enzim COX-2'nin, inflamatuvar barsak hastalarının kalın bağırsağında ve IL 10 eksik farelerin bağırsağında inflamasyonu indüklediği görülmüştür [82].

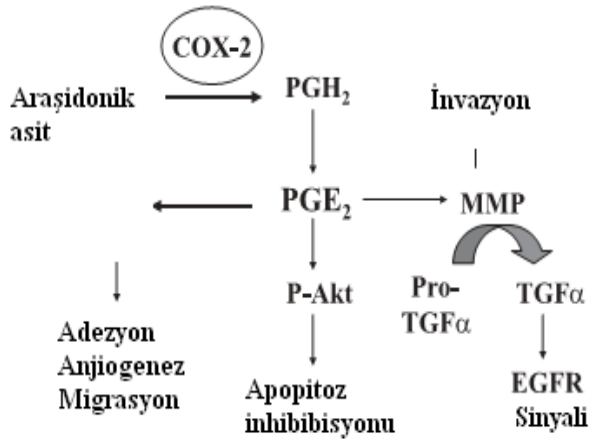
2.6.1 Kanser oluşumunda COX-2

Araşidonik asit metabolizması esnasında oluşan prostoglandin H sentaz farklı kimyasallara metabolize olur. Bir çok durumda, kimyasal metabolitler reaktif metabolitlere dönüşerek potansiyel karsinojenik aktiviteye ve mutajenik aktiviteye sahip olurlar. COX'un peroksidaz aktivitesi ile prokarsinojenler karsinojenlere dönüşür ve tümör formasyonu başlamış olur. Karaciğerde sitP-450 sistemi oksidatif reaksiyonları katalizler mutajenlerin formasyonu önlenir. Kolonda sit P-450'nin miktarı düşüktür ve COX'un peroksidaz aktivitesi tarafından yabancı maddeler mutajenlere okside olur [78].

Araşidonik asitin oksidasyonu sonucu üretilen malondialdehit gibi yüksek kimyasal reaktifler ve DNA ile eklenti yapan formlar oluşturur [83]. COX enzimleri çevresel, diyet, karsinojenler varlığında karsinogenezin geç ya da erken evresinde extra hepatik bölgelerde

polisiklik hidrokarbonlar ve heterosiklik ve aromatik aminlerin aktivasyon yolunu aktive eder [78].

Prostaglandin E_2 (PGE_2) konsantrasyonu COX-2 için önemli bir düzenleyicidir. PGE_2 'nin hücre yüzeyi reseptöründe homozigot delesyon sağlandığında APC mutasyonlu farelerde bağırsak polip büyüklük ve sayısında azalmaya neden olur. Bununla beraber diğer PGE_2 reseptörleri EP1 ve EP2'de homozigot yıkıcı gen hasarında APC'li farelerde bağırsak polip formasyonu etkilenmemiştir [84].



Şekil 6. PGE_2 'nin etkileri [84].

PGE_2 karsinogenezin ilerlemesi, invazyon, metastaz tümör damarlanmasını oluşumunda rol oynar. PGE_2 ekspresyonunun artması COX-2 ekspresyonunun artması ile ilişkilidir [84].

2.6.2 COX-2'nin İnvazyon ve Metastazdaki Yeri

İnvazyon ve metastaz kanserin yaşamı tehdit eden bir özelliğidir. Bunun oluşumunda matriks yıkılımı ve hücre hareketi önemlidir. Matriks metalloproteinazlar (MMP) matriksi

yıkan enzimlerdir. Onların ekspresyonu bazal membran ve stromanın tümör hücresi ile invazyonu kan damarlarının penetrasyonu ve metastaz ile sonuçlanır. Tsujii ve ark'nın yaptığı çalışmada insan kolon kanser hücrelerinde (CaCo-2) COX-2'nin metastaz üzerine etkisini araştırılmıştır. Kolon kanseri hücreleri (CaCo-2) COX-2 ekspresyonu yapan vektör ve aynı vektör ama COX-2'si eksik vektör hücrelere transfekte edilmiş. Bu iki CaCo-2 hücreleri karşılaştırılmış, COX-2 eksprese eden vektör ve kontrol hücreleri (COX-2 eksik transfekte edilen vektör) karşılaştırıldığında invazyon artışı COX-2 eksprese eden hücrelerde saptanmış. Bu fenotipte biyokimyasal değişiklikler MMP-2 aktivasyonu ile ilişkili bulunmuştur [85].

Deneysel kolonik karsinogeneze ise COX-2 ekspresyonunun aberrant kript odağındaki evreden metastatik karsinom evresine kadar olduğu tanımlanmıştır[86].

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. MATERYAL

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu tarafından verilen etik kurul onayı alındıktan sonra başlatıldı. (EK 1) Çalışmaya dahil olan tüm hastalardan ve kontrol grubundan bilgilendirilmiş onam formu alındı. (EK 2) Çalışmaya ülseratif kolit, crohn hastalığı gibi inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalar, son 3 gün içinde aspirin gibi NSAİİ kullanan hastalar alınmadı.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Gastroenteroloji AnaBilim Dalı endoskopi ünitesinde kolonoskopi esnasında kolon polipi (n=26) saptanıp biyopsi alınan ve yine kolonoskopik işlemde kolon kanseri (n=15) ile uyumlu bulguları saptanıp biyopsi alınan hastalardan EDTA'lı 10 ml'lik tüplere kan alındı. Hastaların kesin tanıları patoloji raporlarına uygun olarak kondu. Kolonoskopi sonucu normal (n=33) olan hastalar da kontrol grubuna dahil edildi. Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10dk santrifüj edilip -40°C'de analize kadar saklandı. Ayrıca hastalara dışkı kabı verilerek feçesleri istendi. Alınan dışkı örnekleri eppendorflara konularak -40°C'de analize kadar saklandı.

Tüm dışkı örnekleri buz üzerinde transfer edilerek -40°C'de saklandı. Feçeste TIMP-1, COX-2, MMP-7 ELISA yöntemi ile saptanmadan önce ekstraksiyon işlemi yapıldı [26] Ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen eluatlarda protein ölçümü yapıldı. Daha sonra

TIMP-1, COX-2, MMP-7 ELISA çalışmaları için dilüsyonlu ön denemeler yapılarak işlem öncesi yapılacak dilüsyon miktarı belirlendi.

Hastaların klinopatolojik verileri hastane bilgi işlem sisteminden alındı. Klinopatolojik veriler, polip için tiplendirme (Tübüler, Tübülovillöz, Villöz), polip boyu; tümör için yaş, cins, tümör boyutu, tümör yeri, differansiyon derecesi, patolojik evre, perinöral invazyon, lenfatik invazyon, venöz invazyon olarak değerlendirildi.(Tablo 7 ve Tablo 8)

Tablo 7. Kanserli olguların klinikopatolojik parametreleri

Parametre	Sayı	%
Cinsiyet		
Erkek	6	40
Kadın	9	60
Yaş		
65≤	11	73,3
65>	4	26,6
Tümör Tipi		
Adenokarsinom	14	93,3
Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	1	6,6
Tümör Yerleşimi		
Kolon	7	46,6
Rektum	8	53,3
Tümör Boyutu		

5 cm <	6	60
5 cm ≥	4	40
Tümör Diferansiyasyonu		
İyi	9	90
Orta	1	10
Yüksek		
Uzak Metastaz		
Var	6	46
Yok	7	54
T evre	Sayı	%
Erken evre (Tis-T1-T2)	3	30
Geç Evre (T3-T4)	7	70
N evre		
N0	5	50
N1	3	30
N2	2	20
M evre		
M0	7	54
M1	6	46
Perinöral İnvazyon		
Var	1	10

Yok	9	90
Lenfatik İnvazyon		
Var	7	70
Yok	3	30
Venöz İnvazyon		
Var	1	10
Yok	9	90

Tablo 8. Polipli olguların klinikopatolojik parametreleri

Parametre	Sayı	%
Cinsiyet		
Erkek	14	53,8
Kadın	12	46,1
Yaş		
65≤	21	80,7
65>	2	19,2
Polip Boyu		
6 mm ≤	19	82,6
6 mm >	4	17,3
Polip Tipi		
Hiperplastik	3	13
Tübüler	16	69,5
Tübülovillöz	4	17,3

Tablo 9. Çalışmada kullanılan kitler

Kit Adı	Yöntem	Katolog no	Firma
Human TIMP-1	Enzim İmmunoassay	DMP700	R&D Systems
Human Total MMP-7	Enzim İmmunoassay	DTM100	R&D Systems
COX-2 ELISA Kit	Enzim İmmunoassay	CBA053	Calbiochem
CEA	Solid faz iki bölge sıralı kemiluminesans immunoassay	Immulin 2000 (SIEMENS)	DEÜTF Merkez laboratuvarı hizmet alımı

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1. Feçes Analizi

3.2.1.1. Feçes Ekstraksiyon Tamponu Hazırlanması

Ekstraksiyon tamponu 500 ml olacak şekilde hazırlandı. Tris 0,1 mol/L, pH 8.0, sitrik asit 0,1 mol/L, üre 1,0 mol/L, CaCl₂ 0.01 mol/L konsantrasyonları olacak şekilde gr olarak miktarları hesaplandı, saf suda kimyasallar çözüldü ve 4 °C’de saklandı. Kullanmadan önce her 100 ml’lik tampona 1 adet proteaz inhibitörü eklendi.

3.2.1.2. Feçes Ekstraksiyonu

Feçesler 100 mg olacak şekilde tartıldı. Daha sonra üzerine 2,5 ml ekstraksiyon tamponu eklendi. Tüp manuel olarak iyice karıştırdıktan sonra, 30 dk 4 °C’de çalkalayıcıda bırakıldı. Tüpler çalkalayıcıdan alınıp soğuk santrifüjde 1200 g’de 10 dk. santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası süpernatantlar alınarak 5 µm'lik cut-off'luk filtrelerle alındı. 5000 g'de 10 dk santrifüj edilip, oluşan elüatlar -80 °C'de saklandı.

Saklanan elüatlardan TIMP-1 için ön denemeler yapıldı. Ancak yaptığımız ön denemeler sonucunda TIMP-1 konsantrasyonlarının çok düşük çıkması üzerine dışkı elüatlarının daha konsantre olması gerektiğine karar verildi. Ekstraksiyon tekrar yapıldı.

İkinci ekstraksiyon işleminde feçes miktarları 150 mg olacak şekilde tartım yapıldı. Feçeslere 1,5 ml tampon eklendi. Böylece 10 kat konsantre etmiş olduk. Karıştırma elle değil doku homojenizasyonu için kullanılan tissuelyser II cihazında yapıldı.

Ekstraksiyon Protokolü

1. Feçesler 150 mg olacak şekilde tartıldı ve 2 mL mikrosantrifüj tüpünün içine bir tane paslanmaz çelik boncuk (5 mm çapında) konuldu ve ekstraksiyon tamponu eklendi.
2. TissueLyser rakları işlemiden en az 30 dk önce -20°C'de tutuldu.
3. Raklar TissueLyser (Qiagen-Almanya) cihazına yerleştirildi.
4. TissueLyser cihazında frekans 25 Hz , zaman 2 dakikaya ayarlandı.
5. Elde edilen homojenat 4°C'de 5000g de 10 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası süpernatantlar alınarak 5 µm'lik cut-off değerli filtrelerle alındı.
7. 5000 g'de 10 dk santrifüj edilip, oluşan elüatlar -80 °C'de saklandı.

3.2.1.3. Fekal Protein Tayini

3.2.1.2'den elde edilen süpernatantta bulunan protein konsantrasyonu Bisinkoninik Asit (BCA) yöntemi ile saptandı. Belirlenen protein değerleri, ELISA ölçümü ile dışkıda saptanan TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA değerinin hesaplanması için kullanıldı. TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri 1 µg protein başına hesaplandı. Yöntemin prensibi alkali koşullarda protein tarafından Cu^{2+} iyonunun Cu^{1+} iyonuna indirgenmesine ve BCA reaktifi tarafından

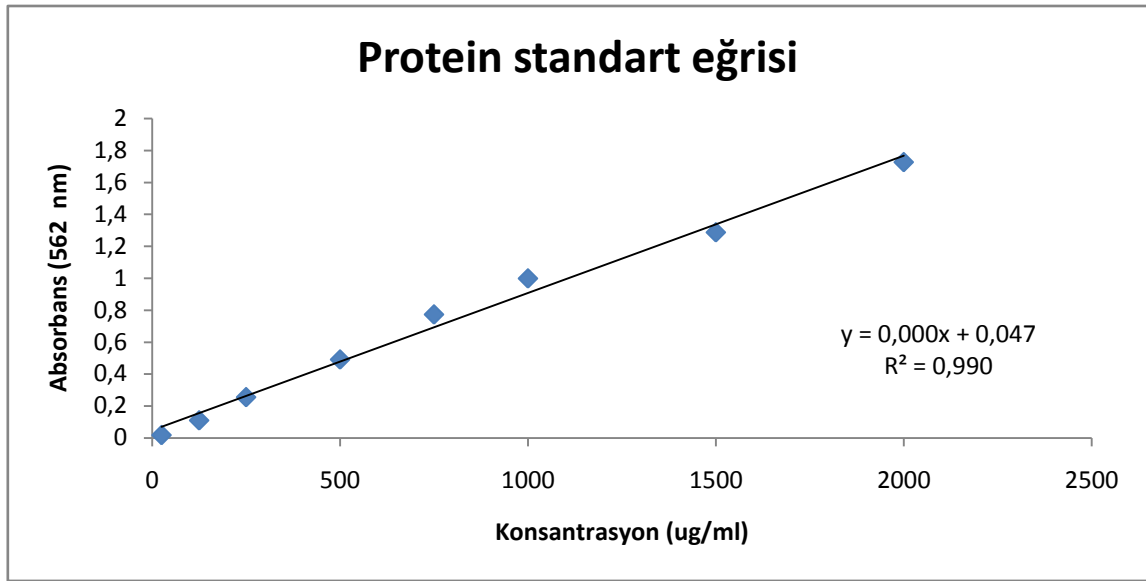
renk değişimine dayanmaktadır. Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 10'de gösterilmiştir.

Tablo 10. Protein tayininde kullanılan cihaz ve malzemeler

Mazeme/ Cihaz Adı	Markası	Kod Numarası
ELISA okuyucu	Bio-Tek	—
Pierce BCA kit	Thermo	23225

Uygulama Adımları

1. Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA), Kör olarak saf su kullanıldı.
2. Öncelikle farklı konsantrasyonlarda (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 µg/ml) BSA standardı hazırlandı.
3. İçerisinde bisinkoninik asit bulunan BCA A Reaktifi ve % 4 bakır sülfat içeren BCA B Reaktifi 50: 1 oranında karıştırılarak —Working Reagent hazırlandı.
4. 96 kuyucuklu bir mikropolaęa standart ve örneklerden 25'er µl konuldu.
5. Her kuyucuğa 200 µl —Working Reagent eklendi.
6. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
7. ELISA okuyucuda 562 nm'de örnek ve standartların absorbans değerleri okundu.
8. Elde edilen absorbans verilerine karşı standart konsantrasyonu grafiği çizildi ve bu standart grafiğinden yararlanılarak örneklerin total protein konsantrasyonu hesaplandı.



Grafik 1. Feçes protein standart eğrisi

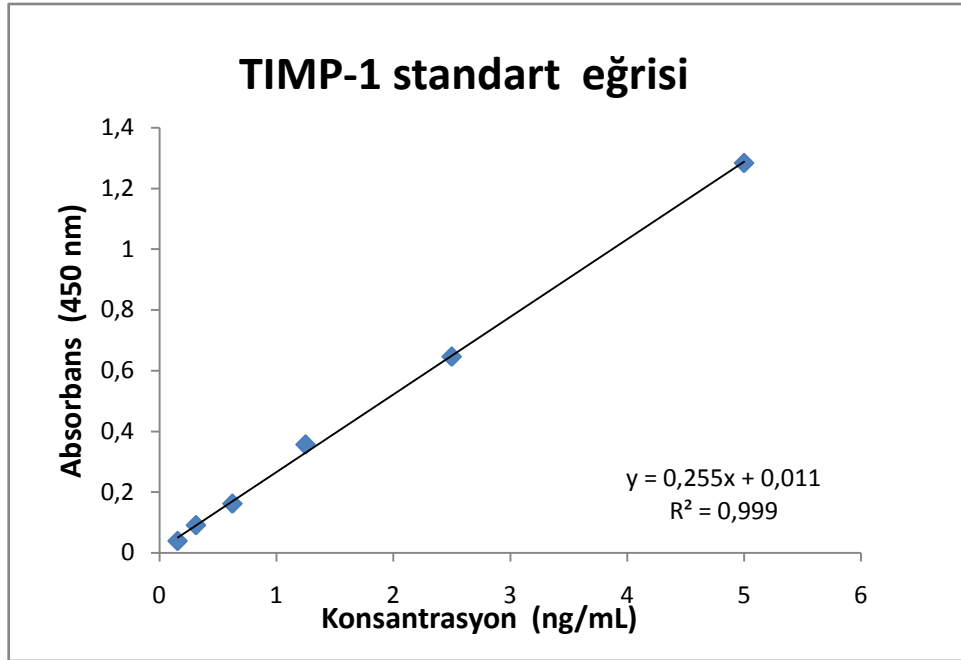
3.2.2 TIMP-1 Ölçüm Yöntemi

Test prensibi: Bu ölçüm de kantitatif sandviç enzim immunoölçüm yöntemi kullanılmıştır. Bu teknikte kuyucuklar TIMP-1'e spesifik monoklonal antikorlarla kaplanmıştır. Standartlar ve örnekler kuyucuklara pipetlendiğinde TIMP-1 varlığında antikorlarla bağlanma gerçekleşir. Yıkama yapılarak bağlanmayan komponentler uzaklaştırılır. Daha sonra TIMP-1'e spesifik enzim bağlı poliklonal antikorlar kuyucuklara konur. Tekrar yıkama yapılır bağlanmamış antikor-enzim reaktifi uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu eklenir, başlangıç basamağında bağlanan TIMP-1 miktarı renk yoğunluğuna orantılı olarak ölçülür. Renk değişimi durur ve renk yoğunluğu ölçülür.

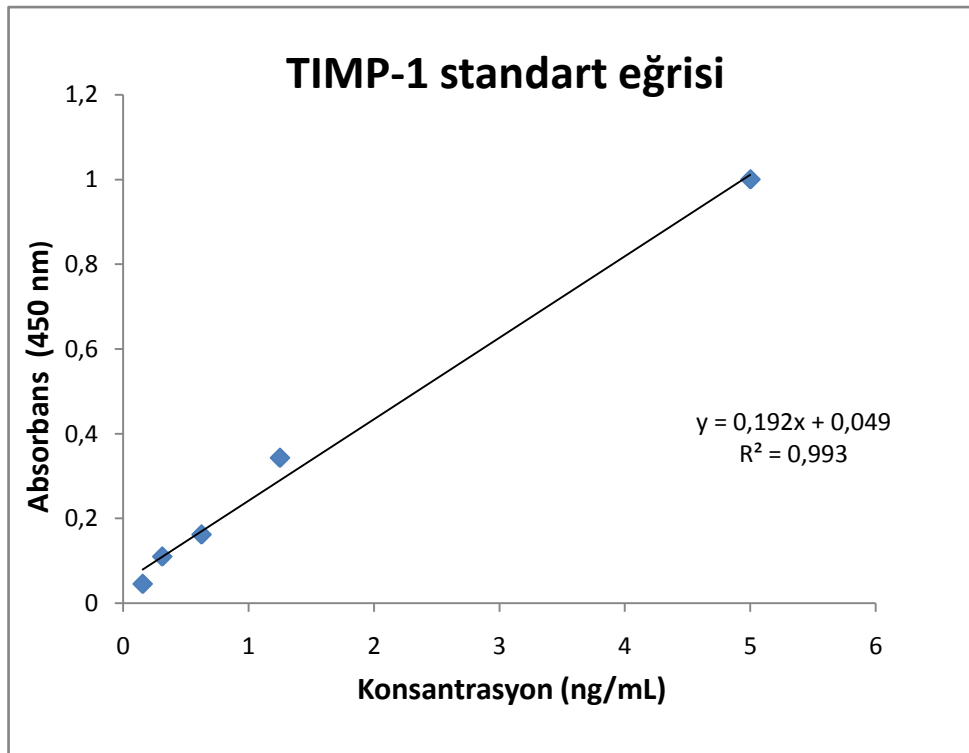
Standart Hazırlanışı ve Analiz Aşamaları:

- Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirilerek çalışıldı.
- 100 µL assay dilüent RD1 tüm kuyucuklara eklendi.

- Plazma örnekleri için ön dilüsyon çalışması (1/10, 1/50, 1/100) sonucuna göre 1/100 dilüsyon yapılarak çalışıldı. Dışkı ekstraktları ise ön dilüsyon çalışması sonucuna göre dilüe edilmeden çalışıldı.
- Hazırlanan 7 farklı konsantrasyonda standartlar (çift olarak) ve örnekler (çift olarak) kuyucuklara 50 ‘şer μL pipetendi. Kör olarak kalibratör diluent RD5P kullanıldı
- Plağın üstü kapatılarak 2 saat oda sıcaklığında yatay çalkalayıcıya ($500\pm 50\text{rpm}$) inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda içerik aspire edilip plak 3 kez 400 μL yıkama tamponu ile yıkandı.
- 200 μL TIMP-1 konjugatı her kuyucuğa eklendi. Üzeri kapatılıp çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda içerik aspire edilip plak 3 kez 400 μL yıkama tamponu ile yıkandı.
- Her kuyucuğa 200 μL substrat solüsyonu eklendi. 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Plak ışıktan korundu.
- 50 μL her kuyucuğa stop solüsyon eklendi.
- Optik dansite 450 nm’de okundu.(Düzeltilme dalga boyu 540 nm)



Grafik 2. Plazma TIMP-1 standart eğrisi



Grafik 3. Feçes TIMP-1 standart eğrisi

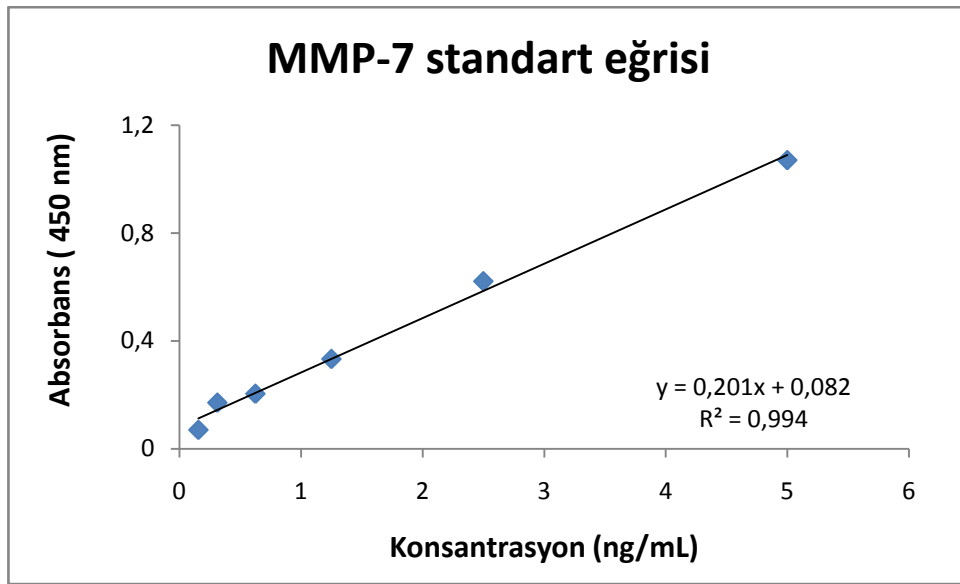
3.2.3 MMP-7 Ölçüm Yöntemi

Test prensibi: Bu ölçüm kantitatif sandviç enzim immunoölçüm yöntemi kullanılmıştır. Bu teknikte kuyucuklar MMP-7'e spesifik monoklonal antikorlarla kaplanmıştır. Standartlar ve örnekler kuyucuklara pipetlendiğinde MMP-7 varlığında, kaplı antikorlarla bağlanma gerçekleşir. Yıkama yapılarak bağlanmayan komponentler uzaklaştırılır. Daha sonra MMP-7'e spesifik enzim bağlı poliklonal antikorlar kuyucuklara konur. Tekrar yıkama yapılır bağlanmamış antikor-enzim reaktifi uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu eklenir, başlangıç basamağında bağlanan MMP-7 miktarı renk yoğunluğuna orantılı olarak ölçülür. Renk değişimi durur ve renk yoğunluğu ölçülür.

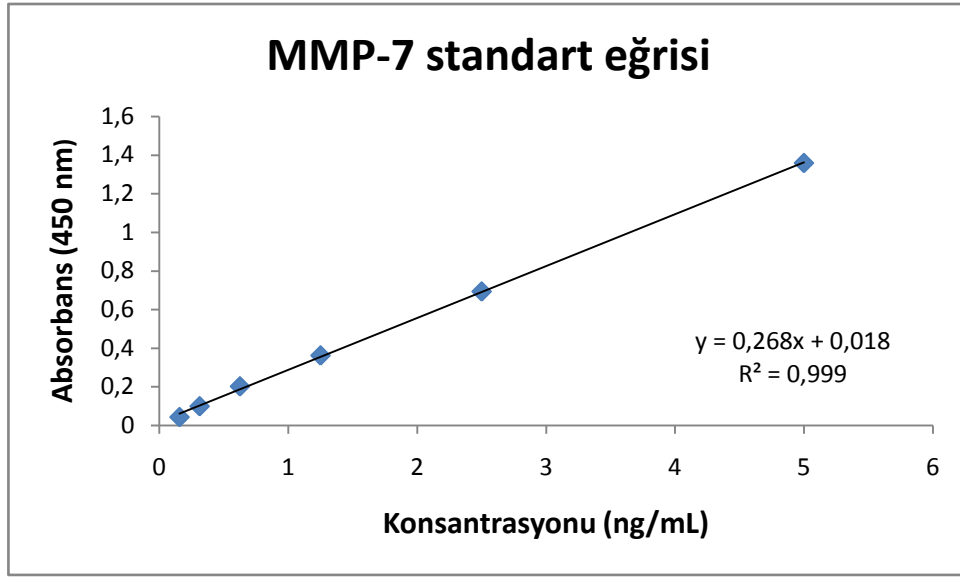
Standart Hazırlanışı ve Analiz Aşamaları:

- Plazma örnekleri için ön dilüsyon çalışması (1/10, 1/5) sonucuna göre 1/5 dilüsyon yapılarak çalışıldı. Dışkı ekstraktları ise ön dilüsyon çalışması sonucuna göre dilüe edilmeden çalışıldı
- Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirilerek çalışıldı.
- 100 µL assay dilüent RD1 tüm kuyucuklara eklendi.
- 50 µL örnekler kuyucuklara pipetlendi.
- Plâğin üstü kapatılarak 2 saat oda sıcaklığında yatay çalkalayıcıya (500±50rpm) bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda içerik aspire edilip plak 4 kez 400 µL yıkama tamponu ile yıkandı.
- 200 µL MMP-7 konjugatı her kuyucuğa eklendi. Üzeri kapatılıp çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı
-

- İnkübasyon sonunda içerik aspire edilip plak 4 kez 400 µL yıkama tamponu ile yıkandı.
- Her kuyucuğa 200 µL substrat solüsyonu eklendi. 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Plak ışıktan korundu.
- 50 µL her kuyucuğa stop solüsyon eklendi.
- Optik dansite 450 nm’de okundu. (Düzeltilme dalga boyu 540 nm)



Grafik 4. Plazma MMP-7 standart eğrisi



Grafik 5. Feçes MMP-7 standart eğrisi

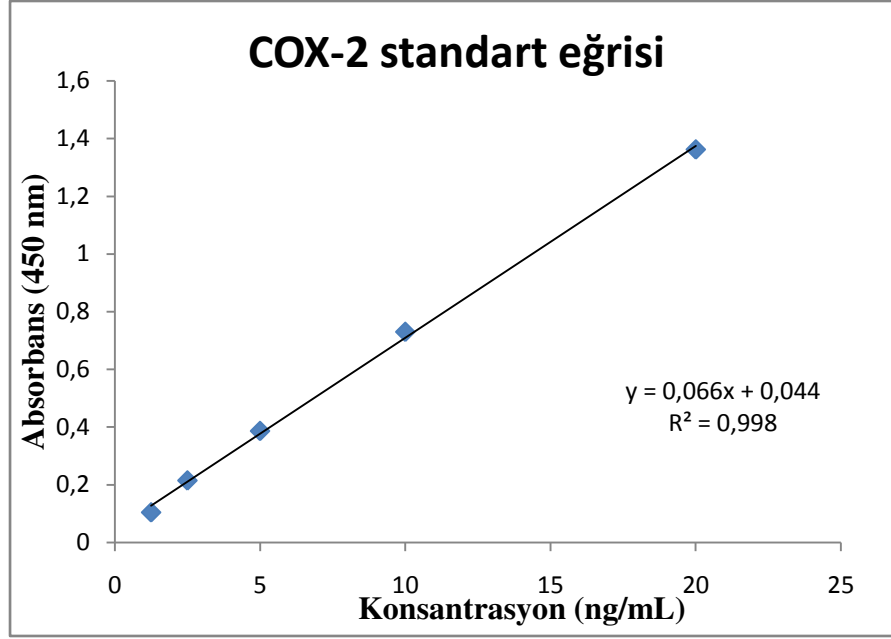
3.2.3 COX-2 Ölçüm Yöntemi

Test prensibi: COX-2'nin kantitatif ölçümünü sağlar. Plak tavşan anti –insan COX-2 poliklonal antikör ile kaplıdır. Standart ve örnekler kuyucuğa eklendiğinde COX-2 varlığında antikör ile bağlanır. COX-2 keçi anti-fare IgG HRP konjugat ve monoklonal anti-COX-2 antikörü ile tespit edilir. HRP konjugat varlığında TMB substrat mavi renk oluşumu ile sonuçlanır. Duyarlılığı artırmak için ELISA stop solüsyonu ilave edilir, sarı renk oluşur. Renk değişimi durur ve renk yoğunluğu ölçülür. Absorbans 450nm'de ölçülür. COX-2 seviyeleri standart eğriden hesaplanır.

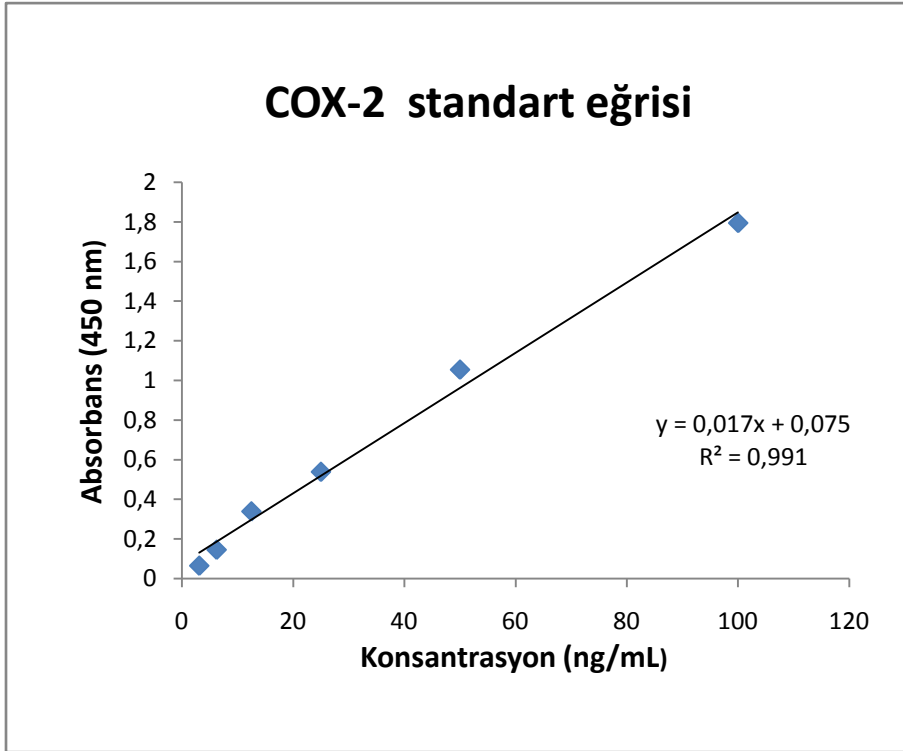
Standart Hazırlanışı ve Analiz Aşamaları:

- Plazma örnekleri için dilüsyon yapılmadan çalışıldı. Dışkı ekstraktları ise ön dilüsyon çalışması sonucuna göre dilüe edilmeden çalışıldı
- Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirilerek çalışıldı.

- 100 μ L standart ve örnekler kuyucuklara konuldu. Plak üzeri kapatılıp 90 dk oda ısında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda içerik aspire edilip plak 4 kez 400 μ L yıkama tamponu ile yıkandı.
- 100 μ L COX-2 saptama antikoru her kuyucuğa eklendi. Plak üzeri kapatılıp 90 dk oda ısında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda içerik aspire edilip plak 4 kez 400 μ L yıkama tamponu ile yıkandı.
- 100 μ L HRP konjuge ikincil antikor her kuyucuğa eklenir. Plak üzeri kapatılıp 60 dk oda ısında inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonunda içerik aspire edilip plak 4 kez 400 μ L yıkama tamponu ile yıkandı.
- 100 μ L TMB substrat her kuyucuğa eklendi. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 100 μ L ELISA stop solüsyonu eklendi.
- Absorbans 450 nm’de ölçüldü.



Grafik 6. Plazma COX-2 standart eğrisi



Grafik 7. Fekal COX-2 standart eğrisi

3.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Elde edilen veriler SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi için öncelikle minimum, maksimum, ortalama, standart sapma değerleri hesaplandı. Bağımsız gruplar arasındaki ortalamaların karşılaştırılmasında nonparametrik Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. İkili alt grup karşılaştırılmasında nonparametrik Mann-Whitney U testi kullanıldı. Plasma ve fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2, CEA ile klinikopatolojik veriler arasındaki ilişki nonparametrik Mann-Whitney U testi kullanarak değerlendirildi. Fekal ve plazma örnekleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için ‘Sperman Korelasyon testi’ yapıldı. Fekal ve plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2, CEA’nın tanısal değerleri ROC (Receiver operating characteristic) eğrileri ile eğri altında kalan alan (Area under curve=AUC) değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. TANIMLAYICI BULGULAR

Çalışma grubumuz kolonoskopik işleme alınan hastalardan seçildi. Kolonoskopi sonucuna göre ‘normal’(kontrol), patoloji raporuna göre ‘kolorektal polip’ ve ‘kanser’ grupları oluşturuldu. Kontrol, polip ve kanser gruplarının arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı fark yoktu (yaş $p=0,69$, cinsiyet $p=0,15$).

4.2. Kanser, Polip ve Kontrol Gruplarında Plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA Düzeylerinin Karşılaştırılması

Normal, polip, kanser grupları arasında plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri arasında anlamlı fark olup olmadığı bağımsız gruplarda Kruskal Wallis testi kullanılarak incelendi

Tablo 11. Normal, Polip ve Kanser Gruplarında Plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri

	Kontrol (n=33)	Polip (n=23)	Kanser (n=15)	P
TIMP-1 (ng/mL) (Ort ± SS)	161,7 ± 99,6	117,3 ± 45,7	142,1 ± 70,6	0,213
MMP-7 (ng/mL) (Ort ± SS)	3,41 ± 4,75	1,22 ± 2,6	1,16 ± 1,76	0,06
COX-2 (ng/mL) (Ort ± SS)	3,71 ± 4,74	3,73 ± 2,56	3,35 ± 3,39	0,286
CEA (ng/mL) (Ort ± SS)	1,8 ± 0,91	1,77 ± 1,04	2,95 ± 1,85	< 0,023

*P ≤ 0,05 ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.2.1. Kanser, Polip ve Kontrol Gruplarında Plazma CEA düzeyinin Karşılaştırılması

Plazma CEA düzeyinin sağlıklı kontrol, polip ve kanser grup ortalamaları arasında anlamlı fark olması nedeniyle alt grup karşılaştırılması bağımsız gruplarda Mann Whitney U testi kullanılarak incelendi.

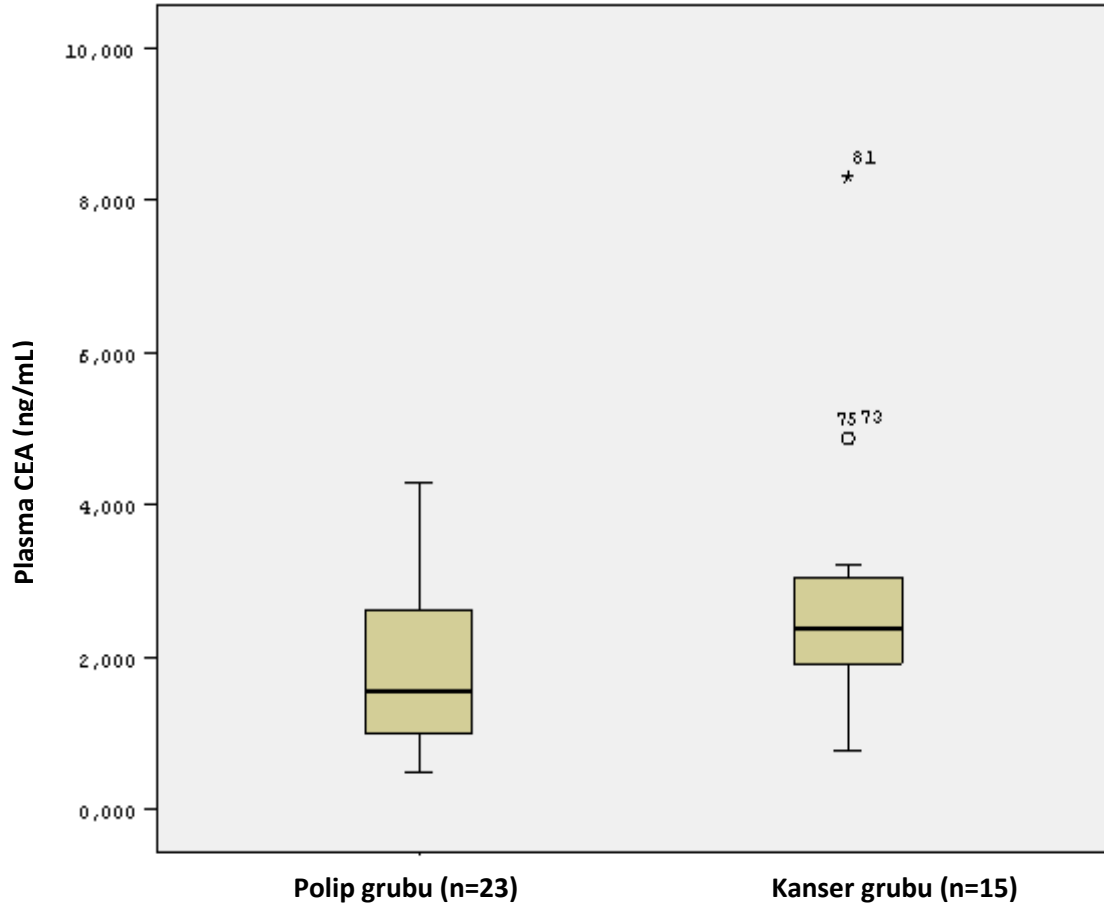
Polip grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında plazma CEA ortalamaları açısından anlamlı fark gözlenmezken, plazma CEA ortalamaları kanser grubunda polip grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0,012$).

Kanser grubu plazma CEA ortalaması sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,008$).

Tablo 12: Polip ve kanser gruplarına ait plazma CEA düzeyleri

	Polip (n=23)	Kanser (n=15)	P
CEA(ng/mL) (Ort ± SS)	1,77 ± 1,04	2,95 ± 1,85	<0,012*

* $P \leq 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır

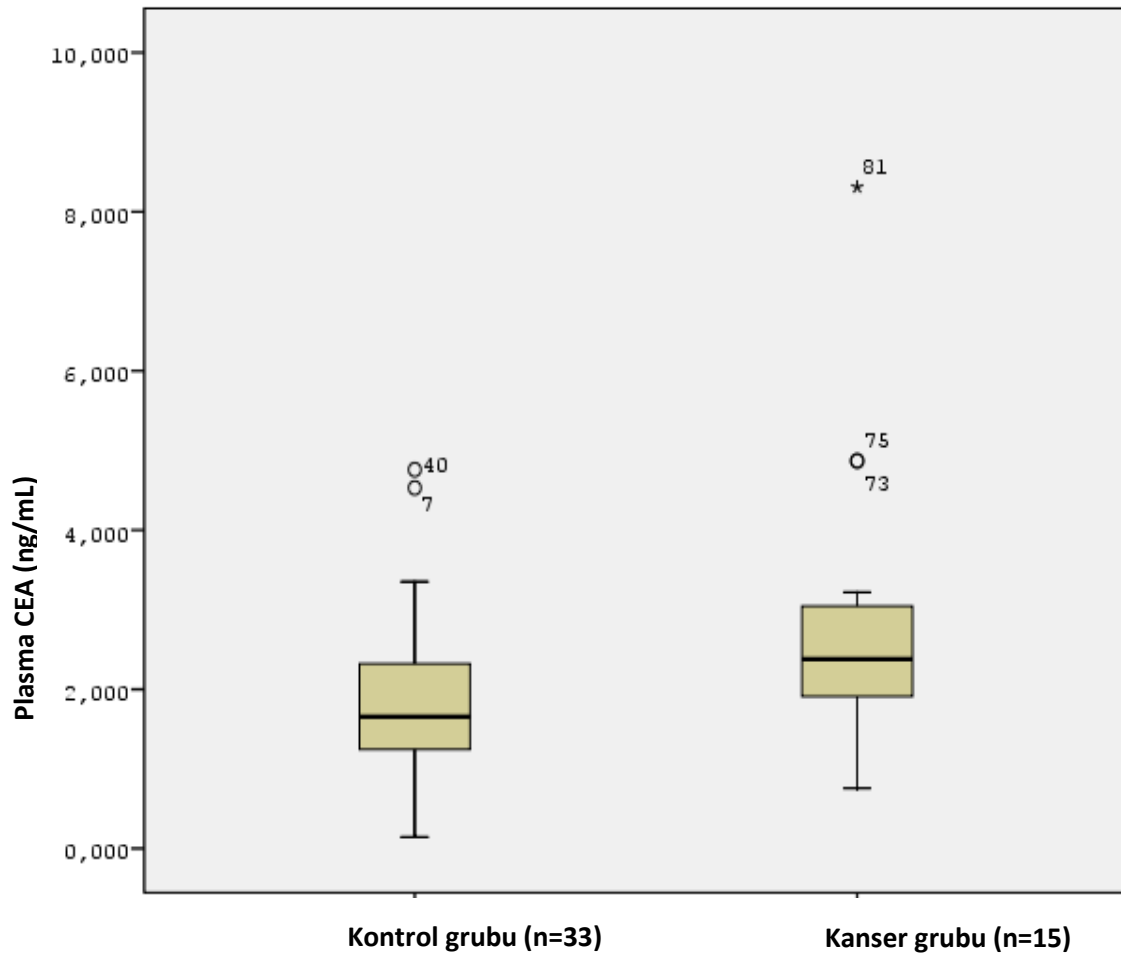


Grafik 8. Kanser ile polip grubu arasındaki plazma CEA düzey farkları kutu grafiği (box-plot)

Tablo 13. Kontrol ve kanser gruplarına ait plazma CEA düzeyleri

	Kontrol (n=33)	Kanser (n=15)	P
CEA(ng/mL) (Ort $\pm$ SS)	1,85 $\pm$ 0,97	2,95 $\pm$ 1,85	<0,008*

*P $\leq$ 0,05 ise istatistiksel olarak anlamlıdır.



Grafik 9. Kanser ile kontrol grubu arasındaki plazma CEA düzey farkları kutu grafiği (box-plot)

4.3. Polip grubunda plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeylerinin klinikopatolojik parametrelere göre karşılaştırılması

Polip grubunda plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki Mann Whitney U testi kullanılarak incelendi. TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri ile polip tipi ve boyu arasında anlamlı fark bulunamadı.

4.4. Kanser grubunda plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeylerinin klinikopatolojik parametrelere göre karşılaştırılması

Kanser grubunda TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeylerinin klinikopatolojik parametrelere göre karşılaştırılması Mann Whitney U testi kullanılarak incelendi. Klinikopatolojik parametreler ile TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı.

4.5. Kanser, Polip ve Kontrol Gruplarında Fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA Düzeylerinin Karşılaştırılması

Tablo 14. Kanser, Polip ve Kontrol Gruplarında fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri

	Kontrol (n=16)	Polip (n=8)	Kanser (n=8)	P
TIMP-1 (ng/µg protein) (Ort ± SS)	0,028 ± 0,0075	0,0012 ± 0,0006	0,003 ± 0,008	0,458
MMP-7 (ng/µg protein) (Ort ± SS)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,968
COX-2 (ng/µg protein)	0,0005 ± 0,0015	0,0 ± 0,0	0,014 ± 0,044	0,729
CEA (ng/µg protein) (Ort ± SS)	8,55 ± 14,07	9,16 ± 6,01	15,44 ± 10,80	0,034*

*P≤ 0,05 ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

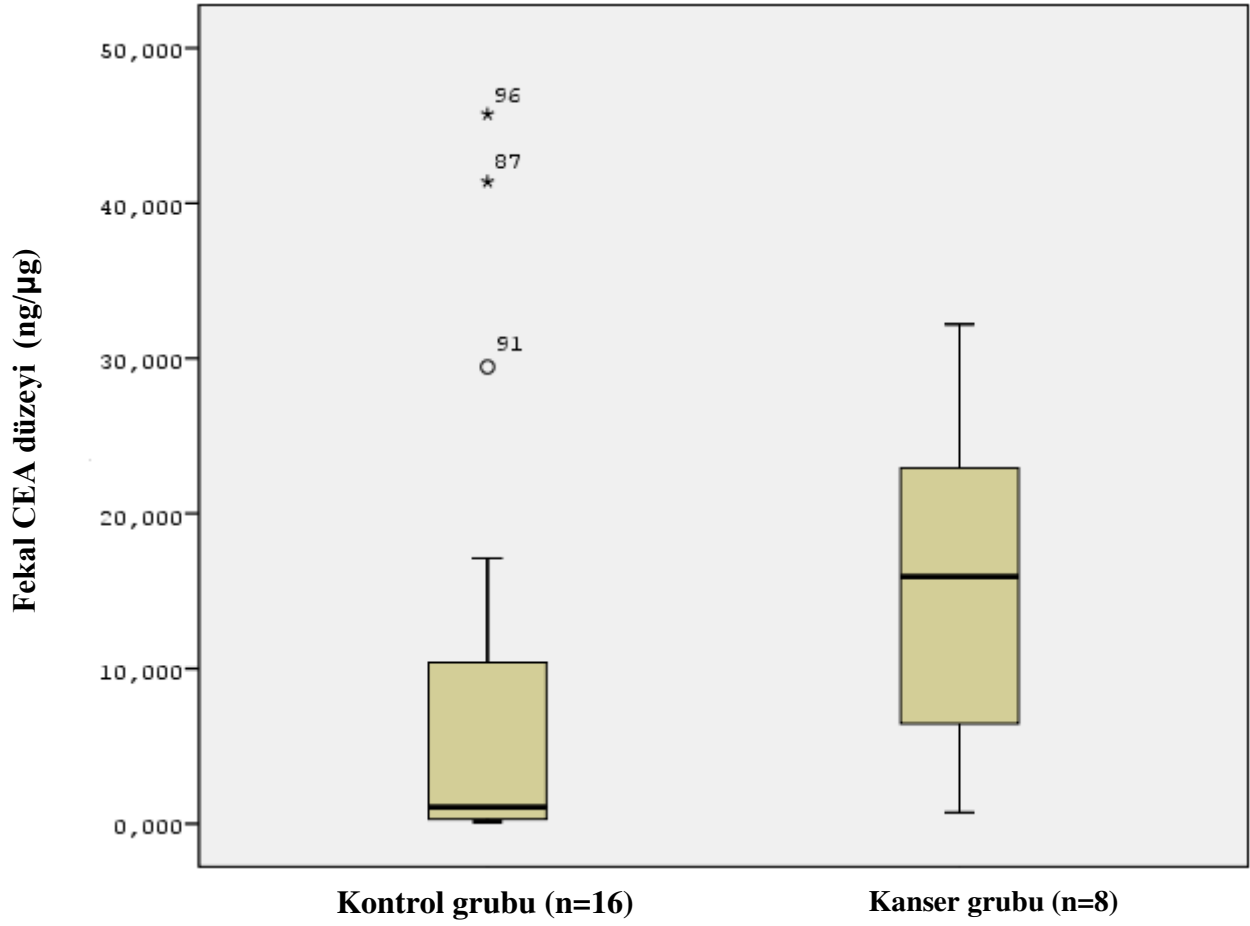
4.5.1. Kanser, Polip ve Kontrol Gruplarında fekal CEA düzeyinin Karşılaştırılması

Kanser ile kontrol grubu arasında fekal CEA ortalamaları karşılaştırıldığında kanser grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0,027$)

Tablo 15: Kontrol ve kanser gruplarında fekal CEA düzeyleri

	Kontrol (n=16)	Kanser (n=8)	P
CEA (ng/μg) (Ort ± SS)	8,55 ± 14,0	15,44 ± 10,8	≤ 0,027*

* $P \leq 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.



Grafik 10. Kanser grubu ile kontrol grubu arasındaki fekal CEA düzey farkları kutu grafiği (box-plot)

4.6. Polip grubunda fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeylerinin klinikopatolojik parametrelere göre karşılaştırılması

Polip grubunda fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki Mann Whitney U testi kullanılarak incelendi. TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri ile polip tipi ve boyu arasında anlamlı fark bulunamadı

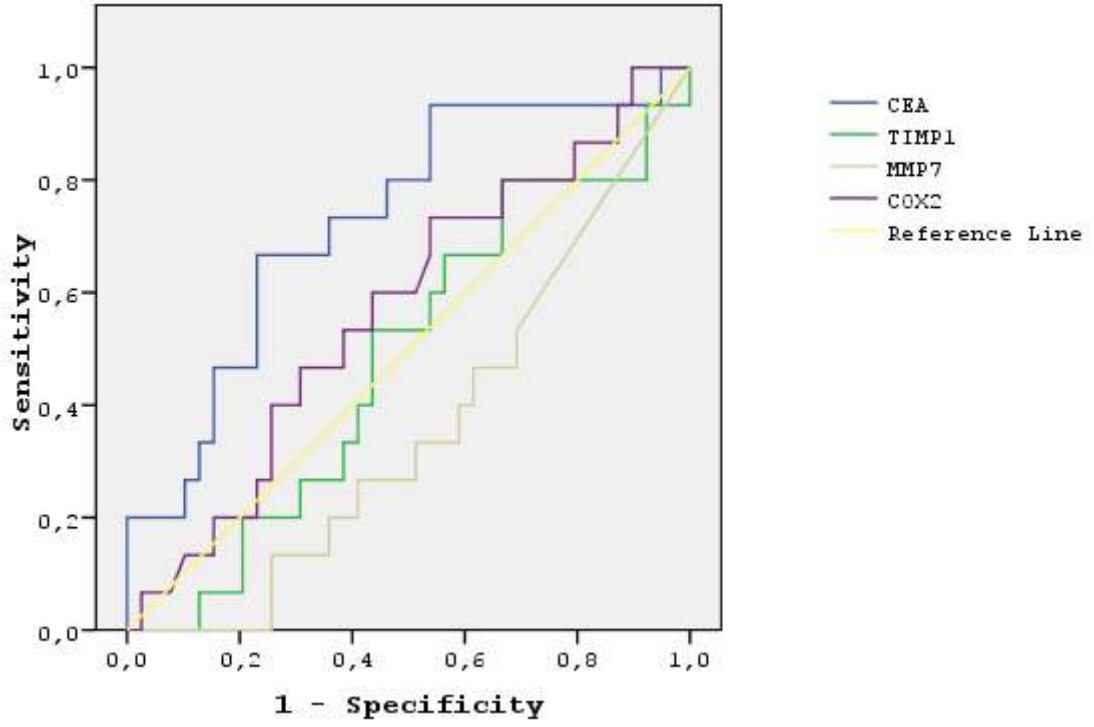
4.7. Kanser grubunda fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeylerinin klinikopatolojik parametrelere göre karşılaştırılması

Kanser grubunda TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeylerinin klinikopatolojik parametrelere göre karşılaştırılması Mann Whitney U testi kullanılarak incelendi. Kanserli hastaların fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri ile klinikopatolojik parametreler arasında anlamlı fark bulunamadı.

4.8. Fekal ve plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri arasındaki ilişki

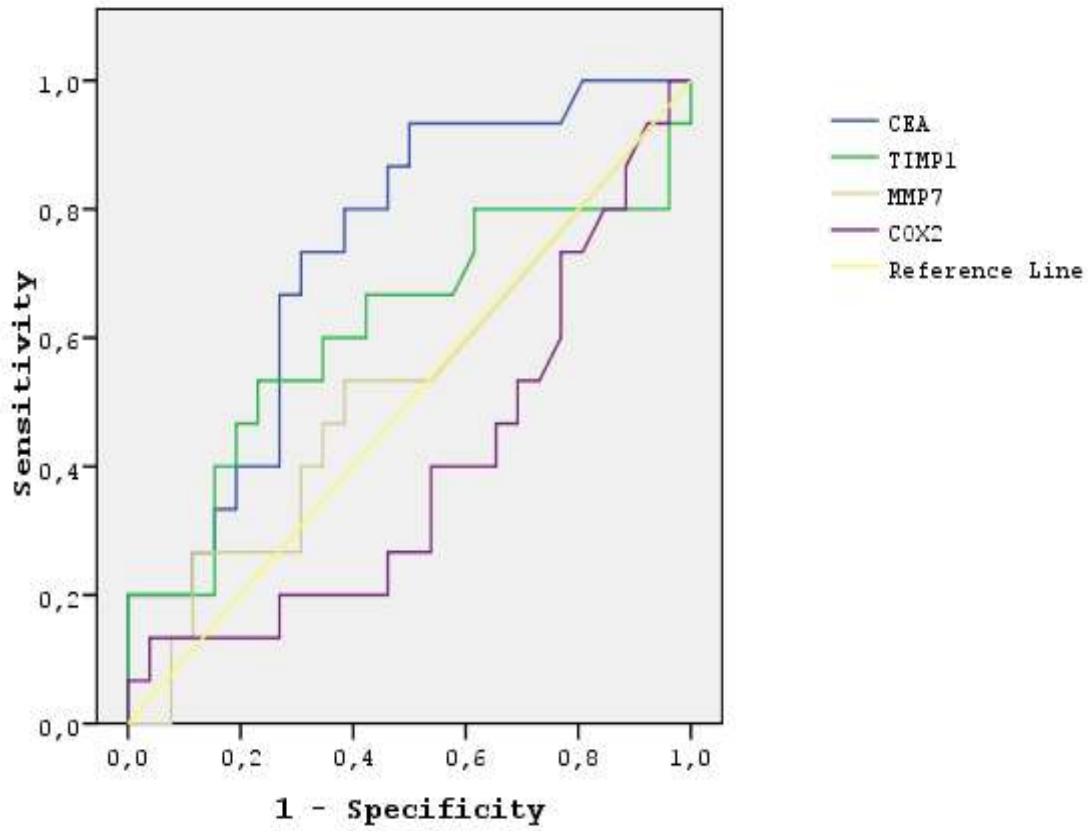
Plazma ve Fekal TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

4.9. Plazma TIMP-1, MMP-7, COX-2 ve CEA ROC eğrileri



Grafik 11. Plazma kontrol ve kanser grupları için ROC eğrilerinin altında kalan alan CEA (0,728), MMP-7 (0,359), COX-2 (0,571), TIMP-1 (0,480)

COX-2 için eşik değer 1,03 alındığında duyarlılık %80, özgüllük %70'dir. CEA için eşik değer 1,52 alındığında duyarlılık %93, özgüllük %48'dür.

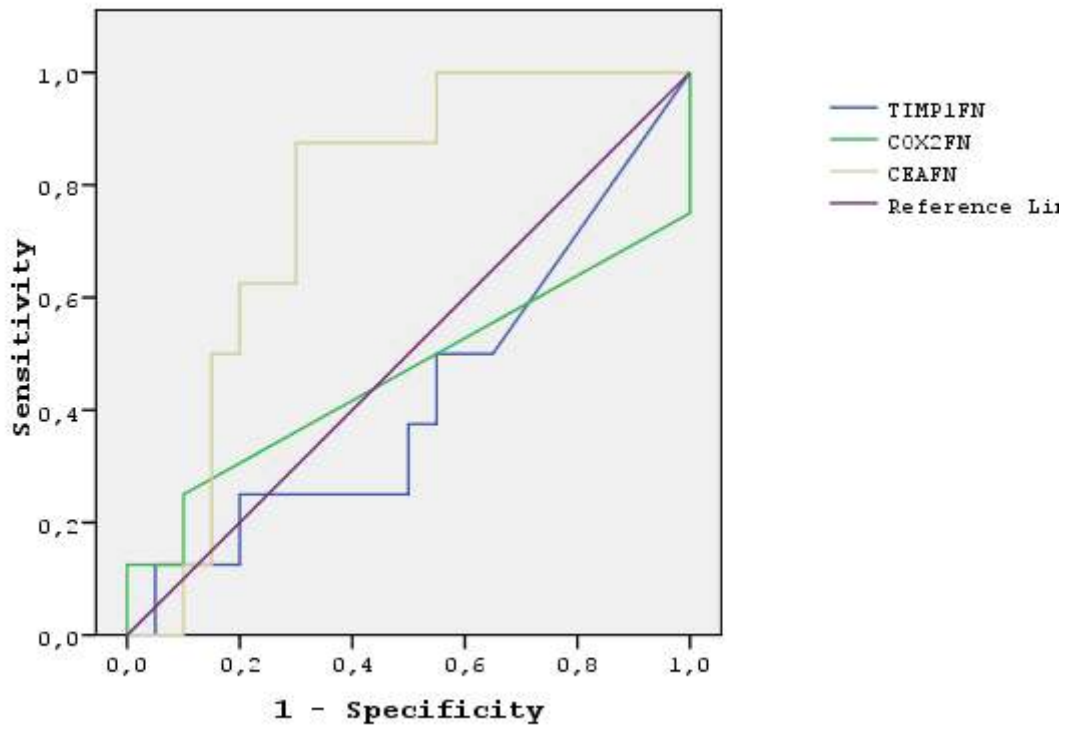


Grafik 12. Plazma polip ve kanser grupları için ROC eğrilerinin altında kalan alan CEA (0,735), COX-2 (0,396), MMP-7 (0,526), TIMP-1 (0,614)

CEA için eşik değer 0,87 alındığında duyarlılık %93 özgüllük %73 bulunmuştur.

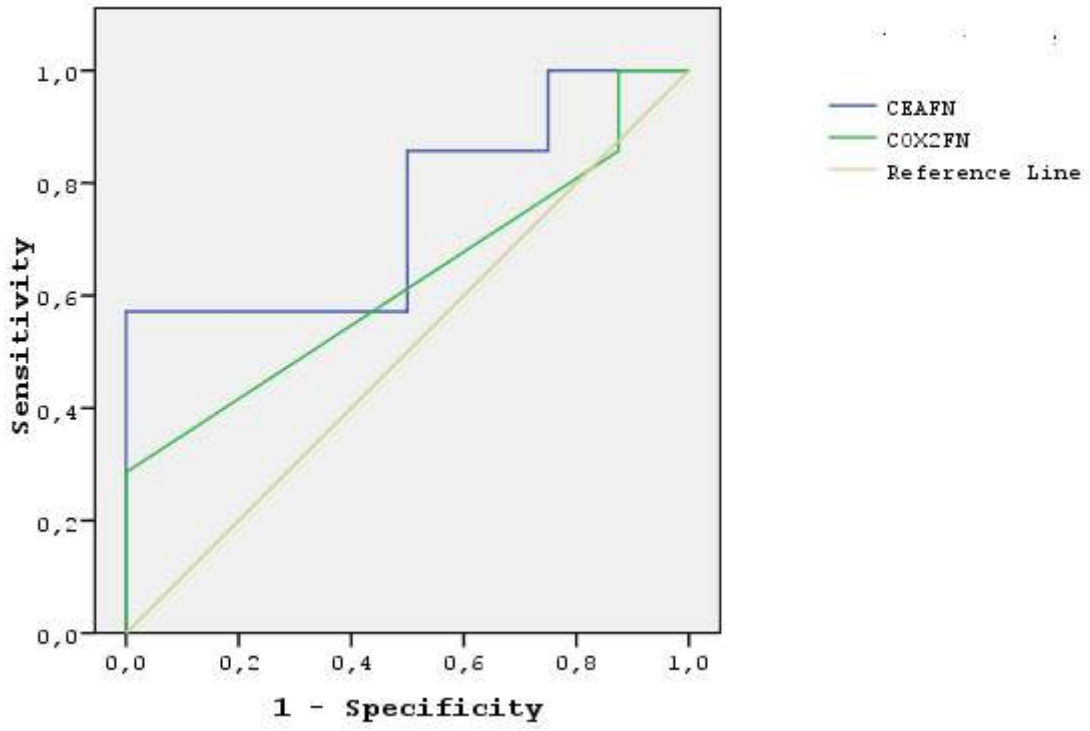
TIMP-1 için eşik değer 96,8 alındığında duyarlılık % 80 özgüllük % 62 bulunmuştur

4.10. Fekal CEA, COX-2, TIMP-1 ROC eğrisi



Grafik 12. Fekal kontrol ve kanser grupları için ROC eğrilerinin altında kalan alan fekal CEA (0,769), fekal COX-2 (0,463), TIMP-1 (0,425)

CEA için ROC eğrisine göre eşik değer 1,007 alındığında duyarlılık %87 özgüllük %50'dir.



Grafik 13. Polip ve kanser grupları için ROC eğrilerinin altında kalan alan CEA (0,750), COX-2 (0,625), TIMP-1 (0,196)

CEA için eşik değeri 6,3 ng/mL alındığında duyarlılık %75, özgüllük %71'dir.

5. TARTIŞMA

Kolorektal kanser endüstriyel dünyada sık görülen kanserlerden biridir, tümörlere bağlı ölümlerde üçüncü sıradadır [87]. KRK oluşum süreci, normal epitelin kanser hücrelerine dönüşümü kompleks, çok basamaklı, çok sayıda genetik ve fenotipik çeşitlilikle sonuçlanan uzun bir süreçtir [88]. ESM'in proteolitik yıkılımı birçok fizyolojik durumda gözlenir. Bu yıkım malign tümörlerin çoğalmasının düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Stromal ya da tümör hücreleri tarafından MMP üretimi ise tümörün ilerlemesine yol açar [89]. MMP'ler doğal doku inhibitörleri (TIMP) tarafından kısmi olarak regüle edilirler. MMP'ler ile TIMP'ler arasındaki dengenin bozulması gastrointestinal malignitelerin gelişmesinde önemli bir faktördür [89]. TIMP'lerin malign transformasyon ve tümör büyümesini uyarıcı etkisi olduğu [90] ve tümör hücre apoptozunu inhibe ettiği [70] gösterilmiştir.

MMP-7, MMP ailesinin bir üyesidir ve gastrik, pankreatik, kolorektal kanserde aşırı ekspresyonu gösterilmiştir [91]. Literatür taraması yapıldığında MMP-7 ile ilgili genellikle doku çalışması ve az sayıda da serum çalışması yapıldığı görülmüştür. Bu çalışmalara bakıldığında MMP-7'nin kolorektal tümörün erken evresi ve başlangında rol oynadığı gösterilmiştir [92]. Ayrıca çoğu çalışmada MMP-7'nin kolorektal kanserde tümör büyümesi, invazyon ve metastazda rol oynadığı, lenf nodu ve uzak metastazı saptamada ön görü sağladığı bulunmuştur [93], [94], [6]. Bu çalışmaların çoğu dokuda immunohistokimya boyamaya dayalı ekspresyon çalışmalarıdır, bunun yanında da sadece bir adet serum çalışması bulunmaktadır. Maurel ve ark.'nın serumda yaptığı çalışmada MMP-7 seviyelerinin artışı ileri KRK hastalarında kötü prognoz işareti olarak saptanmıştır [95]. Bizde çalışmamızda kontrol, polip, kanser grubunda plazma MMP-7 düzeylerini değerlendirdik. Çalışmamızda kontrol, polip, kanser grup ortalamaları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,06$). Ayrıca polip ve kanser grubunun MMP-7 düzeyi ile klinikopatolojik veriler arasında ilişki saptanmadı. Plazma MMP-7 düzeyini polip ve kanser grup ayırımında tanısal değerini ortaya koymak amacıyla ROC eğrisi çizilerek eğri altında kalan alanı ($AUC=0,526$) bulundu. Eşik değer $0,34 \text{ ng/mL}$ alındığında MMP-7 için duyarlılık %14, özgüllük % 60 bulundu. MMP-7 ile ilgili daha önce plazmada benzer bir çalışma yapılmamıştır. Maurel ve ark.'nın yaptığı çalışmada kontrol ($n=87$), metastazı olmayan KRK ($n=96$), metastatik KRK ($n=120$) hastaları incelenmiştir. Metastatik hastalarda serum MMP-7 düzeyi, kontrol ve metastazı olmayan

hasta grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur [95]. Metastazı olmayan hastalar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamış, bu açıdan baktığımızda bizim sonuçlarımız Maurel ve ark.'nın çalışmaları ile uyumludur.

Kirimlioğlu ve ark.'nın yaptığı çalışmada villöz adenomda MMP-7 ekspresyonunun (G3 %51-100 güçlü boyanma) fazla olduğu, tübüler adenomda ise (G1 %1-10 az boyanma) daha az olduğu saptanmıştır [96] . Bu da malign potansiyel tübüler adenoma göre daha güçlü olan villöz adenomlarda MMP-7 ekspresyonunun fazla olduğunu ve MMP-7'nin adenom-karsinom yolunda rol oynadığını göstermektedir. Bizim çalışmamızda polip grubumuzdaki tübüler adenom sayısı (n=16) çok, buna karşın villöz adenom örneğimiz olmadığı için anlamlı bir sonuç elde edememiş olabiliriz.

Literatüre bakıldığında MMP-7 düzeyi ile kanserin klinikopatolojik değişkenleri arasındaki ilişkiyi değerlendiren doku çalışmaları mevcuttur. Bunlar arasında da çelişkili sonuçlar mevcuttur. Luo ve ark.'nın yaptıkları çalışmada kanserli hastalarda MMP-7 ekspresyonunun evre, yaş ve lenf nodu metastazı ile korele [97] bulunurken, Gomes ve ark.'nın yaptığı çalışmada MMP-7 düzeyi ile klinikopatolojik değişkenler arasında korelasyon bulunmamıştır [98]. Bizim çalışmamız doku çalışmasından farklı olarak plazmada yapılmıştır. Literatüre baktığımızda plazmada böyle bir çalışmanın olmadığı görülmektedir. Bu nedenle bizim sonuçlarımız ileriki çalışmalar için ön veri olabilir. Ayrıca MMP-7'nin tanısal değerinin tanımlandığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. MMP-7 KRK erken evresinde (adenom-karsinom) [58, 99] ve metastazında [6, 97] rol oynar. Bizim çalışmamızda kanser grubumuzdaki erken evre ve geç evre hastalarımızın az olması sonuçlarımızı etkilemiş olabilir. Bundan dolayı daha geniş çaplı klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

TIMP-1'in MMP inhibisyonu yanında tümör büyümesini ve malign dönüşümü uyarıcı etkisi kanıtlanmıştır[70]. Birçok çalışmada plazma TIMP-1 düzeylerinin artışı hasta yaşam süresini belirlemede prognostik faktör olarak anlamlı bulunmuştur [100, 101]. Literatüre bakıldığında plazma TIMP-1 düzeyleri KRK hastalarında sağlıklı kişilere göre anlamlı yüksek bulunmuştur [102]. Çalışmamızda plazma TIMP-1 düzeylerini kontrol, polip, kanser gruplarımızda değerlendirdik. Kontrol, polip, kanser TIMP-1 ortalamalarını karşılaştırdığımızda anlamlı fark bulunamadı (p=0,213). Klinikopatolojik veriler ile polip,

kanser TIMP-1 ortalamaları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Ayrıca plazma ve fekal örnekler arasında da korelasyon saptanmamıştır. Polip ve kanser ayrımında TIMP-1'in tanısal değeri ROC eğrisi ile saptandığında eğri altında kalan alan ($AUC=0,614$) bulunmuştur. Eşik değeri $96,8 \text{ ng/ml}$ alındığında duyarlılığı %80 özgüllüğü %54 saptadık. Holten-Andersen ve ark.'nın çalışmasında polip ve kontrol TIMP-1 düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır, fakat kanser hastalarında TIMP-1 düzeyleri polip ve kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti [103]. Bizim çalışmamızda da TIMP-1 ortalaması kanser grubunda ($142,1 \pm 70,6 \text{ ng/mL}$), polip grubuna ($117,3 \pm 45,7 \text{ ng/mL}$) göre yüksek ama anlamlı değildi. Kanser grubumuzun az sayıda olması sonuçlarımızı etkilemiş olabilir. Inagaki ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise KRK hasta grubunda TIMP-1 düzeyi ile klinikopatolojik değişkenler arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır [104]. Bu sonuç bizim çalışmamızla uyumludur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ileri evre hastalarda ve kötü differansiasyonda daha yüksek olduğu saptanmıştır [105]. KRK hastalarında yüksek plazma ya da serum TIMP-1 düzeylerinin düşük plazma ya da serum TIMP-1 düzeyleri ile karşılaştırıldığında yaşam şansının daha kötü olduğu bulunmuştur [106]. Ayrıca Holten-Andersen ve ark. yaptıkları bir çalışmada cerrahi öncesi yüksek plazma TIMP-1 düzeyinin kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğunu buldular[101]. Bu sonuçları değerlendirdiğimizde ileri evre hastalarda TIMP-1 düzeyinin yüksek olması bizim de ileri evre hasta sayımızın ($n=7$) az olması sonuçlarımızın anlamlı olmasını kısıtlamış olabilir.

CEA ilk kez 1965 yılında Gold ve Freeman tarafından tanımlanmış kompleks intrasellüler glikoproteindir ve kolorektal kanserlerin %90'ında üretilir [75]. KRK dışında gastrik, pankreatik, akciğer, meme, medullar tiroid kanseri birçok kanserde, kanser dışında siroz, ülseratif kolit, pankreatit ve sigara içiminde yükselebilir. KRK tanısında özellikle erken evrede duyarlılığı ve özgüllüğü düşük olduğu için değerlendirilemez [107]. Bundan dolayı yüksek CEA düzeyleri hem gastroenterologlar hem de kolorektal cerrahlar için sorun oluşturmaktadır. KRK'de CEA'nın yanında yeni biyokimyasal belirteçlere ihtiyaç vardır.

Biz de çalışmamızda günümüzde KRK'de kullanılan tek belirteç olduğu için CEA parametresini de değerlendirdi. Plazma CEA sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde kanser grubunda CEA düzeyleri polip grubuna göre anlamlı yüksekti ($p=0,012$). Ayrıca kanser grubunda CEA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti ($p=0,008$). Mroczko ve

ark.'nın yaptıkları çalışma sonuçları bizim çalışmamızla uyumludur [108]. Mroczko ve ark. kanserli grupta CEA düzeylerini hem polip hem de kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulmuşlardır ($p<0,001$) [108]. CEA kolorektal kanserde hastaların değerlendirilmesi için en yaygın kullanılan tümörle ilişkili antijendir[107]. CEA metastazı olmayan hastalarda cerrahi sonrası bağımsız prognostik faktör [109] ve sıklıkla cerrahi sonrası nükslerin takibinde kullanılır [110]. Sonuçlarımız CEA'nın KRK'de kullanılan tek belirteç olmasını doğrular niteliktedir. Polip ve kanser ayırımında CEA'nın tanısal değerine baktığımızda ROC eğrisinde eğri altında kalan alan ($AUC=0,735$) bulunmuştur. Çalıştığımız belirteçler arasında tanı değeri en yüksek olan CEA'dır. ROC eğrisine göre eşik değer 1,52 alındığında duyarlılık %93,özgüllük %48'dür.

TIMP-1 KRK tanı ve takibinde yeni bir biyokimyasal belirteç olmaya adaydır. Mroczko ve ark.'nın yaptığı çalışmada TIMP-1 için ROC eğrisinde eğri altında kalan alan 0,8319 iken CEA için eğri altında kalan alan 0,8292 bulunmuştur [108]. Bizim çalışmamızda CEA için eğri altında kalan alanı 0,735 iken, TIMP-1'in de eğri altında kalan alanı 0,614 bulunmuştur. Bizim sonuçlarımıza göre CEA'dan sonra TIMP-1 tanı değeri ikinci sırada olarak saptanmıştır.. Bu da göstermektedir ki ülkemizde bunu kanıtlamak için geniş çaplı klinik araştırmalara ihtiyaç vardır

COX-2, KRK oluşumunda önemli rol oynar. Düzenli NSAİ kullanan KRK hastalarında mortalite %40-50 azalmıştır [111]. Birçok çalışmada KRK'da normal doku ile karşılaştırıldığında COX-2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir[112]. Michal P. ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ise kolon poliplerinde COX-2 ekspresyonu yüksek, polip boyu ile ilişkili, malign dönüşümde risk faktörü olduğu bulunmuştur [113]. Yoon Doe Han ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada COX-2 ekspresyonu kolorektal kanserde polip olgularına oranla daha yüksek bulunmuş, klinikopatolojik değişkenler ile COX-2 düzeyi arasında korelasyon saptanmamıştır [114]. Litertür tarandığında COX-2 için doku çalışmalarının olduğu, immunohistokimya boyama ile değerlendirme yapıldığı görülmektedir. Biz de çalışmamızda plazma COX-2 düzeylerini kontrol, polip, kanser grubunda saptayarak değerlendirdik, literatürde böyle bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda plazma kontrol, polip ve kanser COX-2 düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,286$). Çalışmamızda polip ve kanser grubu COX-2 düzeyleri ile klinikopatolojik değişkenler arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Bu sonuç Yoon Doe Han ve ark.'nın yaptığı çalışma ile uyumludur. Polip ve kanser ayrımında COX-2'nin tanısal değerine baktığımızda ROC eğrisinde eğri altında kalan alan ($AUC=0,396$) bulunmuştur. Anlamlılık ifade etmemesi nedeniyle duyarlılık ve özgüllük hesaplanmamıştır.

KRK hastaları kesin tanı için kolonoskopiye gitmektedir ve hem pahalı hemde hastalar için sıkıntı verici komplikasyonları olabilen invaziv bir yöntemdir. FOBT ise non invaziv basit bir testtir ve KRK ile ilişkili mortaliteyi azaltır [23]. Fakat FOBT pozitifliği KRK'li hastaların sadece %10'undan azında pozitifdir [115]. Prekanseroz adenomlarda sıklıkla kanama görülmez, tarama için uygun değildir. Bundan dolayı noninvaziv performansı iyi olan testlere ihtiyaç vardır.

Literatür incelendiğinde yeni fekal belirteçler geliştirmek için yapılan sınırlı sayıda çalışmaya rastladık [26],[9], [116]. Bunlardan iki adeti fekal COX-2 ve MMP-7 mRNA ekspresyonu iken bir adeti TIMP-1 ve CEA'nın yanında farklı belirteçleri kantite eden çalışmadır.

Biz de çalışmamızı planlarken plazma örneklerimizin yanında aynı olgulardan fekal örnekleri de almaya karar verdik. Fekal örneklerimizde CEA, TIMP-1, COX-2, MMP-7 düzeylerinin normal, polip ve kanser grubunda nasıl değiştiğini saptamaya karar verdik.

Karl ve ark.'nın yaptıkları çalışmaya uygun şekilde fekal örneklerimizi topladık ve ekstraksiyon işlemlerimizi yaptık [26]. Çalışmamızı gerçekleştirirken ön denemeler sonucunda ekstraksiyon işlemi yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi modifiye edildi.

Takai ve ark. [9] yaptıkları ilk çalışmada fekal COX-2 mRNA 'sının KRK ve adenomlarda yararlı bir belirteç olarak tanımladılar. COX-2 ekspresyonunu adenokarsinolarda %90'a varan, adenomlarda ise %60 olduğunu buldular [117]. Daha sonraki çalışmalarında ise fekal COX-2'nin yanına KRK ve adenom (polip) tanısında kullanılabilecek diğer bir biyobelirteç eklediler. MMP-7'nin adenom ve KRK'de ekspresyonunun yüksek olması nedeni ile fekal MMP-7 mRNA'yı eklediler. Fekal COX-2 ve fekal MMP-7' yi 'fekal RNA test' olarak adlandırdılar. Fekal RNA testinin duyarlılığın KRK için %90 (%95 güven aralığında) olduğunu buldular. Evre I ve II için duyarlılığın daha yüksek %93 olduğunu buldular [9]. En

son yaptıkları çalışmada ise fekal COX-2 mRNA'sını etkileyen faktörleri araştırdılar. Fekal COX-2 mRNA ekspresyonunun tümörden dökülen hücreler, inflamatuvar hücrelerin dökülmesi ve tümör boyutunun artması ile arttığını saptadılar.

Fekal COX-2'yi normal ve polip grubu hastalarımızda saptayamadık. Kanser grubu hastalarımızda ise sadece 1 hastada 0,12 ng/mL bulduk. Burada iki olasılık olabilir birincisi fekal COX-2 proteini bakteri proteazları ile yıkılmış olabilir, ikincisi dokuda ekspresyonları saptanmış olsa da dışkıda çok düşük düzeyde olduğu için saptayamamış olabiliriz.

Polip ve kanser ayırımında COX-2'nin tanısal değerine baktığımızda ROC eğrisinde eğri altında kalan alan (AUC=0,625) bulunmuştur. Tanı değeri açısından bakıldığında COX-2 CEA'dan sonra ikinci sırada yer almaktadır.

Hamaya ve ark. [116] fekal COX-2 mRNA'sını ekspresyonunu etkileyen faktörler içinde tümör boyutu ile korele olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda kanser hastamızda 0,12 ng/mL (mikrogram doku başına) saptadık. Bu hasta ileri evre (pE3, N2) ve tümör boyutu 7 cm olan bir hasta, hasta grubumuzun hem sayıca az olması hem de ileri evredeki vakalarımızın az olması neden ile biz fekal COX-2 saptayamamış olabiliriz. Bunun devamında çok merkezli ve hastaların cerrahi servislerinden seçilerek toplanacağı uzun süreli, büyük bir klinik araştırmaya ihtiyaç vardır.

Takai ve ark.[9], fekal MMP-7 mRNA'yı %65 (%95 güven aralığı) duyarlılıkla revers transkriptaz PCR ile optimize ettiler. Yine aynı çalışmada fekal COX-2 mRNA'yı da yine aynı yöntemle saptadılar ve iki teste 'fekal RNA' adını verdiler. Biz de buradan yola çıkarak MMP-7 proteinini fekal örneklerde saptamaya çalıştık. Fekal MMP-7 proteini kantite edemedik. Normal, polip, kanser, fekal örnekleri arasında da anlamlı fark bulamadık. Fekal MMP-7'yi saptayamamamızın nedeni MMP-7'nin feçese çıkışında bakteri proteazları tarafından yıkılıyor olabilir. Kanserli hastalarda fekal mRNA COX-2 ekspresyonunu etkileyen faktörler (dökülen tümör hücreleri, tümör boyutu) gibi mRNA MMP-7 ekspresyonunu da etkileyen faktörler olabilir. Fekal COX-2 ve MMP-7'yi saptayan bir çalışma literatürde yok. Bizim bu sonuçlarımız ileriki çalışmalar için bir ön veri olabilir.

Karl ve ark. [26]'nın yaptıkları çalışmaya benzer şekilde bizde fekal TIMP-1 ve CEA'yı kantite edebildik. Karl ve ark. TIMP-1'in yanında CEA'da olmak üzere 6 belirteçi tek tek ve birlikte kombine ederek duyarlılıklarına baktılar [26]. Fekal TIMP-1'in tek başına duyarlılığı %72 iken S100A12, hemoglobin-haptoglobin ile kombinasyonunun %95 spesifitede duyarlılığı %88, %98 spesifitede duyarlılığı %82'dir. Biz de normal, polip, kanser hasta gruplarımızda TIMP-1' saptadık ve karşılaştırma yaptık. Normal, polip, kanser grubunda anlamlı fark bulamadık ($p = 0,458$). Polip ve kanserli grup arasında fekal TIMP-1 düzeyleri açısından anlamlı fark olmasa da kanser grubunun ortalaması ($0,0034 \pm 0,008$) polip grubuna ($0,0012 \pm 0,0006$) göre yüksekti. Fekal TIMP-1 düzeyleri ile polipli ve kanserli hastaların klinikopatolojik verileri arasında anlamlı fark bulamadık. Literatür incelendiğinde fekal TIMP-1 ile ilgili böyle bir çalışmaya rastlanılmamıştır [26]

Fekal CEA için feçes örneklerini Karl ve ark.[26] 'larına benzer şekilde ekstrakte ettik. Ekstraktlardan da ELISA yöntemi ile CEA düzeylerini saptadık. Fekal CEA düzeylerinin kanserli hastalarda normal hastalara göre anlamlı yüksek bulduk ($p=0,027$).Sonuçlarımız Stubbs ve ark.[118], Sugona ve ark.[119], Kim ve ark.[120]'nın çalışmaları ile uyumludur. Fekal CEA düzeylerinde normal ile polip ($p=0,136$), polip ile kanser ($p=0,279$) grubunda anlamlı fark yoktu. Literatür tarandığında fekal polip-kanser, polip-normal grup karşılaştırması yapan çalışmaya rastlanılmamıştır. Bundan dolayı ilk kez bizim çalışmamızda böyle bir karşılaştırmanın olması ileriki çalışmalar için ön veri kaynağı olabilir Polip ve kanser ayırımında fekal CEA'nın tanısal değerine baktığımızda ROC eğrisinde eğri altında kalan alan ($AUC=0,750$) bulunmuştur. Kontrol ve kanser ayırımında CEA'nın tanısal değerine baktığımızda ROC eğrisinde eğri altında kalan alan ($AUC=0.769$) bulunmuştur. Fekal CEA hem polip –kanser, hem de kontrol-kanser ayırımında en iyi tanı değerine sahiptir..

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ Çalışmamızda feçes ekstraksiyon yönteminin uygulanabilirliği ortaya konulmuştur ve sonuçlarımızın bundan sonraki araştırmalar için fikir verici olacağını ön görmekteyiz.
- ✓ Çalışmamızda yapılmış olan fekal TIMP-1 ve CEA düzeylerinin kantitasyonu, literatürde fekal TIMP-1 kantitasyonu yapan ikinci çalışma olma özelliğini göstermektedir.
- ✓ Fekal MMP-7(sadece bir kez) ve COX-2(sadece iki kez) parametreleri, günümüze kadar sadece mRNA ekspresyonu düzeyinde değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamız ise fekal MMP-7 ve COX-2 parametrelerini protein düzeyinde kantite eden ilk çalışma olma özelliğini göstermektedir. Bu sonuçlar bundan sonraki araştırmalara temel oluşturabilecektir.
- ✓ Fekal kontrol ve kanser örnekleri, tanısal değer açısından ROC eğrileri aracılığıyla değerlendirildiğinde fekal CEA'nın en yüksek ayırım kapasitesine sahip olduğu görülmüştür.
- ✓ Fekal polip ve kanser örnekleri, tanısal değer açısından ROC eğrileri aracılığıyla değerlendirildiğinde fekal CEA ve fekal COX-2'nin sırasıyla en iyi ayırım kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuçlarımız literatürde bir ilk olarak yer alacaktır.
- ✓ Literatürde, kolorektal kanser olgularında COX-2 ve MMP-7 parametrelerini plazma örneklerinde ölçen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu özelliği nedeniyle çalışmamız literatürde ilk olacaktır. Plazma TIMP-1 ve CEA parametreleri açısından literatürde daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.
- ✓ Plazma kontrol ve kanser örnekleri, tanısal değer açısından ROC eğrileri aracılığıyla değerlendirildiğinde plazma CEA ve plazma COX-2 parametrelerinin sırasıyla en iyi ayırım kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur.

- ✓ Plazma polip ve kanser örnekleri, tanısal değer açısından ROC eğrileri aracılığıyla değerlendirildiğinde plazma CEA, plazma TIMP-1 ve plazma MMP-7 parametreleri sırasıyla en iyi ayırım kapasitesine sahip oldukları görülmüştür.
- ✓ Ardışık olarak ve teker teker en iyi ayırım kapasitelerine sahip oldukları bulunan parametrelerin, ikili ve üçlü kombinasyonları yapılarak bir arada / daha kuvvetli ayırım kapasitesine sahip olabileceklerini öngörmekteyiz. Adı geçen belirteçlerin kombinasyonlarının yapılabilmesi için “Bayes Logistic Regression(BLR)” matematik modelinin kullanıldığı “Bayesian binary regression” yazılımına sahip olmak gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR ve EKLER

7.1. KAYNAKLAR

1. Ries, L.A., et al., *The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer*. Cancer, 2000. **88**(10): p. 2398-424.
2. Edwards, B.K., et al., *Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1999, featuring implications of age and aging on U.S. cancer burden*. Cancer, 2002. **94**(10): p. 2766-92.
3. Frederiksen, C., et al., *Changes in plasma TIMP-1 levels after resection for primary colorectal cancer*. Anticancer Res, 2009. **29**(1): p. 75-81.
4. Pesta, M., et al., *Quantitative estimation of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples*. Anticancer Res, 2005. **25**(5): p. 3387-91.
5. Asano, T., et al., *Prognostic values of matrix metalloproteinase family expression in human colorectal carcinoma*. J Surg Res, 2008. **146**(1): p. 32-42.
6. Masaki, T., et al., *Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas*. Br J Cancer, 2001. **84**(10): p. 1317-21.
7. Nosho, K., et al., *Interplay of insulin-like growth factor-II, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-I receptor, COX-2, and matrix metalloproteinase-7, play key roles in the early stage of colorectal carcinogenesis*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(23): p. 7950-7.
8. Saha, D., C. Roman, and R.D. Beauchamp, *New strategies for colorectal cancer prevention and treatment*. World J Surg, 2002. **26**(7): p. 762-6.
9. Takai, T., et al., *Fecal cyclooxygenase 2 plus matrix metalloproteinase 7 mRNA assays as a marker for colorectal cancer screening*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(6): p. 1888-93.
10. Kumar, V., *Basic Pathology* 2008.
11. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 277-300.
12. Hagggar, F.A. and R.P. Boushey, *Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors*. Clin Colon Rectal Surg, 2009. **22**(4): p. 191-7.
13. Zisman, A.L., et al., *Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening*. Arch Intern Med, 2006. **166**(6): p. 629-34.
14. Boardman, L.A., et al., *Colorectal cancer risks in relatives of young-onset cases: is risk the same across all first-degree relatives?* Clin Gastroenterol Hepatol, 2007. **5**(10): p. 1195-8.
15. Papadopoulos, N., et al., *Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer*. Science, 1994. **263**(5153): p. 1625-9.
16. Bingham, S.A., et al., *Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study*. Lancet, 2003. **361**(9368): p. 1496-501.
17. Giovannucci, E., et al., *Aspirin and the risk of colorectal cancer in women*. N Engl J Med, 1995. **333**(10): p. 609-14.

18. Wagenaar-Miller, R.A., L. Gorden, and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about?* Cancer Metastasis Rev, 2004. **23**(1-2): p. 119-35.
19. Jasperson, K.W., et al., *Hereditary and familial colon cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2044-58.
20. Bedeir, A. and A.M. Krasinskas, *Molecular diagnostics of colorectal cancer*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(5): p. 578-87.
21. Bresalier, R.S., *Early detection of and screening for colorectal neoplasia*. Gut Liver, 2009. **3**(2): p. 69-80.
22. Hardcastle, J.D., et al., *Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer*. Lancet, 1996. **348**(9040): p. 1472-7.
23. Mandel, J.S., et al., *Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study*. N Engl J Med, 1993. **328**(19): p. 1365-71.
24. Nicholson, F.B., et al., *Review article: Population screening for colorectal cancer*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **22**(11-12): p. 1069-77.
25. Young, G.P., et al., *Choice of fecal occult blood tests for colorectal cancer screening: recommendations based on performance characteristics in population studies: a WHO (World Health Organization) and OMED (World Organization for Digestive Endoscopy) report*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(10): p. 2499-507.
26. Karl, J., et al., *Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of fecal occult blood and novel fecal protein markers*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008. **6**(10): p. 1122-8.
27. Duffy, M.J., et al., *Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use*. Eur J Cancer, 2007. **43**(9): p. 1348-60.
28. Hundt, S., U. Haug, and H. Brenner, *Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(10): p. 1935-53.
29. Nielsen, H.J., I.J. Christensen, and N. Brunner, *A novel prognostic index in colorectal cancer defined by serum carcinoembryonic antigen and plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1*. Scand J Gastroenterol, 2010. **45**(2): p. 200-7.
30. Sorensen, N.M., et al., *TIMP-1 is significantly associated with objective response and survival in metastatic colorectal cancer patients receiving combination of irinotecan, 5-fluorouracil, and folinic acid*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(14): p. 4117-22.
31. Imperiale, T.F., et al., *Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings*. N Engl J Med, 2000. **343**(3): p. 169-74.
32. Ii, M., et al., *Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(1): p. 20-7.
33. Brummer, O., et al., *MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study*. Gynecol Oncol, 2002. **84**(2): p. 222-7.
34. Folgueras, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 411-24.

35. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-74.
36. Amalinei, C., I.D. Caruntu, and R.A. Balan, *Biology of metalloproteinases*. Rom J Morphol Embryol, 2007. **48**(4): p. 323-34.
37. Nelson, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications*. J Clin Oncol, 2000. **18**(5): p. 1135-49.
38. Harrell, P.C., et al., *Proliferative effects of apical, but not basal, matrix metalloproteinase-7 activity in polarized MDCK cells*. Exp Cell Res, 2005. **303**(2): p. 308-20.
39. Wilson, C.L., et al., *Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense*. Science, 1999. **286**(5437): p. 113-7.
40. Shiomi, T. and Y. Okada, *MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers*. Cancer Metastasis Rev, 2003. **22**(2-3): p. 145-52.
41. Yamamoto, H., et al., *Association of matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 1999. **59**(14): p. 3313-6.
42. Aihara, R., et al., *Clinical significance of mucin phenotype, beta-catenin and matrix metalloproteinase 7 in early undifferentiated gastric carcinoma*. Br J Surg, 2005. **92**(4): p. 454-62.
43. Adachi, Y., et al., *Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers*. Gut, 1999. **45**(2): p. 252-8.
44. Yamamoto, H., et al., *Association of trypsin expression with tumour progression and matrilysin expression in human colorectal cancer*. J Pathol, 2003. **199**(2): p. 176-84.
45. Yamamoto, H., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression*. J Clin Oncol, 2001. **19**(4): p. 1118-27.
46. Adachi, Y., et al., *Clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression at the invasive front in human colorectal cancers*. Int J Cancer, 2001. **95**(5): p. 290-4.
47. Noe, V., et al., *Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 1): p. 111-118.
48. Hulboy, D.L., et al., *The influence of matrix metalloproteinase-7 on early mammary tumorigenesis in the multiple intestinal neoplasia mouse*. Oncol Rep, 2004. **12**(1): p. 13-7.
49. Yu, W.H., et al., *CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling*. Genes Dev, 2002. **16**(3): p. 307-23.
50. Nakamura, M., et al., *Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(3): p. 1011-6.

51. Powell, W.C., et al., *The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis*. Curr Biol, 1999. **9**(24): p. 1441-7.
52. Nagashima, Y., et al., *Expression of matrilysin in vascular endothelial cells adjacent to matrilysin-producing tumors*. Int J Cancer, 1997. **72**(3): p. 441-5.
53. Zheng, H.C., et al., *Role of PTEN and MMP-7 expression in growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma*. Pathol Int, 2003. **53**(10): p. 659-66.
54. Lin, H.C., et al., *Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(11): p. 2517-24.
55. Fingleton, B.M., et al., *Matrilysin in early stage intestinal tumorigenesis*. APMIS, 1999. **107**(1): p. 102-10.
56. Zeng, Z.S., et al., *Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(1): p. 144-8.
57. Takeuchi, N., et al., *Matrilysin gene expression in sporadic and familial colorectal adenomas*. Mol Carcinog, 1997. **19**(4): p. 225-9.
58. Heslin, M.J., et al., *Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis*. Ann Surg, 2001. **233**(6): p. 786-92.
59. apakkan aksun saliha and o.b. dilek özmen, *Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar*
2001.
60. Gomez, D.E., et al., *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*. Eur J Cell Biol, 1997. **74**(2): p. 111-22.
61. Greene, J., et al., *Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4*. J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30375-80.
62. Lambert, E., et al., *TIMPs as multifacial proteins*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **49**(3): p. 187-98.
63. Murphy, G., et al., *The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity*. Biochemistry, 1991. **30**(33): p. 8097-102.
64. Garnett, M.C. and R.W. Baldwin, *An improved synthesis of a methotrexate-albumin-791T/36 monoclonal antibody conjugate cytotoxic to human osteogenic sarcoma cell lines*. Cancer Res, 1986. **46**(5): p. 2407-12.
65. Moller Sorensen, N., et al., *Biology and potential clinical implications of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in colorectal cancer treatment*. Scand J Gastroenterol, 2008. **43**(7): p. 774-86.
66. Luparello, C., et al., *Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 1999. **54**(3): p. 235-44.
67. Soula-Rothhut, M., et al., *The tumor suppressor PTEN inhibits EGF-induced TSP-1 and TIMP-1 expression in FTC-133 thyroid carcinoma cells*. Exp Cell Res, 2005. **304**(1): p. 187-201.
68. Avalos, B.R., et al., *K562 cells produce and respond to human erythroid-potentiating activity*. Blood, 1988. **71**(6): p. 1720-5.

69. Fowlkes, J.L., et al., *Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-I action by matrix metalloproteinase-3 involves selective disruption of IGF-I/IGF-binding protein-3 complexes*. *Endocrinology*, 2004. **145**(2): p. 620-6.
70. Guedez, L., et al., *In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(11): p. 2002-10.
71. Wen, W., et al., *The generation of endostatin is mediated by elastase*. *Cancer Res*, 1999. **59**(24): p. 6052-6.
72. Zeng, Z.S. and J.G. Guillem, *Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer and liver metastases*. *Br J Cancer*, 1995. **72**(3): p. 575-82.
73. Tomita, T. and K. Iwata, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in colonic adenomas-adenocarcinomas*. *Dis Colon Rectum*, 1996. **39**(11): p. 1255-64.
74. Benson, A.B., 3rd, et al., *2000 update of American Society of Clinical Oncology colorectal cancer surveillance guidelines*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(20): p. 3586-8.
75. Goldstein, M.J. and E.P. Mitchell, *Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer*. *Cancer Invest*, 2005. **23**(4): p. 338-51.
76. Holten-Andersen, M.N., et al., *Quantitation of TIMP-1 in plasma of healthy blood donors and patients with advanced cancer*. *Br J Cancer*, 1999. **80**(3-4): p. 495-503.
77. Aldulaymi, B., et al., *Changes in soluble CEA and TIMP-1 levels during adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer*. *Anticancer Res*, 2010. **30**(1): p. 233-7.
78. Ghosh, N., et al., *COX-2 as a target for cancer chemotherapy*. *Pharmacol Rep*, 2010. **62**(2): p. 233-44.
79. Dubois, M.A., et al., *Multiplicative genetic effects in scrapie disease susceptibility*. *C R Biol*, 2002. **325**(5): p. 565-70.
80. Ogino, S., et al., *Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(24): p. 8221-7.
81. Chan, A.T., S. Ogino, and C.S. Fuchs, *Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer*. *JAMA*, 2009. **302**(6): p. 649-58.
82. Shattuck-Brandt, R.L., et al., *Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10(-/-) mice*. *Gastroenterology*, 2000. **118**(2): p. 337-45.
83. Wiese, F.W., P.A. Thompson, and F.F. Kadlubar, *Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(1): p. 5-10.
84. Sheng, H., et al., *Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells*. *Cancer Res*, 1998. **58**(2): p. 362-6.
85. Tsujii, M., S. Kawano, and R.N. DuBois, *Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(7): p. 3336-40.
86. Rao, C.V., et al., *Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by an inducible nitric oxide synthase-selective inhibitor*. *Carcinogenesis*, 1999. **20**(4): p. 641-4.
87. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2009*. *CA Cancer J Clin*, 2009. **59**(4): p. 225-49.
88. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*, 1990. **61**(5): p. 759-67.
89. Vihinen, P. and V.M. Kahari, *Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets*. *Int J Cancer*, 2002. **99**(2): p. 157-66.

90. Hewitt, R.E., et al., *Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) in a more tumourigenic colon cancer cell line*. J Pathol, 2000. **192**(4): p. 455-9.
91. Theret, N., et al., *Overexpression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in liver from patients with gastrointestinal adenocarcinoma and no detectable metastasis*. Int J Cancer, 1997. **74**(4): p. 426-32.
92. Nastase, A., et al., *Prognostic and predictive potential molecular biomarkers in colon cancer*. Chirurgia (Bucur), 2011. **106**(2): p. 177-85.
93. Martinez-Fernandez, A., et al., *Serum matrilysin levels predict outcome in curatively resected colorectal cancer patients*. Ann Surg Oncol, 2009. **16**(5): p. 1412-20.
94. Yeh, C.Y., et al., *Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrilysin (MMP-7) in T1 adenocarcinoma of the colon and rectum to predict lymph node metastases or distant metastases*. Hepatogastroenterology, 2011. **58**(112): p. 1943-6.
95. Maurel, J., et al., *Serum matrix metalloproteinase 7 levels identifies poor prognosis advanced colorectal cancer patients*. Int J Cancer, 2007. **121**(5): p. 1066-71.
96. Kirimlioglu, H., et al., *Role of matrix metalloproteinase-7 in colorectal adenomas*. Dig Dis Sci, 2006. **51**(11): p. 2068-72.
97. Luo, H.Z., et al., *[Expression and clinical significance of matrilysin (MMP-7) in human rectal cancer]*. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2007. **38**(4): p. 637-40.
98. Gomez-Iturriaga Pina, A., et al., *Median 5 year follow-up of 125iodine brachytherapy as monotherapy in men aged ≤ 55 years with favorable prostate cancer*. Urology, 2010. **75**(6): p. 1412-6.
99. Rath, T., et al., *Enhanced expression of MMP-7 and MMP-13 in inflammatory bowel disease: a precancerous potential?* Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(11): p. 1025-35.
100. Waas, E.T., et al., *Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 correlate with disease stage and survival in colorectal cancer patients*. Dis Colon Rectum, 2005. **48**(4): p. 700-10.
101. Holten-Andersen, M.N., et al., *High preoperative plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels are associated with short survival of patients with colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(11): p. 4292-9.
102. Holten-Andersen, M.N., et al., *Total levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in plasma yield high diagnostic sensitivity and specificity in patients with colon cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(1): p. 156-64.
103. Holten-Andersen, M.N., et al., *Plasma TIMP-1 in patients with colorectal adenomas: a prospective study*. Eur J Cancer, 2004. **40**(14): p. 2159-64.
104. Inagaki, D., et al., *Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene correlates with poor outcomes in colorectal cancer*. Anticancer Res, 2010. **30**(10): p. 4127-30.
105. Giaginis, C., et al., *Serum tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and 2 (TIMP-1 and TIMP-2) levels in colorectal cancer patients: associations with clinicopathological variables and patient survival*. Int J Biol Markers, 2009. **24**(4): p. 245-52.
106. Lee, J.H., J.W. Choi, and Y.S. Kim, *Plasma or serum TIMP-1 is a predictor of survival outcomes in colorectal cancer: a meta-analysis*. J Gastrointest Liver Dis, 2011. **20**(3): p. 287-91.
107. Lim, Y.K., M.H. Kam, and K.W. Eu, *Carcinoembryonic antigen screening: how far should we go?* Singapore Med J, 2009. **50**(9): p. 862-5.

108. Mroczko, B., et al., *The diagnostic value of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 (TIMP-1) determination in the sera of colorectal adenoma and cancer patients*. Int J Colorectal Dis, 2010. **25**(10): p. 1177-84.
109. Wang, W.S., et al., *Preoperative carcinoembryonic antigen level as an independent prognostic factor in colorectal cancer: Taiwan experience*. Jpn J Clin Oncol, 2000. **30**(1): p. 12-6.
110. Irvine, T., M. Scott, and C.I. Clark, *A small rise in CEA is sensitive for recurrence after surgery for colorectal cancer*. Colorectal Dis, 2007. **9**(6): p. 527-31.
111. Sheng, H., et al., *Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2*. J Clin Invest, 1997. **99**(9): p. 2254-9.
112. Eberhart, C.E., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas*. Gastroenterology, 1994. **107**(4): p. 1183-8.
113. Wasilewicz, M.P., et al., *Expression of cyclooxygenase-2 in colonic polyps*. Pol Arch Med Wewn, 2010. **120**(9): p. 313-20.
114. Han, Y.D., et al., *Relation of the expression of cyclooxygenase-2 in colorectal adenomas and adenocarcinomas to angiogenesis and prognosis*. J Korean Soc Coloproctol, 2010. **26**(5): p. 339-46.
115. Ransohoff, D.F. and C.A. Lang, *Screening for colorectal cancer with the fecal occult blood test: a background paper*. American College of Physicians. Ann Intern Med, 1997. **126**(10): p. 811-22.
116. Hamaya, Y., et al., *Factors that contribute to faecal cyclooxygenase-2 mRNA expression in subjects with colorectal cancer*. Br J Cancer, 2010. **102**(5): p. 916-21.
117. Kanaoka, S., et al., *Potential usefulness of detecting cyclooxygenase 2 messenger RNA in feces for colorectal cancer screening*. Gastroenterology, 2004. **127**(2): p. 422-7.
118. Stubbs, R.S., D.M. Nadkarni, and H.A. Monsey, *Faecal carcinoembryonic antigen in colorectal cancer patients*. Gut, 1986. **27**(8): p. 901-5.
119. Sugano, K., et al., *Detection of increased fecal carcinoembryonic antigen and its characterization as a membrane-bound form in colorectal carcinoma and other gastrointestinal disorders*. Jpn J Cancer Res, 1989. **80**(12): p. 1156-60.
120. Kim, Y., et al., *Gastrointestinal tract cancer screening using fecal carcinoembryonic antigen*. Ann Clin Lab Sci, 2003. **33**(1): p. 32-8.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**ÇALIŞMAYA KATILAN GÖNÜLLÜNÜN İSMİ:**

Kalın barsak kanserleri sıklığı tüm kanserler arasında üst sıralarda yer almaktadır. Deneysel çalışmalarda sonuçlarla MMP-7 (metalloproteinaz-7),TIMP-1 (spesifik metalloproteinaz doku inhibitörü-1) ve COX-2 (siklooksijenaz-2) isimli maddelerin insan kalın barsak kanseri ve polip gelişiminde de önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu amaçla bizde sıklığı yaşla gittikçe artan ve kolon kanseri için öncül lezyon olarak kabul edilen kolon polip dokusunda ve kolon kanser dokusunda bu proteinlerin salınımını değerlendirmeyi, kolorektal kanser oluşum mekanizmasına katkı sağlamayı amaçladık.

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalında Alt gastrointestinal sistem endoskopisi esnasında kolon polibi saptanıp biyopsi alınan ve yine endoskopik işlemde kolon kanseri ile uyumlu bulguları saptanıp biyopsi alınan ve kolonoskopisi tamamen normal saptanan hastalar alınacaktır. Hastalardan kolonoskopi işlemi öncesinde feçes örneği alınacaktır. Kolonoskopi öncesi rutin kan testleriniz için alınacak kanın bir bölümü bu araştırmaya yardımcı olmak için kullanabilmemiz için müsaadenizi istiyoruz.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

Bu çalışmaya katılmamakta özgürsünüz. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmaya katılmanız veya katılmamanız tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınız ve yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli tutulacaktır. Çalışma verileri herhangi bir yayın yada raporda kullanılırken bu yayınlarda isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın Adı Soyadı:

(Hasta onay veremeyecekse)Yakınının Adı Soyadı:

Yakınlığı:

Tarih:

İmzası:

Adres:

Telefon:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin adı:

Görevi:

İmzası:

Tarih:

Açıklama yapan araştırmacının adı: Rabia Soyadı: KIYAK

Telefon:0-232-4122559

Tarih:

İmzası: