

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**REKTAL KANSER TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN
TAKİBİNDE KULLANILABİLECEK ADAY
TÜMÖR BELİRTEÇLERİN GEN
İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

FATMA DEMET ARSLAN

**MOLEKÜLER TIP
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2021

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2014970076

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**REKTAL KANSER TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN
TAKİBİNDE KULLANILABİLECEK ADAY
TÜMÖR BELİRTEÇLERİN GEN
İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**MOLEKÜLER TIP
DOKTORA TEZİ**

FATMA DEMET ARSLAN

Danışman Öğretim Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Harun MUAYAD SAİD

İkinci Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Yasemin SOYSAL

Bu araştırma 3001-TUBİTAK-Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı kapsamında
116S225 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2014970076

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kolorektal Kanser.....	4
2.1.1. Epidemiyoloji.....	4
2.1.2. Risk Faktörleri.....	5
2.1.3. Lokal İleri Evre Rektal Kanser.....	8
2.1.4. “Bekle ve Gör” Yaklaşımı.....	13
2.3. Kanserde Apoptozis, Otofaji ve Hipoksi İlişkili Moleküller.....	13
2.3.1. Survivin.....	13
2.3.2. Beclin-1.....	16
2.3.3. Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α).....	20
2.3.4. Karbonik Anhidraz-9 (CA9)	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Araştırmanın Tipi.....	26
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	27
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	27
3.4. Araştırmanın Materyali.....	27
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	27
3.6. Araştırmada Kullanılan Araç, Gereç ve Sarf Malzemeleri.....	27
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Araç ve Gereçleri.....	27
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Sarf Malzemeleri.....	30
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	31
3.8. Yöntemler.....	32
3.8.1. Hastalara sırasıyla uygulanacak tanı ve tedavi yaklaşımları.....	32

3.8.2. Doku örneklerinden total RNA ve Protein izolasyonu ve ölçümü.....	33
3.8.3. Kan örneklerinden total RNA izolasyonu ve ölçümü.....	35
3.8.4. Doku ve kan örneğindeki Beclin 1, Survivin, HIF-1 α ve CA9 gen ifadenme analizi....	35
3.8.5. Kan örneklerinde Beclin 1, Survivin, HIF-1 α ve CA9 protein düzey analizi.....	37
3.8.6. Doku örneklerinde Beclin 1, Survivin, HIF-1 α ve CA9 protein düzey analizi.....	38
3.8.6.1. SDS-PAGE jelin hazırlanması.....	38
3.8.6.2. Örnek hazırlanması ve jelin yüklenmesi.....	39
3.8.6.3. Elektroforetik yürütme.....	39
3.8.6.4. Proteinlerin membrana transferi.....	40
3.8.6.5. Jelde proteinlerin Coomassie Brilliant Blue Boyası ile görüntülenmesi.....	40
3.8.6.6. Bloklama.....	41
3.8.6.7. Primer antikor ile inkübasyon.....	41
3.8.6.8. Sekonder antikor ile inkübasyon.....	41
3.8.6.9. Görüntüleme.....	41
3.8.6.10. Dansitometrik analiz.....	42
3.9. Verilerin Değerlendirilmesi.....	42
3.10. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	43
4. BULGULAR	44
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ	57
7. KAYNAKLAR	59
8. EKLER	72
8.1. Kullanım izinleri.....	72
8.2. Etik kurul raporu.....	74
8.3. Özgeçmiş.....	78
8.4. Doktora tezi ile ilgili yayınlanmış makale.....	86

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Hücresel döngü, proliferasyon, ölüm, strese yanıt, iletişim ve metabolizma ile ilgili yollardaki aday biyobeliteler

Tablo 2. Survivin proteininin farklı kanserlerde ifadenmesi

Tablo 3. Kanserde Beclin 1'in post-translasyonel modifikasyonlar

Tablo 4. Araştırma sırasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB' da kullanılan araç ve gereçler

Tablo 5. Araştırma sırasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı' nda kullanılan araç ve gereçler

Tablo 6. Araştırmanın ayrıntılı planı ve takvimi

Tablo 7. AJCC'ye göre kolorektal kanser hastalarında TNM evrelemesi

Tablo 8. RT-qPCR reaksiyon karışım içerikleri

Tablo 9. SDS-PAGE yönteminde ayırıcı jelin (%12) içeriği

Tablo 10. SDS-PAGE yönteminde paketleyici jelin (%4) içeriği

Tablo 11. Hastalar ait tanımlayıcı özellikler

Tablo 12. Tümör regresyon sınıflamasına göre tedavi öncesi kan ve doku örneklerinde *Beclin 1*, *Survivin*, *HIF-1α* ve *CA9* gen ifadenmesi ve protein düzeyleri

Tablo 13. T evresindeki gerilemeye göre tedavi öncesi kan ve doku örneklerinde *Beclin 1*, *Survivin*, *HIF-1α* ve *CA9* gen ifadenmesi ve protein düzeyleri

Tablo 14. N evresindeki gerilemeye göre tedavi öncesi kan ve doku örneklerinde *Beclin 1*, *Survivin*, *HIF-1α* ve *CA9* gen ifadenmesi ve protein düzeyleri

Tablo 15. Neoadjuvan tedavi öncesi ve sonrası kan ve doku örneklerinde *Beclin 1*, *Survivin*, *HIF-1α* ve *CA9* gen ifadenmesi ve protein düzeyleri

Tablo 16. Doku ve kandaki Beclin 1, Survivin, HIF-1α ve CA9 arasındaki korelasyon katsayısı ve p değeri

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Survivin proteininin yapısı ve işlevi

Şekil 2. Apoptoza giden survivin yolları

Şekil 3. Otofajide Beclin 1 fonksiyonu ve kanserde post-translasyonel modifikasyonlarının rolü

Şekil 4. HIF-1 α ve dört fonksiyonel alanının şematik gösterimi

Şekil 5. Kanserde HIF-1 α ifadelenmesi

Şekil 6. Hipoksik kanser hücrelerinde pH regülasyonunda CA9 rolünün şematik modeli

Şekil 7. RT-qPCR analizine ait temsili görüntüler

Şekil 8. Doku örneklerinin temsili Western Blot analiz görüntüleri

Şekil 9. Neoadjuvan tedavi öncesi tümör regresyon derecesine göre kandaki *CA9* gen ifadelenmesi (A) ve HIF-1 α protein seviyeleri (B)

Şekil 10. Neoadjuvan tedaviden önce ve sonra doku *Beclin 1* (A) ve kan *Survivin* gen ifadesi (B); doku CA9 (C), kan Beclin 1 (D) ve kan HIF-1 α (E) protein düzeyleri

KISALTMALAR

RK: Rektal Kanser

HIF-1 α : Hipoksi İle İndüklenebilir Faktör-1 α

CA9: Karbonik Anhidraz-9

NCCN: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı

AJCC: Amerikan Kanser Ortak Komitesi

TNM: Tümör-Lenf Nodu-Metastaz

BCA: Biçinkonik

cDNA: Komplementer DNA

RT-qPCR: Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ELISA: Enzim-bağılı immünosorbent analiz

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

PAGE: Poliakrilamid Jel Elektroforez

TEMED: Tetrametil etilendiamin

TBST: Tris Tampon Çözeltilisi Tamponu

TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Doktora Programına başladığım tarihten itibaren eğitim sürem boyunca katkısını gördüğüm, teorik ve pratik olarak ders aldığım tüm hocalarıma,

Hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, yaptığım işte övgüleri ile beni yüreklendiren, umutsuzluğa kapıldığımda yol gösteren Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüray İşlekel'e,

Doktora Programına kabul edilmemde beni cesaretlendiren, bu kapıyı bana açan, vizyonu ile ışık tutan, güler yüzlü, öğrenci dostu ve tez izleme sırasında yine beni yalnız bırakmayan, hep daha iyiyi bulmamı sağlayan tez izleme komitesi üyelerinden Prof. Dr. Gül Güner Akdoğan'a,

Tez izleme sırasında olumlu eleştirileri ile eksiklerimi tamamlayan, tezimin her aşamasında alternatif çözüm önerileri sunarak desteğini her daim hissettiğim ve laboratuvarının kapılarını açan tez izleme komitesi üyelerinden Prof. Dr. Sefa Kızıldağ'a,

Tezimin ana hatlarını oluşturan ve fikir veren, motive eden, hep daha fazlasını isteyen, güleryüzlü ve bol ikramları ile danışmanlarım Dr. Öğr. Üyesi Harun Muayad Said'e ve Doç.Dr. Yasemin Soysal'a

Tezimin laboratuvar çalışmalarını yapmamda gecesini gündüze katan ve en fazla desteği aldığım Dr. Ayşe Koçak'a,

Tezimin her aşamasında desteklerini esirgemeyen Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde görev alan hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma ve meslektaşlarıma,

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, sabır gösteren, kimi zaman eğitim sevdasıyla ihmal ettiğim, birlikte geçireceğimiz zamanlardan çaldığım, canım anneme, babama, ablama, abime ve biricik oğlum Mercan'a çok teşekkür ederim.

Sizler olmadan hedeflerime ulaşamazdım.

Fatma Demet Arslan

Şubat, 2021

ÖZET

REKTAL KANSER TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN TAKİBİNDE KULLANILABİLECEK ADAY TÜMÖR BELİRTEÇLERİN GEN İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma Demet Arslan

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı,
35340, Balçova, İzmir, Türkiye
fatmademet.arslan@gmail.com

Amaç: Neoadjuvan tedaviye direnç veya hastalık nüksü; hipoksi, apoptoz veya otofajiye uyum nedeniyle gelişmektedir. Apoptoz inhibitörü olarak survivin, otofajik yolda pozitif bir regülatör olan Beclin 1 ve tümör doku hipoksisi ile ilişkili *hipoksi ile indüklenebilir faktör-1a* (*HIF-1a*) ve *karbonik anhidraz 9* (*CA9*) gen ürünleri etki ettikleri apoptoz, otofaji ve hipoksik yolaklar ile tedaviye direnç gelişmesine neden olabilirler. Bu çalışmada, lokal ileri evre rektal kanserde (RK), neoadjuvan tedaviye yanıt izlemeye yardımcı olabilecek bu potansiyel tümör belirteçlerinin gen ifadenmesindeki değişimler izlenerek tedaviye direnç üzerindeki etkilerinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya neoadjuvan tedavi alan lokal ileri evre RK'li 25 hasta dahil edildi. Taze doku ve kan örneklerinde *Beclin 1*, *survivin*, *HIF-1a* ve *CA9* gen ifadenmesi ve protein seviyeleri analiz edildi. Hastaların tümör evrelemesi ve regresyon derecesi ile bu belirteçlerin ilişkisi değerlendirildi.

Bulgular: Tümör regresyon derecesine göre neoadjuvan tedaviye yanıt veren grupta daha yüksek kan *CA9* gen ifadenme seviyeleri ve daha düşük kan *HIF-1a* protein seviyeleri bulundu. Hastalarda neoadjuvan tedavi sonrası, doku *Beclin 1* ve kan *survivin* gen ifadeleri ve doku *CA9*, kan *Beclin 1* ve kan *HIF-1a* protein seviyeleri önemli ölçüde azaldı.

Sonuç: *Beclin 1*, *survivin*, hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 alfa ve karbonik anhidraz 9'un uygulanan neoadjuvan tedavi yaklaşımının etkilerinin tahmininde fayda sağlayabilecek potansiyel belirteçler olarak belirlendi.

Anahtar Sözcükler: *Beclin 1*, *survivin*, hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 alfa, karbonik anhidraz 9, rektal kanser, neoadjuvan tedavi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GENE EXPRESSION OF THE CANDIDATE TUMOR MARKERS THAT CAN BE USED FOR FOLLOW UP THE EFFECTIVENESS OF RECTAL CANCER TREATMENT

Fatma Demet Arslan

Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine
35340, Balçova, İzmir, Turkey
fatmademet.arslan@gmail.com

Objective: The disease recurrence or resistance to neoadjuvant treatment develops due to the adaptation to hypoxia, apoptosis or autophagy. *Survivin* as being one of the inhibitor of apoptosis, *Beclin 1* which is a positive regulator in the autophagy pathway, and *hypoxia-inducible factor-1 α* (*HIF-1 α*) and *carbonic anhydrase 9* (*CA9*) which are associated with tumor tissue hypoxia and their gene product may be related with resistance to treatment by apoptosis, autophagy and hypoxic pathways that they affect. Thus, we aimed to illuminate the effects on treatment resistance by following changes in the gene expressions of these potential tumor markers that may help to monitor the response to neoadjuvant treatment in locally advanced rectal cancer (RC).

Method: Twenty-five patients with locally advanced RC received neoadjuvant therapy were included in the study. Gene expression and protein levels of *Beclin 1*, *survivin*, *HIF-1 α* and *CA9* were analyzed in fresh tissue and blood samples. The relationship of these markers with tumor staging and regression grade of patients were evaluated.

Results: Higher blood *CA9* gene expression levels and lower blood *HIF-1 α* protein levels were found in the group responded to neoadjuvant treatment according to tumor regression grade. After neoadjuvant treatment in patients, tissue *Beclin 1* and blood *survivin* gene expressions, and tissue *CA9*, blood *Beclin 1* and blood *HIF-1 α* protein levels decreased significantly.

Conclusion: *Beclin 1*, *survivin*, *hypoxia-inducible factor-1 alpha* and *carbonic anhydrase-9* were considered as potential markers that might provide benefit in the prediction of the effects of the applied neoadjuvant treatment approach.

Key Words: *Beclin 1*, *survivin*, *hypoxia-inducible factor-1 alpha*, *carbonic anhydrase 9*, rectal cancer, neoadjuvant treatment

1. GİRİŞ VE AMAC

Rektal kanser (RK), dünya genelinde, erkek ve kadınlarda, yüksek morbidite ve mortalite nedenini oluşturmaktadır (1). Temel tedavi yaklaşımı radikal cerrahi olmakla birlikte tamamlayıcı olarak neoadjuvan tedaviler kullanılmaktadır. Neoadjuvan tedavi sonrasında hastaların %8-20'sinde patolojik olarak tedaviye tam yanıt, %30-60' ında kısmi yanıt ve kalanında da tedaviye direnç gözlenmektedir (2,3). Hücre ölümünün amaçlandığı bu gastrointestinal onkoloji tedavilerinde apoptoza direnç nedeniyle yetersiz tedavi ve nüks riski bulunmaktadır. Rektal kanserde hücre ölümü direncinin üstesinden gelinmesi hedeflenmektedir. Ayrıca otofajinin de apoptoz ile birlikte olduğu mekanizmalar gösterilmiş ve bu nedenle rektal kanser tedavisinde hücre ölümü direncinin üstesinden gelmek için apoptotik ve otofajik mekanizmalarının birlikte kullanıldığı tedaviler araştırılmıştır (4,5,6).

Survivin, apoptoz ailesi inhibitörlerinden birisidir ve etkisini kaspaz aktivitesini bloke ederek gösterir. *Survivin* geninin, RK hastalarında aşırı ifadelendiği, böylece tümör hücrelerinin hücre ölümünden korunduğu ve kötü prognozu gösterdiği belirtilmiştir (7,8). Survivin'in bu özelliği onun tedavide hedef olmasına neden olmuş ve yapılan araştırmalarda survivin antisens oligonükleotidlerinin *in vitro* olarak RK' de hücre ölümüne yol açtığı kanıtlanmıştır (9).

Hipoksinin ve büyüme faktörünün olmadığı koşullarda otofaji, tümör hücresine yaşamı sürdürme kabiliyeti sağlar (10,11). Otofagozom oluşumu hipoksik bir ortamda büyüyen tümörlerin en belirgin özelliğidir. Beclin 1, hücrel strese tepki olarak indüklenmiş ve tümör hücre yaşamının devam etmesi için otofajik yolda pozitif düzenleyicidir. Beclin 1'in baskılanması RK hücrelerini apoptoza duyarlı hale getirmek için kullanılan bir başka tedavi hedefidir (12). Ayrıca Beclin 1 ve survivin arasında etkileşim olduğu gösterilmiştir. Beclin 1'in susturulması ile survivin protein ifadesinin azaldığı ve hızla metabolize edildiği tespit edilmiştir (13). Bu durum otofaji ve apoptoz arasındaki bağlantı temelini açıklayabilir.

Tümör hücrelerinin hipoksiye uyumu, otofaji gibi diğer yaşamı sürdürme kabiliyetini arttıran sebeplerdendir. Damarlardaki yapısal ve fonksiyonel anormallik ve tümör hücrelerinin hızlı çoğalması nedeniyle birçok tümör dokusunda hipoksi bulunmaktadır. Tümör anjiyojenez yokluğunda 2 mm³' den daha fazla büyüyemez. Hipoksi anjiyojenez indüksiyonu için önemli bir sinyaldir ve hipoksi tarafından düzenlenen anjiogenik faktörlerin çoğu, hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α ' nın (HIF-1 α) kontrolü altındadır (14,15). *HIF-1 α* 'nın gen ifadenmesini arttırdığı genlerden biri *karbonik anhidraz 9*' dur (*CA9*) (16). *CA9* geninin, *CA9*

proteinini kodladığı ve tümör hücrelerinde hipoksi ile güçlü bir şekilde uyarılabildiği gösterilmiştir (17). Rektal tümörlerde özellikle yüksek proliferasyon alanlarında *CA9* gen ifadenmesinin yüksek olduğu (18) ve önemli bir prognostik faktör olduğu bulunmuştur (19).

Tedaviye direnç RK hastaları için önemli bir klinik problemdir. Hipoksiye uyum ve apoptotik-otofajik denge ile ilgili anahtar genlerdeki ifadenmenin belirlenmesi, gastrointestinal kanserlerde tedaviye yanıtı öngörmede yarar sağlayabilir. Tanı ve tedavi aşamasında duyarlı ve dirençli tümörleri ayırmak için moleküler biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Bu tür biyobelirteçler multimodal tedaviye hastanın bireysel tümör yanıtını tahmin etmek için kullanılabilir. Buna ek olarak, dirençli ve duyarlı tümörler arasında farklı şekilde ifade edilen genler yeni tedavi hedeflerini belirlemek ve böylece yeni tedavi stratejilerinin uygulanmasına yardımcı olmak için kullanılabilir. Bununla birlikte RK’de neoadjuvan tedaviye yanıt ile *Beclin 1*, *survivin*, *HIF-1α* ve *CA9*’un ilişkisini araştıran çok az çalışma bulunmaktadır.

Önceki çalışmaların değerlendirilmesi sonucu ortaya çıkan araştırma sorusu, “lokal ileri evre RK hastalarında neoadjuvan tedaviye yanıt ile *Beclin 1*, *survivin*, *HIF-1α* ve *CA9* gen ifadenmesi ve protein düzeyleri arasında ilişki var mı?” şeklindedir.

Araştırmanın hipotezi ise; *Beclin 1*, *survivin*, *HIF-1α* ve *CA9* gen ifadenmesi ve protein düzeyleri, lokal ileri evre RK hastalarında neoadjuvan tedaviye yanıtını öngörebilir.

Amacımız, lokal ileri evre rektal kanserli hastada neoadjuvan tedaviye yanıtı izlemede yardımcı olabilecek farklı belirteçlerin (*Beclin 1*, *survivin*, *HIF-1α* ve *CA9*) tedavi öncesi ve sonrası kan ve taze doku örneklerinde hem gen ifadesi ve hem de protein seviyelerini analiz ederek tümör evreleme ve regresyon sınıflandırması ile ilişkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

2.1.1. Epidemiyoloji

2018 yılında kolorektal kanser (KRK), tüm kanser teşhislerinin %11’ini oluşturan, dünya çapında en sık teşhis edilen üçüncü kanser türüdür. KRK, gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre 3-4 kat daha yaygındır. Dünyada yaşa göre standartlaştırılmış her iki cinsiyette de 100.000 kişi başına KRK insidans oranları 19.7, erkeklerde 23.6 ve kadınlarda 16.3’tür (20).

Erkekler arasında yaşa göre standardize edilmiş insidans oranı, insani gelişme endeksi yüksek ülkelerde 30.1/100.000 iken, düşük ülkelerde 8.4'tür (kadınlar için aynı istatistikler sırasıyla 20.9 ve 5.9'dur). Dünyada her iki cinsiyette 100.000 KRK hastası başına yaşa göre standartlaştırılmış ölüm oranları 8,9'dur. KRK kaynaklı mortalite, bir dereceye kadar (düşük ve yüksek insani gelişme endeksi arasında yaklaşık 2-3 kat fark) ülkenin gelişimsel durumundan etkilenir. Yaşa göre standartlaştırılmış ölüm oranı yüksek insani gelişme endeksi olan ülkelerinde erkeklerde 12.8/100.000 ve düşük insani gelişme endeksi olan ülkelerde 5.7/100.000'dir. Aynı oranlar kadınlarda 8.5 ve 3.8'dir (21).

Avrupa Birliği'nde RK insidansının yılda 125.000, yani toplam KRK insidansının %35'i olduğu, bunun yılda 100.000 kişi başına 15-25 vakayı yansıttığı ve her iki cinsiyette de artacağı tahmin edilmektedir. Mortalite yılda 100.000 kişi başına 4-10 vakadır (22).

Türkiye'de ise 2016 verilerine göre KRK erkeklerde 100.000 kişi başına 25.3, kadınlarda 14.2 insidans hızına sahiptir ve her iki cinste tüm kanserler içinde 3.sırada yer almaktadır (23).

2.1.2. Risk Faktörleri

Yaş: Sporadik KRK için major bir risk faktörü yaştır. 1990 yılı çalışmasına göre KRK 40 yaş altında nadirdir. İnsidans 40-50 yaş arasında önemli ölçüde artmaya başlar (24). Bununla birlikte 1998 yılından itibaren 50 yaş ve üzerindeki KRK insidansında istikrarlı bir düşüş ancak genç yetişkinler için tam tersi bir eğilim gözlemlendiği bildirilmiştir (25).

İrk: KRK gelişme riski diyet ve yaşam stili düşük insidans bölgelerinde (özellikle Asya ve Afrika) önemli olmasına rağmen ırksal ve etnik eğilim de bulunmaktadır. Afrikan Amerikalıların tüm etnik gruplar içinde KRK oranı en yüksektir ve KRK mortalitesi beyazlardan yaklaşık %20 daha yüksektir (21).

Cinsiyet: Hem kadın hem erkek cinsiyette yeni tanı konmuş tüm kanser vakaları arasında ve mortalite oranları açısından 3. sıradadır. Bununla birlikte hem KRK insidansının hem de hastalık mortalitesinin erkeklerde kadınlardan yaklaşık %25-26 daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (21).

Hereditör KRK Sendromları: Çoğunluğu otozomal dominant geçişli ve kolon kanseri gelişimi çok yüksek riskli spesifik genetik bozukluklardır. KRK için ailesel predispoze sendromlar; hereditör polipozis sendromları, familyal adenomatöz polipozis (FAP), Lynch sendromu, hemartamatöz polipozis sendromları (Juvenil polipozis, Peutz-Jeghers sendromu,

Cowden sendromu, Bannayan-Riley-Ruvalcaba sendromu, herediter miks polipozis sendromu, Gorlin sendromu, Birt-Hogg-Dube sendromu, nörofibromatosis tip I ve multipl endokrin neoplazi sendromu 2B), MUTYH-ilişkili adenomatoz polipozis ve Li-Fraumeni sendromudur (27).

FAP ve Lynch sendromu, ailesel kolon kanser sendromlarının en yaygınıdır. Fakat her ikisi KRK vakalarının sadece %5'idir (28). FAP ve varyantları (Gardner's Sendromu, Turcot's Sendromu ve zayıflamış FAP) KRK'nin %1'inden azıdır (27). Tipik FAP'ta çok sayıda kolonik adenom çocukluk çağında (ortalama 16 yaş) görülür. 45 yaşında tedavi edilmemiş kişilerin %87'sinde kolonik kanser oluşur (27). FAP'ın zayıflatılmış bir formunda (AFAP) ise kolon kanser riski yüksektir ve ortalama kanser tanı yaşı 54'tür (28).

Lynch sendromu veya Herediter non-polipozis KRK, FAP'tan daha yaygın ve tüm kolonik adenokarsinomların yaklaşık %3'ü kadar olan otozomal dominant bir sendromdur. (29). Lynch sendromlu hastalarda gelişen KRK'ler erken yaş başlangıçlıdır (30). İlk kanser tanısının ortalama yaşı yaklaşık 48'dir. Bazı hastalarda 20'li yaşlarda da ortaya çıkar (31). KRK için yaşam boyu risk %80' dir (32).

MUTYH ilişkili polipozis (MAP), otozomal resesif geçişli 50'li yaşlarda polip sayısı 10'lara 100'lere ulaşabilen bir sendromdur (33). KRK riski 40-60 yaşları arasında %80'dir (34). KRK olana kadar hastaların çoğu MAP tanısı almamaktadır (35).

Sporadik KRK'nın Kişisel veya Aile Öyküleri: Geniş adenomatöz polip (>1 cm), villöz veya tubulovillöz histolojili polipler veya yüksek grade'li multiple displazi gibi kişisel hikayesi olanlarda KRK rölatif risk oranı %3.5-6.5 arasında değişmektedir. (36).

Tanımlanmış genetik yatkınlığı olan sendromların dışında aile öyküsü önemli bir risk faktörüdür. Birinci derece yakını KRK olanlarda genel popülasyondan yaklaşık iki kat risk artışı vardır. Bu nedenle KRK veya adenom teşhisi konmuş birinci derece akrabası olan hastalara 40 yaşından itibaren kolonoskopik taramasına başlanması ve her 5 yılda bir tekrar edilmesi önerilmektedir (37).

İnflamatuvar Barsak Hastalığı (İBH): Lynch sendromu ve FAP'dan sonra KRK'nın 3. yaygın nedenidir. İBH olanlarda yaşam boyu KRK gelişme riski %20-30 iken mortalitesinin yaklaşık %50 olduğu bilinmektedir. Kolit ilişkili KRK başlangıç yaşı, 40-55 yaşları arasındadır (38).

Abdominal Radyasyon: Çocukluk çağı malignansileri nedeniyle abdominal radyasyon alanlarda yetişkin döneminde gastrointestinal neoplazmın riski artmıştır (39). Bu

gastrointestinal neoplazilerin çoğu KRK'dır ve 4.2 kat risk artışı vardır. Radyasyon dozu ve volümü riski artırır (40). Çocuk Onkoloji Gruplarının kılavuzlarında çocukluk çağı kanserinin takibinde abdominal radyasyon (≥ 30 Gy) alan hastalarda, 35 yaşında veya radyoterapiden 10 yıl sonra her 5 yılda kolonoskopi tavsiye edilmektedir (41). Prostat kanseri için radyoterapi öyküsü rektal kanserin artmış riski ile ilişkilidir (42).

Akromegali: Hem kolonik adenom hem KRK'nın sıklığı özellikle kontrolsüz hastalarda artar (43). Kolonik polipler akromegalinin en patognomonik özelliklerinden biridir ve prevalansı normal popülasyondan 2-3 kat daha fazladır. Daha agresif olma eğilimi ile KRK insidansı yaklaşık 4.4 kat artmıştır (44). Akromegali Konsensus Grubu kılavuzunda tanı anında premaling kolonik poliplerin tedavisini ve erken saptama için kolonoskopiye tavsiye etmektedir (45).

Renal Transplantasyon: Uzun dönem immunsupresyon ilişkili olarak renal transplantasyon KRK riski ile ilişkilidir. Bazı kurumlar tarafından renal transplant alıcıları transplantasyondan sonra 5 yılda veya 40 yaşında başlamak üzere KRK için taranır (46-47).

Obezite: Obezite KRK için bağımsız ve direk ilişkili bir risk faktörüdür. Bir meta-analizde ergenlik ve orta yaş arasında kilo alımının KRK riskinde ılımlı fakat anlamlı bir artış sağladığı belirtilmiştir. Orta yaş ve yaşlılar arasında kilo alımında bu risk daha düşüktür. Obezite aynı zamanda KRK'dan ölüm olasılığını da arttırmaktadır (48).

Diabetes Mellitus ve İnsülin Direnci: Diabetes mellitusun KRK'nin artmış riski ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (49). Diabetik hastalarda kolon kanser riski yaklaşık %38, rektal kanser %20 daha yüksektir (50). KRK için diabet bağlantısını açıklayan bir olasılık da hiperinsülinemidir. Çünkü insülin kolonik mukoza hücreleri için önemli bir büyüme faktörüdür ve kolonik tümör hücrelerini sitümüle eder (51). Diabet aynı zamanda KRK'lı hastalar arasında prognozu da etkileyebilir ve kanser spesifik mortalitesi non-diabetiklere göre %12 daha yüksektir (49, 52).

Kırmızı ve İşlenmiş Et: KRK insidansı gelişmiş ülkelerde, özellikle batı tipi diyetle adapte olmuş popülasyonlar arasında hızla artmaktadır. Uzun dönem kırmızı veya işlenmiş et tüketiminin KRK riskinde artış ile ilişkili olduğu görülmektedir. Etin içeriği ve yüksek ısılarda pişirme sonucu oluşan bileşikler (poliaromatk hidrokarbonlar, heterosiklik aminler) kolon mukozasında genotoksik ve metabolik bozukluklar yaparak etki edebilir (53). Yağsız kırmızı etin daha az risk ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (54).

Sigara: Sigara içmek, KRK'nın artmış insidans ve mortalitesi kadar kolorektal adenomların oluşması için de risk faktörüdür ve prognozu da etkilemektedir. Paket-yıl veya günde içilen sigara sayısının artmasıyla anlamlı bir doz ilişkisi bulunmuştur (55). Hem insidans hem mortalite ilişkisi rektum kanserinde kolon kanserinden daha güçlüdür (56).

Alkol: Alkol tüketimi ve KRK'nın artmış riski arasında ilişki gözlenmiştir. Hiç içmeyenlerle karşılaştırıldığında ağır içiciler (≥ 50.0 gr/gün) ve ılımlı içicilerde (25.0-37.5 gr/gün) KRK riskinde önemli bir artış olduğu sonucuna varılmıştır. Yüksek alkol alımının (≥ 45 gr/gün) kolon kanserini %45, rektum kanserini %49 arttırdığı gösterilmiştir. Fakat hafif içicilerde (12.5 gr/gün ve altı) ilişki gösterilememiştir (57). Başka bir çalışmada hafif içicilerde bile (10 gr/gün) %7'lik bir artış olduğu bulunmuştur. Artmış bu riskin folat emiliminin engellenmesi ve azalmış folat alımı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (58).

Androjen Blokaaj Tedavisinin Kullanımı: Androjenin kolorektal karsinogenezisi için koruyucu etkisi olmasından dolayı, androjen blokaajı ile KRK ilişkisi olduğu düşünülmüştür. Prostat kanseri için androjen blokaaj tedavisi uygulanmış (GnRH agonisti almış veya orşiektomi yapılmış) hastalarda KRK riskinin uzamış tedavi süresi ile arttığı bulunmuştur (59).

Kolesistektomi: Kolesistektomi ve sağ taraf kolon kanserleri arasındaki ilişki bazı raporlarda tarif edilmiştir (60). Bu artışın nedeninin kolesistektomiden sonra kolonda safra asit bileşimindeki değişimlerle ilişkili olduğu düşünülmüştür (61).

Diğer Risk Faktörleri: Koroner kalp hastalığı (62), yaygın mesane cerrahisinden sonra üretero-kolik anastomoz olanlarda üreterik stomanın yakınlığında (63), BRCA1 mutasyon taşıyanlarda (64), 50 yaş ve altındaki genç endometriyal kanserli kadınlarda (65), bakteriyel ve viral ajanlar (streptococcus bovis, helicobacterpylori, JC virüs, human papilloma virüs, fuso bacterium, E.colinin patolojik tipleri ile barsağın kolonize olması barsağın bakteriyel flora çeşitliğinin azalması) KRK için risk faktörü olarak ileri sürülmektedir (66).

2.1.3. Lokal İleri Evre Rektal Kanser

Rektum tutulumu kolorektal kanserlerin üçte birini oluşturur ve lokal ileri evre rektal kanser (LİRK) kötü prognozu ile bilinir (67,68). LİRK, evre 2 (cT3-4 ve/veya N0) ve evre 3 (cT1-4, N1-3) rektal kanser olarak tanımlanır (69).

Rektal kanserin tedavisinde multidisipliner bir yaklaşım ile cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi uygulanır. LİRK için hangi terapötik modalitenin yaşam kalitesi ve hastalık sonucu

üzerinde en tatmin edici etkiye sahip olduğu hala tartışmalıdır. LİRK tedavisi, yeni tanı araçları, radyoterapi teknikleri ve kemoterapötik ajanların geliştirilmesi nedeniyle sürekli ilerlemeye tabidir. LİRK' in standart tedavisinde, rezektabiliteyi ve anal sfinkteri korumayı sağladığı, tümör volümünü küçülttüğü, lokal kontrolü geliştirdiği, lokal rekürrensi azalttığı, evrede gerileme ve hayatta kalma oranını arttırdığı için neoadjuvan kemoradyoterapi (NKRT) ve ardından total mezorektal eksizyonu önerilir (67, 68). NKRT ile cerrahi arasında uygun zaman aralığı, tümör yerleşimi ve NKRT etkinliği/güvenliği arasındaki ilişki, “bekle ve gör” politikası ve NKRT sonrası tedavi yanıtını öngörebilecek biyobelirteçlerin varlığı LİRK tedavisindeki başarı ve etkinliği için tartışılan ve araştırmaya açık olan konulardandır.

Rektal kanserde çeşitli NKRT yanıt oranları bildirilmiştir. Cerrahi sonrası hastaların %40'ında patolojik parsiyel yanıt bulunurken, hastaların %8-20'sinde tam yanıt ve %20'si NKRT'ye direnç gözlenmektedir (68). Bu değişken yanıt, ameliyat prognozu, hastaliksız sağkalım ve uzak metastaz ile de ilişkilidir. NKRT uygulanan hastaların önemli bir kısmında patolojik tam yanıt gözlenmesi, cerrahinin olumsuz etkileri (bağırsak, idrar ve cinsel işlev bozuklukları), “bekle ve gör” politikası veya transanal lokal eksizyon gibi alternatif tedavi yaklaşımları göz önüne alındığında, tedaviye yanıtı öngörebilecek belirteçlere ihtiyaç vardır. Paradoksal olarak, NKRT yanıtı minimal veya ihmal edilebilir düzeyde olan hastalar için tümör eksizyonundaki gecikme uzak metastaz olasılığını artırabilir. Bu nedenle, tedavi öncesi aşamada yanıtı tahmin etmek için güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi LİRK tedavi algoritmalarının kişiselleştirilmesinde kritik olabilir (67,68).

İlaçlara karşı direnç antikanser formüllerini belirlemede önemli bir sorundur çünkü tedaviye cevap verme yeteneğini değerlendirmek son derece zordur. NKRT'ye yanıtı erken öngören biyobelirteçler, NKRT'den yarar görecektir rektal kanser hastalarının seçilmesine, NKRT ile ilişkili toksisiteyi azaltmaya ve yeterli tedavi seçeneği sunmaya izin verebilir.

Preoperatif tedaviye histolojik yanıt, tümör regresyon derecesi ile değerlendirilir ve önemli bir prediktif faktördür (67). Konvansiyonel klinikopatolojik belirteçler ile moleküler belirteçleri birleştirmek prediktif faktör olarak hastalık yönetimi için yol gösterici olabilir. Böylece bir hastanın kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç durumu hakkında bilinçli kararlar verilmesine, tümör yanıtını tahmin etmek için hassas tıbbın uygulanmasına, klinisyenlerin NKRT portokolünü hastalık biyolojisine göre ayarlamasına izin verecektir (67).

Serum karsinoembriyonik antijen (CEA), özellikle kemoradyoterapide en yaygın kullanılan tümör belirteçidir (70). LİRK'de, CEA seviyeleri preoperatif KRT'ye yanıt için bir

prediktif faktör olarak ve küratif cerrahi sonrası bağımsız bir prognostik faktör olarak potansiyel klinik değere sahiptir (67). CEA gibi geleneksel prediktif faktöre ek olarak, rektal kanserde radyosensitiviteyi ve kemosensitiviteyi tahmin etmek için çeşitli moleküler belirteçler önerilmiştir. Potansiyel aday biyobelirteçler beş alt gruba ayrılabilir.

İlk alt grup KRT'ye direnci tahmin edicileri içerir: CD133 ve siklooksijenaz-2 (COX-2). Hem CD133 hem de COX-2 aşırı ifadelenmesine sahip olmayan LİRK'in NKRT'ye karşı oldukça yüksek bir histopatolojik yanıt oranına sahip olduğu bildirilmiştir (71).

İkinci alt grup, hücre döngüsü ilerlemesi ile ilgili biyobelirteçleri içerir: p27kip1 ve p53 protein ifadelenmesi. p27kip1 ve p53 aşırı ifadelenmesinin rektal kanserde preoperatif neoadjuvan tedaviye olumlu yanıtla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (72)

Üçüncü alt grup, rektal kanserin potansiyel onkogenlerini içerir: Beta-katenin ve Her-2/neu. LİRK hastalarında düşük preterapötik membranöz beta-katenin protein ifadelenmesinin daha iyi histolojik yanıtla ilişkili olduğu ve daha yüksek sitoplazmatik Her-2/neu protein ifadelenmesi olan LİRK hastalarının anlamlı bir sağkalıma sahip olduğu bulunmuştur (73).

Dördüncü alt grup, serum moleküler aday belirteçleri içerir: dolaşan serbest DNA ve dolaşan tümör hücreleri. Serbest DNA'nın uzun fragmanlarının (Alu 247) plazma seviyelerinin ve serbest DNA bütünlük indeksinin, NKRT'ye tümör cevabının umut verici işaretleri olduğu ortaya konulmuştur (74).

Beşinci alt grup, 5-FU ve platin dirençle ilişkili biyobelirteçleri içerir: timidilat sentaz, timidin fosforilaz ve dihidropirimidin dehidrojenaz. Rektal kanser tedavisinde radyoterapinin (RT) etkinliğini arttıran antimetabolit 5-FU, KRK için standart birinci basamak kemoterapötik ajandır (75). Timidilat sentaz, timidin fosforilaz ve dihidropirimidin dehidrojenaz, 5-FU metabolizmasında rol oynar ve 5-FU bazlı tedaviye tümör yanıtının potansiyel biyobelirteçleridir. Tedavi öncesi biyopside düşük *timidilat sentaz* gen ifadelenmesinin, 5-FU bazlı NKRT'ye karşı tümör yanıtını öngördüğü gösterilmiştir. Ayrıca NKRT sonrası cerrahi rektal dokularda intratümöral *timidilat sentaz* ve *timidin fosforilaz* ifadelenmesi, histopatolojik tümör regresyonu ile anlamlı korelasyon göstermiştir (76).

Altıncı alt grupta nükleotid eksizyon onarımının platine karşı direnç ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bildirilmiştir. Platin direncinin, artmış DNA hasar onarımı ve eksizyon onarım çapraz tamamlayıcı grup 1 (ERCC1), X-ışını çapraz tamamlayıcı grup 1 (XRCC1) ve eksizyon onarım çapraz tamamlayıcı grup 2 (ERCC2)' yi içeren nükleotit eksizyon onarımındaki tolerans

nedeni ile geliştiği düşünülmektedir (77-79). *ERCC1* aşırı ifadelenmesi, LİRK hastalarında FOLFOX tabanlı NKRT'ye zayıf yanıt ile ilişkilidir (80).

Bu mekanizmaların dışında olumsuz tümör mikro-çevre koşulları (asidoz, hipoksi) nedeniyle hücresel hasar yollarındaki bireysel varyasyon, NKRT'ye farklı yanıtlara neden olabilir. Bu yollardaki aday belirteçler Tablo 1’de belirtilmiştir (81).

Tablo 1. Hücresel döngü, proliferasyon, ölüm, strese yanıt, iletişim ve metabolizma ile ilgili yolaklardaki aday biyobelirteçler (81)

Biyolojik fonksiyon		Biyobelirteçler
Hücre döngüsü ve hücre proliferasyonu	Hücre döngüsü durması	BIRC5, p21, p53
	Hücre döngüsü kontrol noktası	p21, p53
	Hücre döngüsü inhibisyonu	BIRC5, p27
	Hücre döngüsü regülasyonu	BIRC5, p21, p27, p53, fosfo-Akt
	Hücre proliferasyon	Ki67, REG4, Sekurin, YKL-40
	Mitoz	β -tübülin
Hücre ölümü	Programlanmış hücre ölümü	Apoptotik indeks, Bax, BIRC5, Kaspaz-8, hPEBP4, M30, MIB1, p53, PDCD4, fosfo-Akt, XIAP, YKL-40
	Apoptozis	Apoptotik indeks, Bax, BIRC5, Kaspaz-8, hPEBP4, M30, MIB1, p53, PDCD4, fosfo-Akt, XIAP, YKL-40, CD34, Kalsenilin, Smac
	Pro-apoptozis	Bax
	Apoptozis inhibisyonu	BIRC5, hPEBP4, fosfo-Akt, XIAP, YKL-40, HIF-1, HIF-1

Uyaranlara, strese ve DNA hasarına yanıt	Endojen uyarana yanıt	CA9, c-met, CXCL10, MSH2, fosfo-Akt, Timidin fosforilaz, VEGF, YKL-40
	Strese yanıt	ANXA1, BIRC5, DIABLO, DNAJC12, HIF-1, HIF-1 α , hOGG1-1245C>G, MTHFR 677T-1298A, MTFHR-677C>T, Hsp42, Hsp90, m-TIMP3, NEIL2, NFkB, p21, p53, sHsp16.2, Smac, XRCC2, Tropomodulin
	Hipoksiye yanıt	HIF-1, HIF-1 α , CA9, c-met, CXCL10, fosfo-Akt, Timidin fosforilaz, VEGF, YKL-40
	DNA hasarına yanıt	MSH2, MTHFR 677T-1298A, BIRC5, hOGG1-1245C>G, MTFHR-677C>T, NEIL2, NFkB, p53, XRCC2
	DNA onarımı	MSH2, BIRC5, hOGG1-1245C>G, MTFHR-677C>T, NEIL2, p53, XRCC2
	Tümör anjiogenezis	VEGF, fosfo-Akt, Timidin fosforilaz, YKL-40
Hücre iletişimi	Sinyal iletimi	ABCC4, Bcl-2, β -katenin, CD44, CD133, CD166, c-met, CXCR4, EGFR, EpCAM, GHRH-R, HER-2, IQGAP1, MRP3, TGF- β 1, THBS2
	Hücre yüzeyi reseptör sinyali	ABCC4, Bcl-2, β -katenin, CD44, CD133, CD166, c-met, CXCR4, EGFR, EpCAM, GHRH-R, HER-2, IQGAP1, MRP3, TGF- β 1, THBS
	Hücre içi sinyalizasyon	IQGAP1
	Hücre adezyonu	THBS2
Hücrel metabolizma	Hücrel metabolizmanın düzenlenmesi	COX-2, ALDH1, HMGCS2, HSD17B2, MMP9, fosfo-Akt, GLUT-1, CPS1, Asparjin sentetaz
	Nükleik asit metabolizması	p-SMAD3, SMAD3, TCF4, Timidin fosforilaz, Timidilat sentaz

	DNA sentezi	Timidilat sentaz
	DNA metabolizması	Timidin fosforilaz
	Transkripsiyon	p-SMAD3, SMAD3, TCF4
	Transkripsiyon regülasyonu	p-SMAD3, SMAD3, TCF4

2.1.4. “Bekle ve Gör” Yaklaşımı

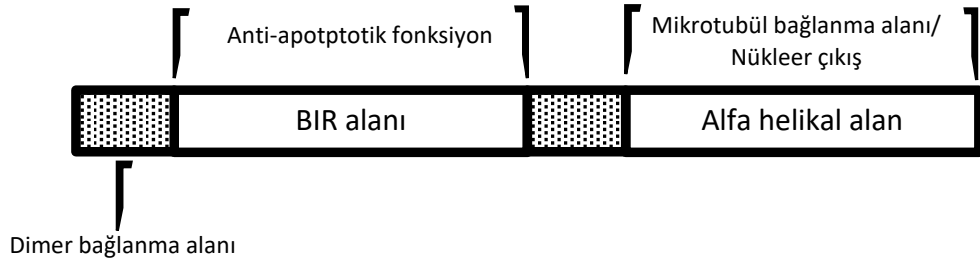
NKRT'ye klinik tam yanıt gösteren hastalar için “bekle ve gör” yaklaşımı, rektal kanser için konvansiyonel cerrahinin morbiditesini önleyebilir. NKRT sonrası tam yanıtın öngörülmesi, seçilmiş rektal kanser hastalarında cerrahi harici bir tedavi yaklaşımına yöneltebilir.

Elde edilen metaanaliz sonuçlarına göre klinik tam yanıt sergileyen “bekle ve gör” yaklaşımı ile tedavi edilen hastalar ile ameliyat sonucu patolojik tam yanıt sergileyen hastalar arasında nüks ve kansere özgü mortalite açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir; ayrıca, “bekle ve gör” yaklaşımı ile tedavi edilen hastalar ile ameliyat sonrası klinik tam yanıt sergileyen hastalar arasında nüks, kansere özgü mortalite, hastalıksız sağ kalım ve toplam sağ kalım açısından da anlamlı bir fark gözlenmediği bildirilmiştir (67).

2.3. Kanserde Apoptozis, Otofaji ve Hipoksi İlişkili Moleküller

2.3.1. Survivin

Survivin geni, kromozom 17'nin telomerik ucunda yer yayılır ve 16.5 kDa ağırlığında 142 amino asit uzunluğundaki survivin proteinini kodlar (82,83). Apoptoz inhibitör ailesinin (AIA) en küçük üyesi olarak, şimdiye kadar karakterize edilen tüm survivin izoformları, karakteristik N-terminal BIR (Baculovirüs AIA Tekrarları) alanı ve çinko iyonu bağlanmasında rol oynayan RING parmağı için alfa-helikal alan içerir (Şekil 1) (84). BIR alanının anti-apoptotik fonksiyon için önemli olduğu düşünülürken, alfa-sarmal alan muhtemelen tubulin yapıları ile etkileşime girer.

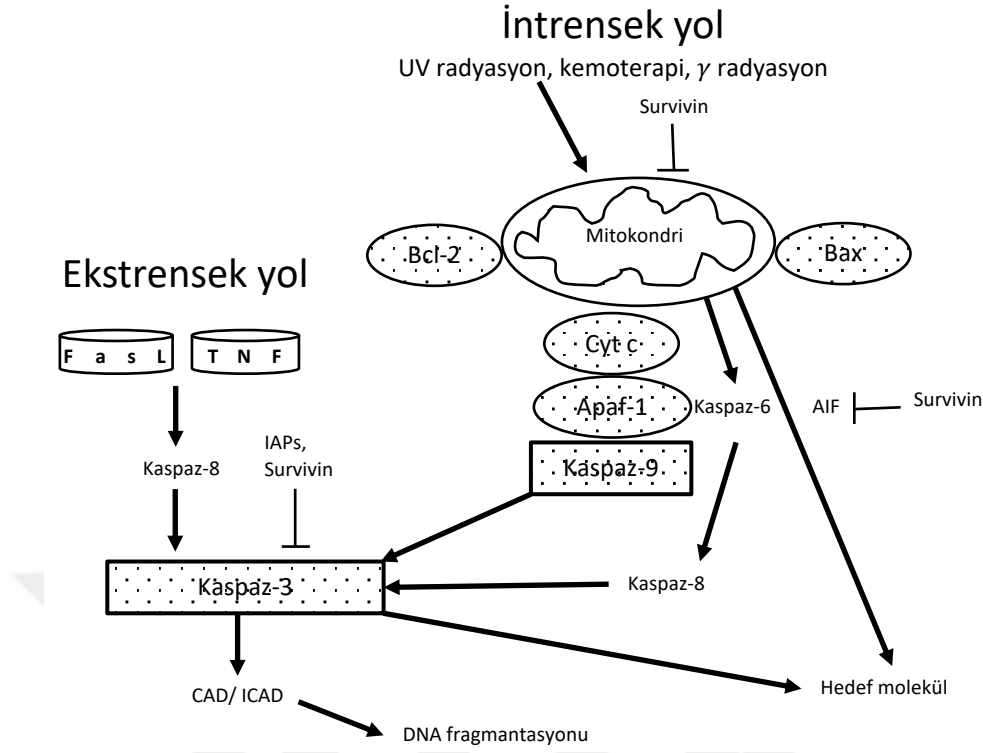


Şekil 1. Survivin proteininin yapısı ve işlevi (84)

Malign hücrelerde, tüm izoformları normal dokularla karşılaştırıldığında çok yüksek bir oranda ifadenir. Survivin hem hücre ölümünün düzenlenmesinde hem de mitotik ilerlemede rol oynayan ikili bir işleve sahiptir (84).

Hücre ölüm yolu aktivasyonu, hücre yüzeyi üzerindeki ölüm reseptörüne ligand (FasL, TNF) bağlanması (ekstresek yol) veya doğrudan mitokondriyal sinyalizasyon (intrensek yol) yoluyla başlatılabilir (Şekil 2) (84). Mitokondriyal yol, sitokrom c ve apoptozu indükleyen faktör (AIF) gibi apoptotik faktörlerin mitokondriyal intermembran boşluğundan sitoplazmaya salınmasına aracılık eden Bax/Bcl-2 yolunun aktivasyonu ile başlatılır. Sitokrom c' nin mitokondriden salınması ile sitokrom c/ apoptotik peptidaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) /kaspaz-9 apoptozom kompleksi oluşur ve kaspaz-3 aktive edilir. Kaspaz-3, sitoskeletal proteinler ve DNA dahil olmak üzere bir dizi substratı ayırır. Kaspaz ile aktive edilen DNaz (CAD) ve CAD inhibitörü (ICAD), DNA'nın bölünmesini ve parçalanmasını başlatır. Apoptoz inhibitörleri (IAP'ler), kaspazlarla fiziksel olarak etkileşime girerek hücre ölümünü inhibe eder. Survivin'in, kaspaza bağlı ve bağımsız yollar yoluyla apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (84).

Survivin, kaspaz-3, 7 ve 9 ile birlikte ko-immünopresipitandır ve bu kaspazların aşırı ifadenmesiyle indüklenen apoptozu baskıladığı için bir kaspaz inhibitörüdür (85). Ayrıca, apoptozun intrinsek yolundaki ana inhibitör kaspaz-9' a müdahale ederek hücre ölümünü inhibe eder (86).



Şekil 2. Apoptoza giden survivin yolları (84)

Survivin, embriyonik ve fetal dokularda ifadelenir, ancak normal yetişkin dokularında saptanamaz. Mesane, akciğer, meme, mide, özofagus, karaciğer, over ve hematolojik kanserler dahil olmak üzere neredeyse tüm insan malignitelerinde survivinin aşırı ifade olduğu bildirilmiştir (Tablo 2) (84).

Tablo 2. Survivin proteininin farklı kanserlerde ifadelenmesi (84)

Kanser kökeni olan organ	İfadelenmesi (%)
Akciğer kanser	85.5
Özefageal kanser	80.0
Meme kanseri	70.7-90.2
Pankreatik kanser	76.9-88.0
Overian kanser	73.5
Malign melanom	67.0
Kolorektal kanser	63.5
Hepatoselüler kanser	41.0-87.0

Gastrik kanser	34.5-68.0
Mesane kanseri	57.8
Akut myeloid lösemi	54.8
Akut lenfositik lösemi	68.8
Oral kanser	>75.0-72.0

2.3.2. Beclin 1

İnsan otofajiye bağlı *Beclin 1* geni (BECN1), 17q21 kromozomu üzerinde bulunur (87). BECN1, maya otofaji geni *ATG6/VPS30*'un homologudur. BECN1 tarafından kodlanan Beclin 1 proteini, otofaji için esastır (88). 60 kDa ağırlığındaki Beclin 1 proteini, düzensiz bir N-terminal bölgesi ve dört farklı alan içerir: Bcl-2-homoloji 3 (BH3), esnek sarmal alan (FHD), sarmal sargı alanı (CCD), evrimsel korunan alan (ECD) ve β - α tekrarlanan otofajiye spesifik alan (BARA) (89).

Otofaji, sitoplazmik ve organel bileşenlerinin, çift zarlı veziküller tarafından yutulması (otofagozom) ve lizozomlar ile birleşerek (otofagolizozom) hücre içi degradasyon sürecidir. Otofaji, birçok fizyolojik durum (açlık, egzersiz, düşük oksijen, hasarlı organellerin çıkarılması, hücre içi patojenlerin çıkarılması, vb.) ve kanser gibi patolojik koşullarda ortaya çıkan evrimsel korunma yoludur (90).

Memeli Beclin 1, fosfatidilinositol 3-fosfatı (PI3P) oluşturan sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3KC3) komplekslerinin (PI3KC3-C1 ve PI3KC3-C2) bir allosterik modülatörü olarak işlev görür. PI3KC3-C1, otofajik vezikül enükleasyonunda, otofagozom oluşumunun ilk aşamalarında işlev görür ve Beclin 1, Vps34, Vps15, Atg14 ve Ambra'yı içerir. PI3KC3-C2 otofagolizozomal olgunlaşmaya katılır ve Beclin 1, Vps34, Vps15 ve UVRAG (UV Radyasyon Direnci İlişkili Gen Proteini) içerir (Şekil 3A) (89).

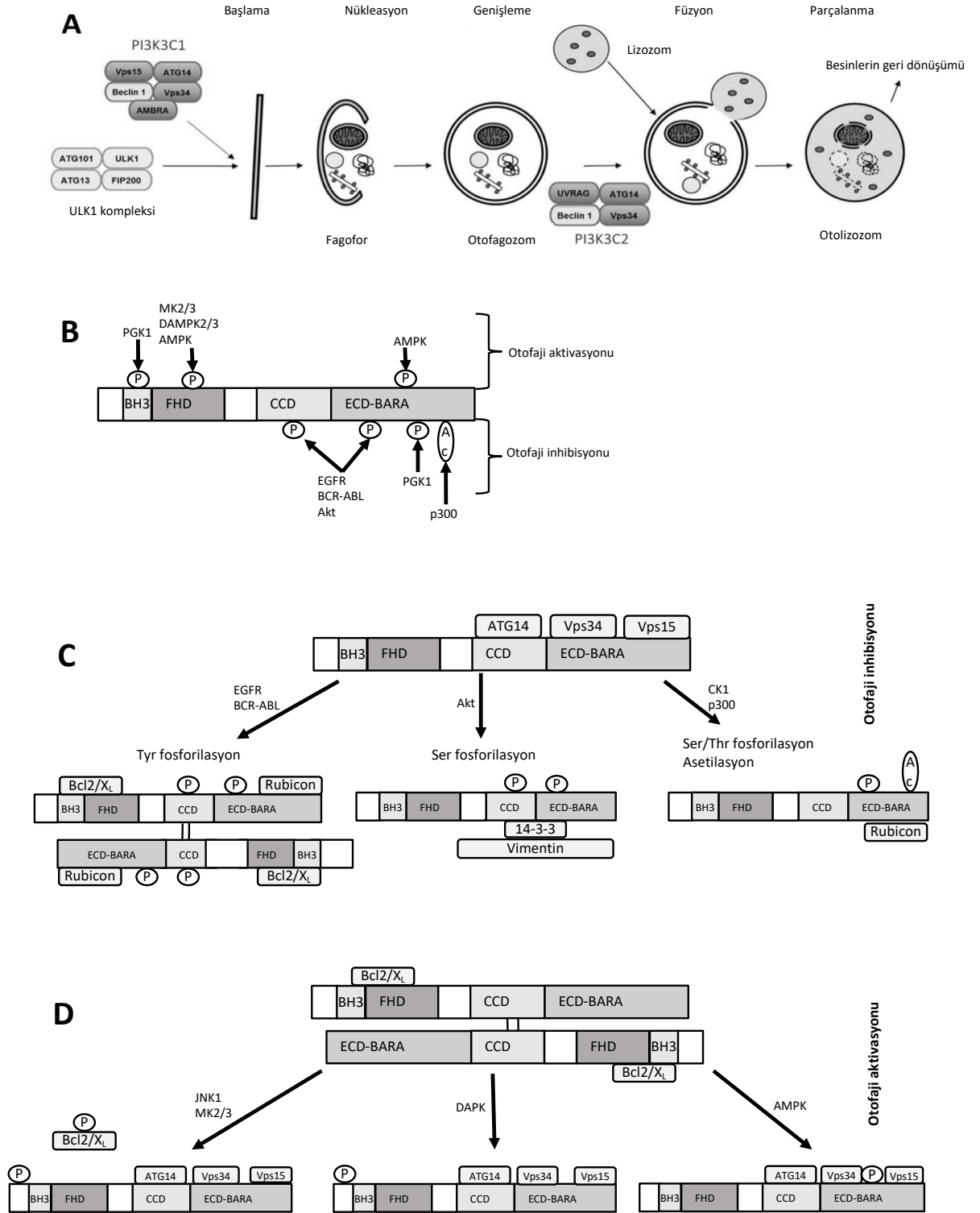
Bcl-2 ve Bcl-xL, Beclin 1 modülasyonu yoluyla otofaji aktivitesinin ana düzenleyicileridir (91). Beclin 1'in BH3 alanına bağlanarak otofajiyi inhibe ettikleri, Beclin 1 homodimerizasyonunu stabilize ettikleri gösterilmiştir. Açlık veya hipoksi gibi stres koşullarında hem Bcl-2/Bcl-xL hem de Beclin 1'in fosforilasyonu otofajinin önemli bir düzenleyicisidir. Besin açlığı altında JNK1 (c-Jun amino terminal kinaz 1) ve strese duyarlı MK2 ve MK3 kinazlar, Bcl-2'yi fosforile eder ve Bcl-2'nin Beclin 1'den ayrılmasını ve otofaji aktivasyonunu destekler. DAPK (ölümle ilişkili protein kinaz) veya ROCK1 (Rho kinaz 1),

Beclin 1' in BH3 alanını fosforile ederek, Bcl-2'den ayrılmasını teşvik eder ve otofajiyi indükler. Açlık koşullarında AMPK (AMP aktive edici protein kinaz), Beclin 1'i BARA alanını fosforile eder (Şekil 3B-3D) (89).

Otofaji inhibitörü olarak görev alan Rubikon (RUN alanı ve sistein açısından zengin, Beclin 1 etkileşen protein), PI3KC3-C2'nin lipit kinaz aktivitesini inhibe etmek için etkileşime girer. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde sıklıkla bulunan aktif EGFR mutantları endosomda Beclin 1'e bağlanır ve fosforile eder. Fosforile Beclin 1, Bcl-2 ve Rubicon bağlanmasını arttırarak Vps34'ün bağlanmasını önler ve dimerize olur, otofaji inaktive edilir. Benzer şekilde BCR-ABL füzyon kinazı (BCR: Kırılma noktası küme bölgesi; ABL: Abelson murin lösemi viral onkogen homolog 1) Beclin 1'i fosforile ederek inaktivasyonu ve otofaji inhibisyonuna yol açar.

Akt (Protein kinaz B), bir serin/treonin kinazdır ve aşırı ifadelenmesi sıklıkla kanserde bulunur. Aktif Akt'ın Beclin 1'i fosforile ettiği ve Beclin 1'in 14-3-3 ve vimentine bağlanmasına ve otofaji inaktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir.

Kazein kinaz 1 (CK1) ailesi üyeleri serin / treonin kinazlardır ve Beclin 1'i fosforile eder. Fosforile Beclin 1 daha sonra p300 (E1A bağlayıcı protein, 300 kDa) tarafından asetile edilir (Şekil 3B-3C) (89).



Şekil 3. Otofajide Beclin 1 fonksiyonu ve kanserde post-translasyonel modifikasyonlarının rolü. (A) Beclin 1'in içinde olduğu kompleks ile makrotofaji diagramı. (B) Kanserde Beclin 1 post-translasyonel modifikasyonu ve otofajideki sonuçlarının şematik gösterimi. (C) Otofaji inhibisyonu. (D) Otofaji indüksiyonu (89).

Beclin 1 fonksiyonu, fosforilasyon, ubiquitinasyon veya asetilasyon, dinamik etkileşme, farklı subsellüler lokalizasyondaki gibi post-translasyonel veya transkripsiyonel modifikasyonlar olmak üzere farklı seviyelerde düzenlenebilir (Tablo 3) (89).

Tablo 3. Kanserde Beclin 1'in post-translasyonel modifikasyonları (89).

Modifikasyon	Enzim	Otofajiye etkisi	Tümör Tipi	Hücre Tipi
Fosforilasyon	PGK1	Aktivasyon	Glioblastoma multiforme	U87
Fosforilasyon	MK2/3	Aktivasyon	Meme	MCF-7
Fosforilasyon	DAPK3	Aktivasyon	Meme	MCF-7
Fosforilasyon	AMPK	Aktivasyon		MEFs
Fosforilasyon	AMPK	Aktivasyon		MEFs
Fosforilasyon	DAPK3	Aktivasyon		HEK293
Fosforilasyon	EGFR	İnhibisyon	Küçük hücreli akciğer kanseri	HCC827, H1975
Fosforilasyon	BCR-ABL	İnhibisyon	Lösemi	K562
Fosforilasyon	Akt	İnhibisyon	Fibrosarkoma	Rat2
Fosforilasyon	AMPK	Aktivasyon		HEK293
Fosforilasyon	CK1	İnhibisyon	Meme	MCF-7
Asetilasyon	p300	İnhibisyon	Meme	MCF-7

Farklı kanser tiplerinde hastaların yaklaşık %0.5'inde *BECN1* gen mutasyonu saptanmıştır ve mutasyonların %50'si yanlış anlamlı mutasyon veya yerdeğiştirme şeklindedir. En fazla mutasyona uğrayan tümörler ise ince barsak kanseri (%1.82), over kanseri (%1.03) ve cilt kanseridir (%0.86) ve kolorektal kanserlerde de mutasyonlar bildirilmiştir (92,93).

BECN1 haplo-yetersiz bir tümör baskılayıcıdır, çünkü işlevini sürdürmek için sadece bir kopya yeterlidir. Bununla birlikte *BECN1* bir alel kaybı ile tümör oluşumunu indükleyebilir. Beclin 1 +/- farelerde meme karsinomu da dahil olmak üzere spontan tümörlerin insidansında

artış göstermiştir. Örneğin *BECNI*' in monoallelık delesyonları meme kanserlerinin %50' sinde, over kanserlerinin %75' inde ve prostat kanserlerinin %40' ında bulunur (89).

Over, kolon, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, kolanjiyokarsinom, mide kanseri ve renal hücreli karsinomu gibi diğer kanser varlıklarının yanısıra meme kanserlerinde normal dokuya kıyasla azalmış Beclin 1 ifadelenen hastalarda daha kötü prognoza sahip olduğu bildirilmiştir (89).

Otofaji, kanser başlangıç aşamalarında farklı stres faktörlerine karşı koruyucu bir rol oynar gibi görünmesine rağmen, primer tümörün büyümesi sırasında aynı nedenden ötürü protümoral aktiviteye sahip olabilir, ayrıca büyüme ve çoğalma oranını korumak için hücrelere yakıt sağlar. Bu bağlamda, Beclin 1'in otofaji regülasyonunun çeşitli kanser türlerinde tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar, Beclin 1 hedefli kanser tedavileri için önemli keşiflere yol açabilir (89).

2.3.3. Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α)

HIF, hücresel oksijen seviyelerindeki değişikliklere yanıt olarak aktive edilen transkripsiyonel bir komplekstir ve birçok genin ifadelenmesine aracılık eder (94,95). HIF hedef genleri; oksijen taşınması, demir metabolizması, glikoliz, glikoz taşınması, hücre sağkalımı ve proliferasyonu, anjiyogenez, invazyon ve metastaz dahil olmak üzere tümör biyolojisinin çeşitli yönlerinin düzenlenmesinde yer alan birçok proteini kodlar (96).

Birçok kanser için HIF aktivitesi düzensizlik gösterir ve en yaygın olarak HIF- α ' nın aşırı ifadelenmesi genellikle artmış vasküler yoğunluk, tümör derecesinin şiddeti, tedavi başarısızlığı ve kötü prognostik sonuç ile ilişkilidir (97,98). HIF aktivitesini bloke etmenin veya tümörlerde HIF-1 α ifadelenmesini hedeflemenin ksenograft modellerde tümör büyümesini önemli ölçüde yavaşlattığı ve hipoksik hücreleri geleneksel tedavilerle öldürmeye daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (99-103).

HIF ailesinin prototipi HIF-1'dir. HIF-1, iki alt birimden oluşan heterodimer proteindir: düzenleyici HIF-1 α ve aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator (ARNT) olarak bilinen HIF-1 β .

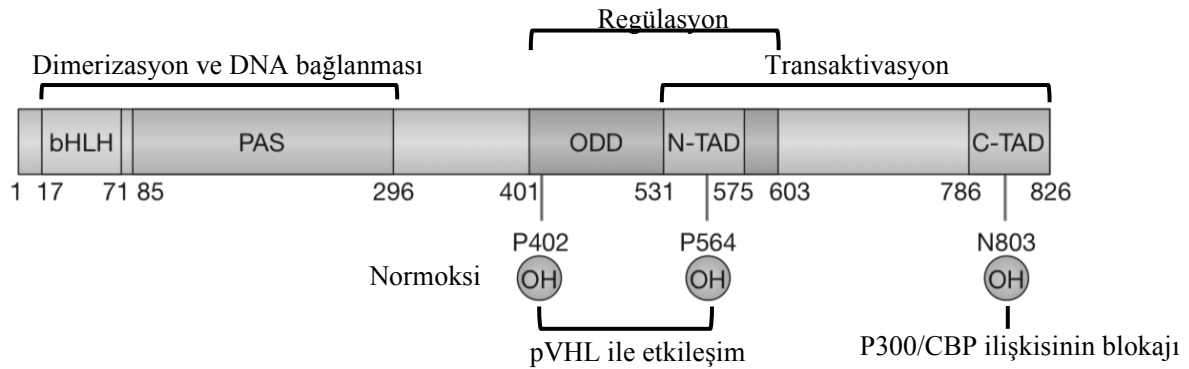
HIF-1 α proteini, 14q23 kromozomunda bulunan gen tarafından ifadelendir ve 120 kDa ağırlığında 826 aminoasitten oluşur. Dört fonksiyonel alanı bulunmaktadır;

a) bazik sarmal-döngü-sarmal (bHLH) alanı,

- b) period sirkadiyen protein (PER) - Ah reseptör nükleer translokator proteinini (ARNT) - “single-minded” protein (SIM) (PAS) alanı,
- c) oksijene bağlı degradasyon (ODD) alanı ve
- d) transaktivasyon alanı (TAD), NH2 terminali TAD ve COOH terminali TAD (N-TAD ve C-TAD) (Şekil 4).

bHLH ve PAS alanları, dimerizasyon ve DNA bağlanmasına katılır; ODD, proteozom yoluyla degradasyon için gereklidir; N-TAD ve C-TAD, transkripsiyonel aktiviteden sorumludur. N-TAD ve ODD hidroksilasyonu, von Hippel-Lindau tümör baskılayıcı proteinini (pVHL) ile etkileşimine aracılık eder. C-TAD hidroksilasyonu, transkripsiyonel koaktivatör p300/CBP (p300/CREB-bağlayıcı protein) ile ilişkisini bloke eder (Şekil 4).

HIF-1 β de, bHLH, PAS ve transaktivasyon alanlarını içerir. HIF-1 β hücrelerde yapısal olarak ifadenirken, HIF-1 α 'nın mevcudiyeti hücresel oksijen seviyelerine bağlıdır. Normoksik durumda, HIF-1 α proteinini hızlı ve sürekli olarak ifadenir ve degrade olur. HIF-1 α protein sentezi, PI3K (fosfoinositid 3-kinaz) ve MAPK (mitojenle aktifleştirilen protein kinaz) yollarının aktivasyonunu içeren oksijenden bağımsız mekanizmalar tarafından da düzenlenir.



Şekil 4. HIF-1 α ve dört fonksiyonel alanının şematik gösterimi (96).

HIF-1 α protein degradasyonu, ODD alanı tarafından kontrol edilir ve ODD bölgesinin silinmesi, hipoksi yokluğunda bile HIF-1 α 'yı stabil hale getirir. HIF-1 α 'nın ODD hidroksilasyonu, HIF-1 α ubikuitinizasyonuna yol açan ve degradasyonuna neden olan pVHL ile etkileşimine aracılık eder. Hipoksik koşullar altında, ODD hidroksilasyonu inhibe edilir ve HIF-1 α 'nın pVHL ile etkileşimi önlenir. Sonuç olarak, HIF-1 α ubikuitinasyonu ve degradasyonu bozulur ve sonuç olarak protein seviyesi artar. Birikmiş HIF-1 α çekirdeğe taşınır ve burada HIF-1 kompleksini oluşturmak için bHLH ve PAS bölgesinden HIF-1 β ile dimerleşir.

HIF-1, p300/CBP (p300/CREB bağlayıcı protein) gibi transkripsiyonel koaktivatörleri etkin hale getirir ve HIF-1'e duyarlı hedef genlerin promotör bölgesindeki hipoksi tepki elemanına (HRE) bağlanır, böylece transkripsiyon aktivasyonlarına aracılık eder. Esasen, HIF-1 hipoksiye transkripsiyon yanıtını aktive etmek için çekirdeğe doğru göç eden bir haberci olarak ifade edilebilir. HIF-1, metastaz, büyüme, tümör oluşumu, anjiyogenez ve invazyon ile ilgili gen regülasyonunda rol oynamaktadır (Şekil 5). Normokside, HIF-1 α 'nın C-TAD bölgesinin hidroksilasyonu, p300/CBP ile ilişkisini bloke eder (96).

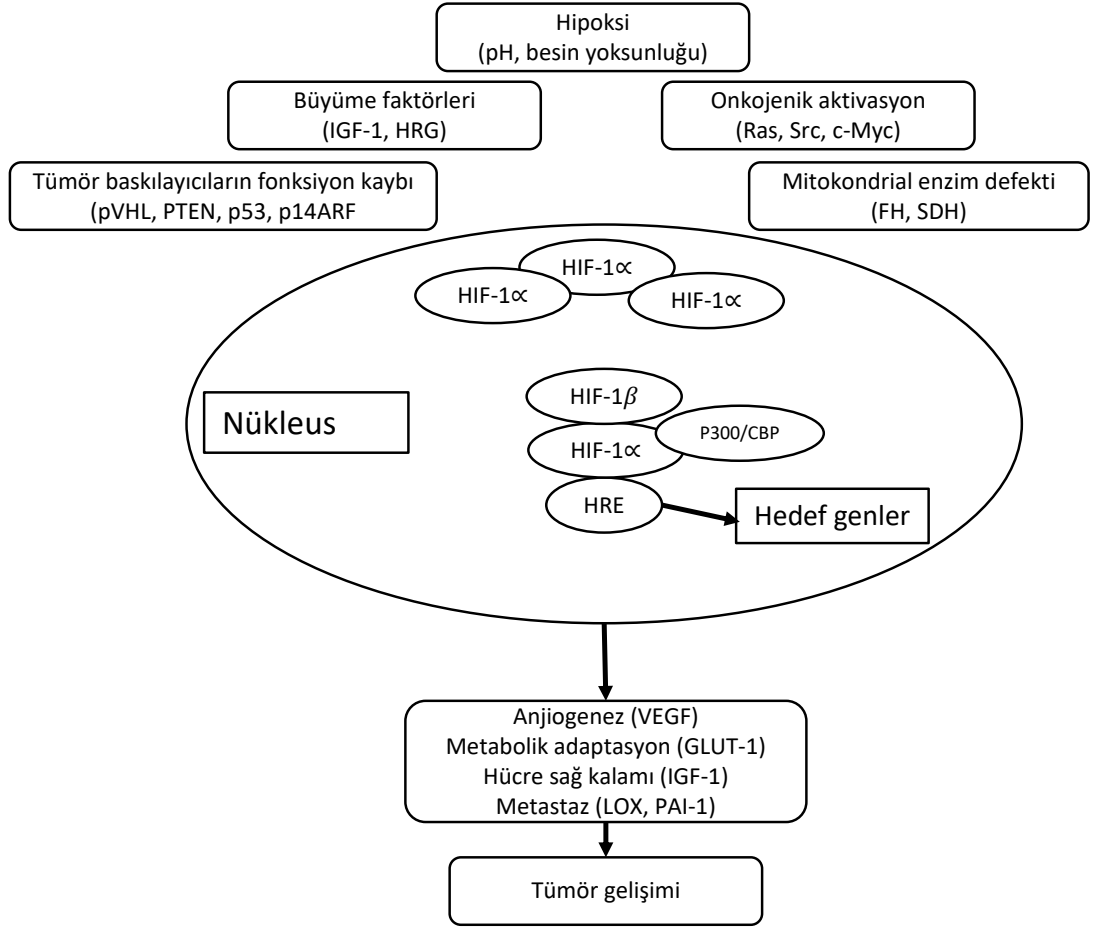
Hipoksiye ek olarak, oksijen algılama mekanizmasında yer alan çeşitli genlerde fonksiyon kaybında *HIF- α* 'nın (*HIF-1 α* ve *HIF-2 α*) aşırı ifadesine ve tümör hücrelerinde HIF yolunun aktivasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Örneğin, VHL'deki fonksiyon kaybı mutasyonlarının, HIF- α ubiquitinasyon ve degradasyon eksikliği nedeniyle, berrak hücreli renal karsinom, hemanjiyoblastom gibi tümörlerde HIF-1 α ve HIF-2 α ifadelenebmesini arttırdığı gösterilmiştir (104). Süksinat dehidrojenaz ve fumarat hidratazdaki mutasyonlar, prolil hidroksilaz aktivitesini inhibe eder, bu da paragangliomalar, feokromositoma, leiomyomlar ve renal hücre kanserleri gibi bazı tümörlerde HIF-1 α 'nın anormal stabilizasyonuna ve vasküler endotelial büyüme faktörü gibi HIF hedef genlerinin yukarı regülasyonuna neden olur (105,106).

Anahtar sinyal iletim yollarının düzensizliği, HIF-1 α 'nın aşırı ifadelenebmesine ve kanserde HIF-1'in aktivasyonuna da katkıda bulunur. Ras-MAPK yolağı, Src veya PI3K-AKT (PKB)-mTOR (memelinin rapamisinin hedefi) yolunun yapısal aktivasyonuna sahip tümör hücreleri, HIF-1 α proteininin ifadelenebmesini arttırmıştır (107-110). PTEN ve p53 gibi tümör baskılayıcı proteinlerin işlev kaybı da HIF-1 aktivitesinin artmasına neden olabilir (111,112).

HIF- α (HIF-1 α ve HIF-2 α) hipoksiye ve büyüme faktörlerine yanıt olarak kanser hücrelerinde indüklendiğinden, özellikle nükleer HIF-1 α 'nın pankreatik, baş ve boyun, orofaringeal, meme, böbrek, yumurtalık, ürotel, mesane, beyin, kolorektal ve prostat gibi birçok tümör tipinde yüksek oranda ifadelendiği gösterilmiştir (96). Bazı çalışmalar HIF-1 α aşırı ifadelenebmesi ile hasta mortalitesi arasında güçlü bir korelasyon olduğunu da ortaya koymuştur. Yüksek HIF-1 α ifadelenebmesi, pankreas karsinomunda, baş ve boyun yassı hücreli karsinom, berrak hücreli renal karsinom ve meme karsinomu düşük sağkalım oranları ile ilişkilendirilmiştir (96). Aksini belirtilen çalışmalarda, oral zeminin erken evre yassı epitel hücreli karsinomunda, HIF-1 α aşırı ifadelenebmesinin daha iyi sağkalım oranları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (113). Bu fark, HIF-1 α 'nın erken karsinogenezde ikili bir rol oynayarak

işlev görebilmesinden kaynaklanabilir. Bir yandan, HIF-1 α , uyarlanabilir bir tepkiye yanıt olarak tümör anjiyogenezini ve hücre sağ kalımını teşvik ederken, diğer yandan hücrel strese yanıt olarak (p53'e apoptotik genlerin indüklenmesi yoluyla) apoptotik mekanizmalarla iş birliği yaparak tümör hücre ölümüne aracılık eder. Gerçekten, HIF'lerin tümör progresyonundaki işlevi, hücre tipine, hücrel bağlama veya karsinogenez aşamasına bağlı olabilir. Kanserdeki HIF yolunu ne zaman hedefleneceğini ve belirli kanser türlerinin bir HIF inhibitörüne az ya da çok duyarlı olup olmadığını belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Kanserde HIF-1 α aşırı ifadenmesi, oksijen seviyelerinde (hipoksi), pH ve besin maddelerinde (yoksunluk) mikro çevresel değişikliklere, büyüme faktörlerinde artışa, tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybına, onkogenik aktivasyona veya düzensiz mitokondriyal fonksiyona yol açan genetik anormalliklerin kombinasyonuna bağlı olabilir (96). Kanser hücrelerinde artan HIF-1 α proteini çekirdeğe taşınır, HIF-1b'ye bağlanır, koaktivatörleri etkin hale getirir (örneğin *P300/CBP*) ve anjiyogenezde (örneğin *VEGF*), metabolik adaptasyonda (örneğin *GLUT-1*), hücre canlılığı (örneğin *IGF-1*) ve metastazda (örneğin *LOX*, *PAI-1*) yer alan çoklu genlerin transkripsiyonunu aktive eder, böylece tümör progresyonunu sağlar (Şekil 5) (96).

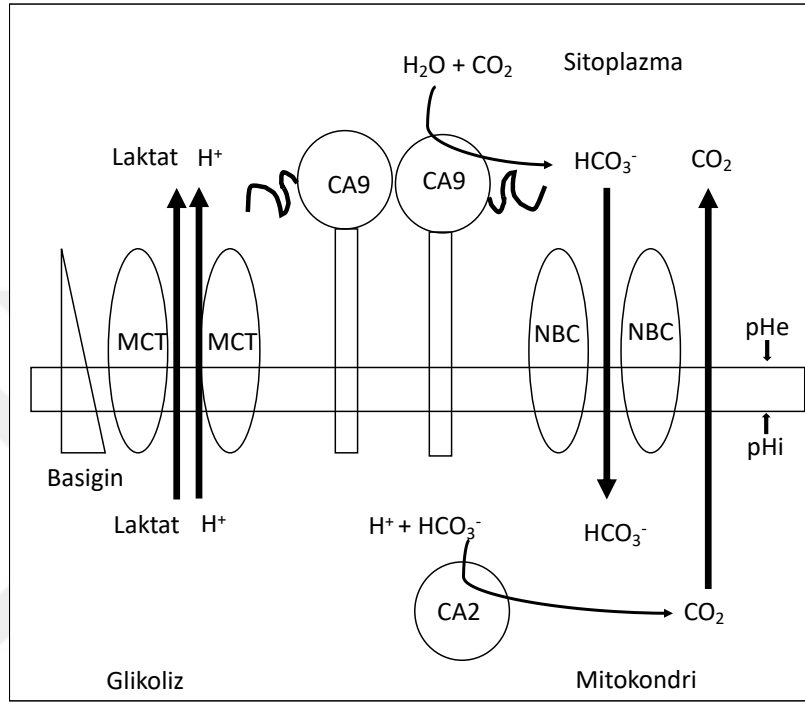


Şekil 5. Kanserde HIF-1α ifadenmesi (96)

2.3.4. Karbonik Anhidraz 9 (CA9)

HIF-1α'nın gen ifadenmesini arttırdığı genlerden biri de *CA9*'dur (16). *CA9* geninin, CA9 proteinini kodladığı ve tümör hücrelerinde hipoksi ile güçlü bir şekilde uyarılabildiği gösterilmiştir (17). CA9, hipoksinin neden olduğu, asidoza adaptasyona katılan ve katalitik aktivitesi ve/veya katalitik olmayan fonksiyonları yoluyla kanser oluşumunda rol oynayan hücre yüzey glikoproteinidir (114). CA9, karbon dioksitin bikarbonat iyonlarına ve protonlara geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize eden α karbonik anhidraz çinko metaloenzim ailesindendir (115). Bu basit reaksiyon, hücre içi ve plazma zarı boyunca asit-baz dengesi için hemen hemen tüm biyolojik süreçlerde gereklidir. 15 insan CA izofomu vardır; izoenzimlerin çoğu, gaz üretimi, kemik rezorpsiyonu ve biyosentetik reaksiyonlar gibi uzmanlaşmış rolleri yerine getirmek için çeşitli doku ve organlarda farklılaşmış hücrelerde ifadenir (116).

Karbonik anhidraz 9, eksofasial CA izoformundan biridir ve 9p12-13 kromozomundaki gen tarafından kodlanır (16). 459 aminoasit uzunluğunda bir transmembran proteini olup N-terminal hücre dışı alanı (414 aa) üç alandan oluşur: a) 37 aa sinyal peptidi b) 59 aa uzun proteoglikan (PG) benzeri alan c) 257 aa katalitik alanı (CA) (117). PG alanının varlığı, CA ailesi arasında CA9' a özgüdür.



Şekil 6. Hipoksik kanser hücrelerinde pH regülasyonunda CA9 rolünün şematik modeli (114).

Karbonik anhidraz 9, hücre içi boşluktan asidi uzaklaştırmak için bikarbonat taşıyıcılar (NBC) ve monokarboksilat taşıyıcılar (MCT) ile iş birliği içindedir (Şekil 6). Bikarbonat taşınmasında CA9, hücre dışı enzimatik bölgesi, hücre dışı karbondioksitin protonlara ve bikarbonat iyonlarına dönüşümünü katalizler. Bikarbonat iyonları NBC tarafından yüklenir ve plazma membranı boyunca sitoplazmaya taşınır. Hücrenin içinde bikarbonat, çeşitli metabolik yollardan kaynaklanan hücre içi protonlarla reaksiyona girer. Muhtemelen sitoplazmik CA2 izoformu tarafından katalizlenen bu reaksiyon sonucunda oluşan karbondioksit, hücreyi difüzyonla terk eder. Hücre içi protonların hücre dışı bikarbonat iyonları ile reaksiyonu sonucu; metabolik süreçler, sinyalizasyon ve proliferasyon için optimum hücre içi pH ayarlanır. Öte

yandan, aynı CA9 ile katalize edilen reaksiyon tarafından üretilen hücre dışı protonlar hücre dışı ortamın asitleşmesine katkıda bulunur (114).

Karbonik anhidraz 9, MCT aracılı proton yönlendiren bir anten gibi görev alan katalitik olmayan yüksek asidik N-terminal PG bölgesi ve MCT-bazigin kompleks iş birliği ile laktatın hücre dışına transferine katkıda bulunur. Bu, kanser hücrelerinin çevredeki normal dokuya invazyonunu destekleyen daha fazla hücre dışı asitleşmeye neden olur (114).

Bir pH regülatörü olmasının yanı sıra CA9, bir adezyon molekülü olarak da davranabilir. PG benzeri alanı, hücre tutulması ve katı desteklere yayılması sırasında fokal yapışma alanlarının oluşmasına ve olgunlaşmasına katkıda bulunur (118). Tersine, CA9, beta katenin'e rekabetçi bağlanma yoluyla E-cadherin'in hücre iskelettinden ayrılmasına neden olabileceği ve hücreler arası teması dengesizleştirebileceği de bildirilmiştir (119).

Karbonik anhidraz 9 ifadenmesinin klinik korelasyonları, tümör tipi ve içeriğe bağlıdır. Yayınlanan çalışmaların çoğu baş ve boyun karsinomu, meme karsinomu, beyin tümörleri, akciğer ve kolorektal karsinom hakkındadır. CA9, çoğunlukla tümör hücrelerinin plazma zarında boyandığı tespit edilmiştir. Sitoplazmik ve/veya nükleer boyama sinyalleri görülmekle birlikte biyolojik anlamları net değildir (114). Beklendiği gibi, HIF stabilitesini negatif olarak kontrol eden VHL tümör baskılayıcı proteinin inaktivasyonu, renal hücre kanserlerinde CA9 gen ifadenmesinin konstitütif yükselmesine neden olur (17). Ayrıca renal hücre kanser dışı tümörlerde CA9 ifadenmesi ile bölgesel kontrol, hastalıksız, hastalığa özgü, metastazsız, progresyonsuz ve genel sağkalım arasında güçlü bir ilişki olduğu saptanmıştır (120). Ek olarak, CA9 pozitifliği ile kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapilere direnç arasındaki korelasyonu gösteren çok sayıda çalışma vardır. Bu bulgular, hastanın prognozunu belirleyen klinik testlerin yararlılığını ve CA9 hedefli tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için bir mantık sağlar.

3. GEREK VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız analitik niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmamız 01.07.2016-01.01.2019 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği ortaklığında yürütülmüş olup Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma Laboratuvarı (ARLAB) ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarları kullanılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği tarafından kolonoskopik incelemede rektum tümörü saptanmış, histopatolojik olarak RK tanısı doğrulanmış ve klinik olarak lokal ileri evre rektal kanseri olduğu belirlenmiş 25 hasta çalışmaya alındı.

Lokal ileri evre rektal kanseri (evre II/III); anal kanala en fazla 10 cm mesafede, mezorektal fasyaya en az 5 mm ilerlemiş T3 veya T4 ve/veya lenf nodu metastazı olan rektal adenokarsinoma ya da lenf nodu metastazı olan T1 veya T2 rektal adenokarsinoma olarak tanımlandı.

İstatistiksel güç analizi için gerekli olan bilgiler tam olarak benzer çalışma bulunmaması nedeniyle kısıtlı literatür bilgisine dayanılarak yapıldı. Değişik parametrelere ait etki katsayılarına dayanılarak yapılan optimal örneklem belirlenmesi sonucunda, n=10 (2003'de rapor edilen etki büyüklüğü esas alınarak) (121) ile n=40 arasında (2015'de rapor edilen etki büyüklüğü esas alınarak) (122) hasta sayısının en az %80 istatistiksel güç sağlayabileceği görüldü. Bazı parametrelerle ilgili analizlerde istatistiksel güç yetersizliği riskinden kaçınmak için projeye 40 hasta dahil edilmesine karar verildi. Bununla birlikte araştırmaya dahil edilme kriterlerine uyan hasta sayısının yetersizliği ve hastaların çalışmaya dahil olma konusunda isteksizliği nedeniyle 25 hasta onamları alınarak çalışmada dahil edildi.

Cerrahi onkoloji konseyi tarafından Ulusal Kapsamlı Kanseri Ağ (NCCN) rehber alınarak neoadjuvan ve cerrahi tedavi protokolü uygulanacak hastaların çalışmaya katılımı sürdürüldü (123). Hastalarda cinsiyet, yaş ve kronik hastalıklar (hipertansiyon, diabetes mellitus, obezite gibi) açısından fark olmamasına dikkat edildi.

Çalışmadan dışlama kriterleri:

Lenf nodu metastazı olmayan T1 veya T2 rektal adenokarsinomu olan ya da Uzak organ metastazına sahip hastalar

3.4. Araştırmanın Materyali

Araştırmada lokal ileri evre rektal kanseri olduğu belirlenmiş hastanın taze doku (biyopsi ve rezeke edilen tümör materyali) ve periferik kan örnekleri kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken: Beclin 1, survivin, HIF-1 α ve CA9

Bağımsız değişken: TNM evrelemesi ve tümör regresyon sınıflaması

3.6. Araştırmada Kullanılan Araç, Gereç ve Sarf Malzemeleri

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Araç ve Gereçleri

Araştırmada kullanılan tüm araç ve gereçler Tablo 4 ve 5’ de verilmektedir.

Tablo 4. Araştırma sırasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB’ da kullanılan araç ve gereçler

Salınımlı santrifüj (Sigma Laboratory Centrifuges, 2K15, Osterode am Harz, Germany)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB
Sabit açılı santrifüj (Rotofix 32, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tutlingen, Germany)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB
Vorteks (Wisd Laboratory Instrument, WiseMix VM-10, South Korea)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB
Saf su sistemi (Elga Ltd., Maxima Water Purification Systems, High Wycombe, Buckinghamshire, UK)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB
Buzdolabı +4° C (BD2204TE, Profilo Dayanıklı Ev Aletleri, İstanbul, Türkiye)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB

Derin Dondurucu -20° C (BD2204TE, Profilo Dayanıklı Ev Aletleri, İstanbul, Türkiye)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB
Derin Dondurucu -80C (Forma -86°C ULT Freezers, 700 series, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Buz makinası (Scotsman AF-100 Ice Flaker, Hubbard Systems, IL, USA)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB
Blok Isıtıcı (Stuart SBE 130, Germany)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB
Plak karıştırıcı (KS130 Basic, IKA ® Werke GmbH & Co., Staufen, Germany)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB
Mikroplate okuyucu (Synergy HT, BioTek Instruments, VT, USA)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB
Mikro hacimli spektrofotometre (NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB
Termal döngü cihazı (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-ARLAB
qPCR cihazı (Rotor Gene Q and Q-Rex Software, Qiagen, Valencia, CA, USA)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Vertikal elektroforez sistemi (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB

Tablo 5. Araştırma sırasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı’ nda kullanılan araç ve gereçler

Mekanik Homojenizatör (TissueLyser LT, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)	Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı
---	--

Derin Dondurucu -80C (DF590, Nüve Sanayi Malzemeleri, Ankara, Turkey)	Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı
Enzim-bağılı immünosorbent analiz (ELISA) plak yıkayıcı (Microplate Washer RT-2600C, Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd., Shenzhen, China)	Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı
ELISA okuyucu (Microplate Reader RT-2100C, Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd., Shenzhen, China)	Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Sarf Malzemeleri

- İzolasyon reaktifi (TriPure Isolation Reagent, Roche Applied Science, Indianapolis, IN)
- Protein tayin kiti (BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific, IL, USA)
- RNA izolasyon kiti (QIAamp RNA Blood Mini Kit, Qiagen GmbH, Courtaboeuf, France)
- *β-Aktin*, *Beclin 1*, *survivin*, *HIF-1α* ve *CA9* genlerine uygun optimize edilmiş primerler
- Komplementer DNA (cDNA) sentez kiti (QuantiTect Reverse Transcription kiti, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- RT² SYBR green qPCR Mastermix (Qiagen GmbH, Courtaboeuf, France)
- ELISA kitleri (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, Yangpu, China)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası (AppliChem Panreac, Darmstadt, Germany)
- Poliklonal rabbit Beclin 1, survivin, HIF-1α ve CA9 primer antikorları (Cell Signaling Technology Inc., MA, USA)
- Anti-rabbit Ig G horseradish peroksidaz (HRP)-bağılı sekonder antikor (Cell Signaling Technology Inc., MA, USA)
- Deteksiyon kiti (Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore, MA, USA)
- X-ray film (Kodak MXB Film, Carestream Health Inc., Essex, UK)

3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi

Araştırmanın Etik Kurul Onayı ilk kez 2015/17-50 karar numarası ile 09.07.2015 tarihinde alınıp 2016/01-24 karar numarası ile 07.01.2016' da değişiklik ve eklemeler yapılmıştır. Etik onay sonrası TÜBİTAK 3001- Başlangıç AR-GE Projeleri Destekleme Programına başvuruldu ve 116S255 proje numarası ile 60.000 TL bütçe ve 2 yıllık süre için proje desteği kabul edildi. Proje başlangıç tarihi 01.07.2016 olup para transferi 21.11.2016 tarihinde gerçekleşti. Para transferi 21.11.2016 tarihinde yapıldığı için sarf malzemelerin temin edilmesinden sonra ilk hastanın kolonoskopik biyopsisi 05.12.2016'de gerçekleştirildi. Bu tarihten itibaren Evre II ve III Rektum CA olan ve neoadjuvan tedavi kararı verilmiş ve sonrasında cerrahi opere olan 25 hastanın analiz süreçleri tamamlandı. Bu hastalara ait radyolojik ve patolojik TNM evrelemesi ve tümör regresyon sınıflaması yapıldı. Proje başlangıç tarihindeki gecikme nedeniyle proje bitiş tarihi 01.01.2019 olacak şekilde 6 ay uzatıldı. Ayrıntılı çalışma planı ve takvimi Tablo 6' te verilmektedir.

Tablo 6. Araştırmanın ayrıntılı planı ve takvimi

07.01.2016	Etik Kurul onayı
12.04.2016	Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grup Yürütme Komitesi tarafından TÜBİTAK 3001- Başlangıç AR-GE projeleri destekleme programı ve 116S255 proje numarası ile maddi olarak desteklenmesi uygun bulunmuştur.
01.07.2016	Proje başlangıcı
21.11.2016	Para transferinin gerçekleşmesi
05.12.2016	İlk hastanın kolonoskopik biyopsi ve kan örneklerinin alınması
2018-2019	Projenin tüm laboratuvar çalışmaları tamamlanmıştır.
2019-2020	Doktora programı kapsamında değerlendirilmesi amacıyla çalışmaya ait bir adet SCI-E dergide yayın, bir adet uluslararası kongrede poster sunumu, bir adet ulusal kongrede poster sunumu ve tez yazım süreci tamamlanmıştır.

3.8. Yöntemler

3.8.1. Hastalara sırasıyla uygulanacak tanı ve tedavi yaklaşımları

- Hastalarda kolonoskopik biyopsi ile histopatolojik olarak rektal kanser tanısı doğrulandı.
- Göğüs ve batin bilgisayarlı tomografi/ manyetik rezonans/pozitron emisyon tomografi-bilgisayarlı tomografi, lenf nodu ve uzak metastazı tespit etmek için kullanıldı.
- Cerrahi rezeksiyon öncesi klinik evreleme: Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC)’ne göre fizik muayene, manyetik rezonans görüntüleme ve biyopsi materyali değerlendirmesi ile Tümör-Lenf Nodu-Metastaz (TNM) evrelemesi şeklinde yapıldı (Tablo 7) (124).
- Neoadjuvan tedavi için hastalara eksternal radyoterapiye (50.4 Gy/28 fraksiyon) eş zamanlı olarak 2 ay boyunca kemoterapi (kapesitabin 1650 mg/m²/gün) protokolü uygulandı.
- Hastaların radyoterapisi bittikten 2 ay sonra cerrahi rezeksiyon gerçekleştirildi.
- Cerrahi rezeksiyondan sonra neoadjuvan tedaviye yanıt, AJCC kılavuzundaki Tümör Regresyon Sınıflamasına göre değerlendirildi (124);
 - 0 (tam yanıt): Canlı kanser hücresi yok,
 - 1 (orta yanıt): Tek tük veya küçük gruplar halinde kanser hücreleri,
 - 2 (minimal yanıt): Fibrosizle birlikte rezidü kanser,
 - 3 (kötü yanıt): Yoğun rezidü kanser şeklinde gruplara ayrıldı.
- Cerrahi rezeksiyondan sonra patolojik evreleme: AJCC’ye göre TNM evrelemesi ile yapıldı (Tablo 7) (124).

Tablo 7. AJCC’ye göre kolorektal kanser hastalarında TNM evrelemesi

Evre	TNM
0	Tis, N0, M0
I	T1/T2, N0, M0
IIA	T3, N0, M0
IIB	T4a, N0, M0
IIC	T4b, N0, M0
IIIA	T1-T2, N1/N1c, M0
	T1, N2a, M0

IIIB	T3-T4a, N1/1c, M0 T2-T3, N2a, M0 T1-T2, N2b, M0
IIIC	T4a, N2a, M0 T3-T4a, N2b, M0 T4b, N1-N2, M0
IVA	T1-4, N1-2, M1a
IVB	T1-4, N1-2, M1b
IVC	T1-4, N1-2, M1c

3.8.2. Doku örneklerinden total RNA ve protein izolasyonu ve ölçümü

Biyopsi ve rezeke edilen tümör materyalinden ayrılan doku parçası, nükleaz, RNase ve DNase içermeyen steril tüplere konulduktan sonra -80°C’de total RNA ve protein izolasyonu yapılana kadar saklandı. Analiz zamanı doku örnekleri mekanik homojenizatörde (TissueLyser LT, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) izolasyon reaktifi (TriPure Isolation Reagent, Roche Applied Science, Indianapolis, IN) kullanılarak homojenize edildi. 50-250 mg büyüklüğündeki doku örneğinden izolasyon reaktifi (TriPure Isolation Reagent, Roche Applied Science, Indianapolis, IN) kullanılarak RNA (<1 mg) ve protein izole edildi.

Dokuların homojenizasyonu sonrası RNA ve protein izolasyon protokolü:

- Dokular tek tek hassas terazide tartıldı.
- Tartılan dokular Eppendorf tüplere konularak 1mL TriPure Isolation reaktifi eklendi ve homojenizatörde 5-10 dk 50 Hertz frekans hızda homojenize edildi.
- Homojenizasyon sonrası herbir 1 mL TriPure Isolation reaktifi için 0.2 mL kloroform konuldu. Tüp elle 30 sn kadar karıştırıldı ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası +4°C’ de 12.000 g’ de 15 dk santrifüj edildi. Kloroform etkisiyle oluşan üst faz RNA olarak, alt faz protein olarak tüplere ayrıldı. Ayrılan protein alt fazı +4°C’ ye konuldu.
- Ayrılan RNA üst faza herbir 1 mL TriPure Isolation reaktifi için 0.5 mL isopropil eklendi. Oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi ve -80°C’ ye bir gece bekletilmesi için kaldırıldı.
- Bir gece bekletilen örnekler +4°C’ de 15.000 g’de 30 dk santrifüj edildi. İsoopropil ile oluşan alt fazda RNA çöktetisi bırakıldı ve üst faz uzaklaştırıldı.

- Herbir 1 mL TriPure Isolation reaktifi için RNA çökelitisi üzerine buzda bekletilmiş %80' lik etanol eklendi.
- Elde edilen RNA karışım +4°C' de en yüksek hızla 5 dk santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı.
- 5-10 dk kalan örneklerdeki etanolün uçması için oda sıcaklığında bekletildi.
- RNA çökeltisine 0.2-0.3 mL RNAase free su eklendi ve pipetaj yapılarak resüspanse edildi.
- İzole edilen RNA çözeltisi porsiyonlara ayrılarak -80°C' ye kaldırıldı.
- Yukarıda belirtilen +4°C' ye ayrılan protein alt faza 0.15 mL %100 etanol eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- +4°C' de 2000 g' de 5 dk santrifüj edildi ve üst faz başka bir Eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Üsta faza 0.75 mL isopropanol - %1 gliserol eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı.
- +4°C' de 13.000 g' de 10 dk santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı, dipteki çökelti bırakıldı.
- Herbir 1 mL TriPure Isolation reaktifi için çökeltiye yıkama solüsyonundan (0.3 M Guanidine HCl, %95 etanol ve %1 gliserol) 2 mL eklendi ve homojenizatörde karıştırıldı. Karışım 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 1 dk vortekslendikten sonra +4°C' de 10.000 g' de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası protein çökeltisi ayrıldı.

Total RNA miktar analizi

Elde edilen Total RNA miktarı 260 ve 280 nm dalga boyunda mikro hacimli spektrofotometre (NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific, ME, USA) ile değerlendirildi. A260/A280 absorbans oranı 1.8-2.0 ise, ideal saflıktaki kaliteli RNA' ya sahip örnek olarak kabul edildi.

Total protein miktar analizi

Elde edilen total protein düzeyleri biçinkonik asid (BCA) yöntemi ile protein tayin kiti kullanılarak (BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific, IL, USA) ölçüldü. Yöntemde protein yapısındaki peptid bağlarının nitrojeni alkali koşullar altında bakır sülfattaki Cu^{+2} iyonunu Cu^{+} iyonuna indirger. Daha sonra iki molekül BCA ile bir molekül Cu^{+} iyonu şelat oluşturarak çözelti mavi-mor renk alır. Mavi rengin 562 nm' de absorbans şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

- Ticari kitin stok sığır serum albümininden (BSA), bidistile su ile dilüe edilerek 0 µg/mL, 25µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL, 1000 µg/mL, 1500 µg/mL, 2000 µg/mL konsantrasyonlarında protein standartları hazırlandı.
- Standartlardan ve örneklerden 25'er µl 96 kuyucuklu plağa konuldu.
- Çalışma çözeltisi; A reaktifi (BCA, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat ve sodyum tartarat) ve B reaktifinin (bakır sülfat) 1:20 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı.
- 200 µl çalışma çözeltisi kuyucuklara eklendi.
- 96 kuyucuklu plak 37° C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Oluşan mavi rengin absorbanşı, spektrofotometre (Synergy HT, BioTek Instruments, VT, USA) ile 562 nm dalga boyunda ölçüldü. Oluşturulan standart eğriye göre örneklerdeki total protein miktarları µg/mL olarak hesaplandı.

3.8.3. Kan örneklerinden total RNA izolasyonu ve ölçümü

Hastalardan neoadjuvan tedavi öncesi ve tümör rezeksiyonundan sonra olmak üzere iki farklı zamanda kan örnekleri alındı. EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden aynı gün RNA izolasyon kiti (QIAamp RNA Blood Mini Kit, Qiagen GmbH, Courtaboeuf, France) kullanılarak Total RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra -20° C'de saklandı. Kan örneklerinin total RNA miktar analizi ve saflık değerlendirmesi için doku örneğinde uygulanan basamaklar tekrar edildi.

3.8.4. Doku ve kan örneğindeki *Beclin 1*, *survivin*, *HIF-1α* ve *CA9* gen ifadenme analizi

Doku ve kan örneğinden total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra elde edilen kalıp RNA dizileri, cDNA sentez kiti (QuantiTect Reverse Transcription kiti, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) kullanılarak termal döngü cihazında (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) cDNA'ya dönüştürüldü ve amplifiye edildi.

Elde edilen cDNA' lardan hedef gen bölgelerine uygun primerler kullanılarak eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyon (Real Time-quantitative PCR -RT-qPCR) yöntemi ile *Beclin 1*, *survivin*, *HIF-1α* ve *CA9* gen ifadenmeleri analiz edildi. Primerler,

“Primer Designing Tool, National Center for Biotechnology Information (NCBI)” a göre Oligomer Biyoteknoloji firması (Ankara, Turkey) tarafından dizayn edildi (125).

Dizayn edilen primer dizileri şu şekildedir:

HIF-1 α - Forward 5'-TTCCAGTTACGTTCTTCGATCA-3'

HIF-1 α - Reverse 5'-TTTGAGGACTTGCGCTTTCA-3'

CA9 - Forward 5'-TCTCGCTTGGAAGAAATCGC-3'

CA9 - Reverse 5'-CTGAAGTCAGAGGGCAGGAG-3'

Beclin 1- Forward 5'-GGCTGAGAGACTGGATCAGG-3'

Beclin 1- Reverse 5'-CTGCGTCTGGGCATAACG-3'

Survivin - Forward 5'-AGAACTGGCCCTTCTTGGAG-3'

Survivin - Reverse 5'-CTTTTATGTTCTCTATGGGGTC-3'

β -Aktin - Forward 5'-CGGGGCCAATCAGCGT-3'

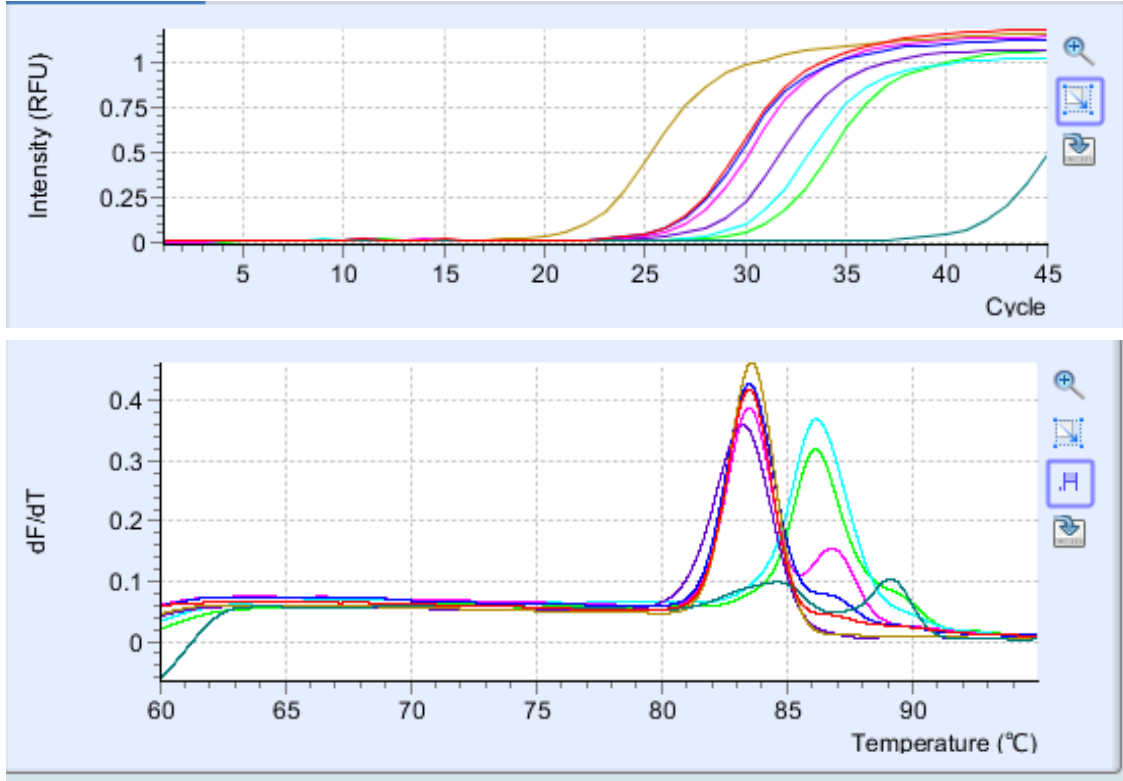
β -Aktin - Reverse 5'-GCCGCTGGGTTTTATAGGG-3'

Eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) için Tablo 8’ deki reaksiyon karışımı hazırlandı ve 10 uL’lik tüplere pipetlendi. *β -Aktin*, housekeeping gen olarak seçildi. RT-qPCR döngüsünde 95 °C’de 15 saniye “denatürasyon”, 53 °C’de 30 saniye “annealing” ve 72 °C’de 30 saniye “ektansiyon” için ayarlandı. Her döngü 40 kez tekrarlandı. Herbir deney üç kez tekrar edildi. mRNA düzeylerindeki değişimler delta delta döngü eşik değeri ($\Delta\Delta CT$) yöntemine göre qPCR cihazında (Rotor Gene Q and Q-Rex Software, Qiagen, Valencia, CA, USA) analiz edildi. Sonuçlar, $\Delta\Delta CT$ değerine göre ifadenme (ekspresyon) katsayısı (EK) olarak verildi (126). RT-qPCR analizine ait temsili görüntüler Şekil 7’de verildi.

Tablo 8. RT-qPCR reaksiyon karışım içerikleri

Karışım içerikleri	Eklenen miktar	Son konsantrasyon
SYBR green qPCR Master Mix	5 μ L	-
Forward Primer (10 μ L)	0,75 μ L	0,75 μ M
Reverse Primer (10 μ L)	0,75 μ L	0,75 μ M

cDNA örneği	2 µL	20 ng
Nükleaz free su	1.5 µL	
Toplam son hacim	10 µL	



Şekil 7. RT-qPCR analizine ait temsili görüntüler

3.8.5. Kan örneklerinde Beclin 1, survivin, HIF-1α ve CA9 protein düzey analizi

Hastalardan neoadjuvan tedavi öncesi ve tümör rezeksiyonundan sonra olmak üzere iki farklı zamanda kan örnekleri alındı. Jelli vakumlu tüplere alınan kan örnekleri, aynı gün 1500 g'de 10 dakika santrifüj edilip, ayrılan serum çalışma yapılana kadar -20°C'de saklandı. Serum örneklerinde Beclin 1, survivin, HIF-1α ve CA9 protein düzeyleri ELISA kitleri (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, Yangpu, China) kullanılarak tespit edildi. Analiz esnasında ELISA plak yıkayıcı (Microplate Washer RT-2600C, Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd., Shenzen, China) ve okuyucu (Microplate Reader RT-2100C, Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd., Shenzen, China) sistemler kullanıldı. Beclin 1 düzeyleri ng/mL, survivin düzeyleri pg/mL, HIF-1α düzeyleri ng/mL ve CA9 düzeyleri ng/mL olarak sonuçlar elde edildi.

3.8.6. Doku örneklerinde Beclin 1, survivin, HIF-1 α ve CA9 protein düzey analizi

Doku örneklerinde Beclin 1, survivin, HIF-1 α ve CA9 protein düzeyleri, Western Blot yöntemi ile analiz edildi. Bunun için sodyum dodesil sülfat (SDS)-poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) kullanıldı. SDS-PAGE olarak adlandırılan elektroforezde; sodyum dodesil sülfat (SDS), ısı ile birlikte bir indirgeyici ve denatüran olarak kullanılmaktadır. SDS, anyonik bir ajan olup, proteinleri denatüre edip primer yapıda kalmalarını sağlayan bir deterjandır. Proteinler sabit ağırlık oranında SDS'ye bağlanırlar, bu sayede tüm proteinler eşit yük yoğunluğuna sahip olmaktadır. SDS ile muamele edilen proteinler negatif yüklerinden dolayı elektriksel alanda pozitif kutba doğru göç ederler.

SDS-PAGE için kullanılan vertikal elektroforez sistemi (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, CA, USA), elektroforez tankı, jel kabı ve güç kaynağından oluşmaktadır.

3.8.6.1. SDS-PAGE jelin hazırlanması

Elektroforez tankına 10 kuyucuklu olacak şekilde %12 konsantrasyonunda ayırıcı jel (Tablo 9) ve %4 konsantrasyonunda paketleyici jel (Tablo 10) hazırlandı.

Tablo 9. SDS–PAGE yönteminde ayırıcı jelin (%12) içeriği

Kimyasal bileşenleri	%12
ddH ₂ O	3.85 ml
3 M Tris-HCl	1.25 ml
%20 SDS	50 μ l
%40 akrilamid-bis akrilamid	4.8 ml
%10 amonyum persülfat (APS)	200 μ l
Tetrametil etilendiamin (TEMED)	20 μ l

Tablo 10. SDS–PAGE yönteminde paketleyici jelin (%4) içeriği

Kimyasal bileşenleri	%4
----------------------	----

ddH ₂ O	7.35 ml
1.5 M Tris-HCl	1.25 ml
%20 SDS	50 µl
%40 akrilamid-bis akrilamid	1.34 ml
%10 amonyum persülfat (APS)	100 µl
Tetrametil etilendiamin (TEMED)	20 µl

1 cm aralık oluşturacak şekilde iki cam vertikal elektroforez sistemine yerleştirildi. Sızıntı olup olmadığı su ile kontrol edildi. Hazırlanan ayırıcı jel çözeltisi pipet yardımıyla iki cam arasındaki boşluğa döküldü. Poliakrilamid jeller monomerik akrilamidin poliakrilamid zincirlere polimerize olması ve N,N'-metilen-bis akrilamid tarafından çapraz bağlanması sonucu oluşmaktadır. Polimerizasyon reaksiyonu amonyum persülfat (APS)'nin eklenmesi ile başlamaktadır. APS, akrilamid ve bisakrilamidin polimerizasyonunu katalize etmek için oksitleyici bir maddedir. TEMED, APS'den serbest radikallerin oluşmasını hızlandırmaktadır. Jelin üst sınırının düzgün olması için üzerine izopropanol eklendi ve jel polimerize olduktan sonra üstteki izopropanol boşaltıldı.

3.8.6.2. Örnek hazırlanması ve jelin yüklenmesi

Paketleyici jel çözeltisi ayırıcı jelin üzerine döküldü. 12 kuyu oluşturmak için tarak iki cam arasına yerleştirildi ve polimerizasyon için bir süre bekledi. Paketleyici jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartıldı.

Jel bulunan cam, elektroforez tankı içine yerleştirildi ve yürütme tamponu (Tris 15.1 g, Glisin 72 g, SDS 5 g, 1000 ml dH₂O) ile dolduruldu. Protein örnekleri kuyucuk başına 30 µg olacak biçimde yüklendi. Ayrıca bir kuyuya da proteinlerin büyüklüklerini tahmin etmek amacıyla içinde bilinen büyüklüklerde çeşitli proteinler bulunan önceden boyalı büyüklük belirteci (prestained size marker) yüklendi.

3.8.6.3. Elektroforetik yürütme

Örnek yüklendikten hemen sonra tank sisteminin üzeri kapatıldı ve güç sistemine bağlandı. Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar 70 Volt gerilim uygulandı. Örnekler ayırıcı jele

geçtikten sonra gerilim 100 Volt'a çıkarıldı. Standart takip edilerek istenilen yol geçildikten sonra akım kesildi ve tank sistemi güç kaynağından alındı.

3.8.6.4. Proteinlerin membrana transferi

Proteinlerin membrana transferi için ıslak transfer yöntemi uygulandı. Transfer tamponu (Transfer tamponu: Glisin 144 g, Tris 30.30 g, 1000 ml dH₂O) içinde transfer kasetine sırası ile; sünger, 2 adet whatmann kağıdı, jel, membran, 2 adet whatmann kağıdı ve tekrar sünger konuldu ve kasetin kapağı kilitlendi. Transfer tankının kaset bölümünün siyah yüzeyine kasetin siyah tarafının gelmesine dikkat edilerek transfer kasetleri tanka yerleştirildi. Tankta buz kabı yerleştirildi, transfer tamponu ile tank dolduruldu ve tank kapağı elektrotlara dikkat edilerek kapatıldı. 300 mA'de +4 °C'de 1 saat transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer kasetinin siyah tarafı (–) yüklü anot görevi yaparken, diğer taraf (+) yüklü katot görevi yaptı; böylelikle negatif yüklü proteinlerin jelden membrana göçü sağlanmış oldu.

3.8.6.5. Jelde proteinlerin Coomassie Brilliant Blue Boyası ile görüntülenmesi

Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası (AppliChem Panreac, Darmstadt, Germany), proteinlerin jelde görüntülenmesi için kullanıldı. Kullanılan boya nonspesifik olarak çoğu proteine bağlanır, proteinlerin eşit miktarda yüklenip yüklenmediği ve blotlama işlemi kontrol edilir. Protein bantların daha belirginleşmesi için jelin boyasının uzaklaştırılması amacıyla jel önce distile su ile yıkandı ve boya uzaklaştırıcı (destain) solüsyonuna alındı. Oda sıcaklığında karıştırılarak jel boyasızlaştırıldı ve transferin gerçekleştirildiği görüldü.

Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının hazırlanması; %0.006'lık Coomassie Brilliant Blue R-250 çözeltisi, %40 metanol ve %10 asetik asit içeren distile su ile oluşturulan bir karışım içerisinde çözündürüldü. Bunun için, tartılan coomassie boyası (6 mg), çeker ocak altında, önce 50 ml distile su ve 40 ml metanolden oluşan karışımında çözündürüldü ve bu karışıma 10 ml asetik asit eklendi. Bu çözelti oda sıcaklığında saklanabilmekte ve tekrar kullanılabilir.

Boya uzaklaştırıcı solüsyonunun hazırlanması; 10 ml metanol, 10 ml asetik asit 80 ml distile su içerisinde karıştırılarak çözelti hazırlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

3.8.6.6. Bloklama

Transfer işlemi sonrası blotlama sırasında membrana özgül olmayan bağlanmaların engellenmesi için; %5 yağsız süt tozu ve %0.5 Tween-20 içeren Tris tampon çözeltisi (TBST) ile muamele edilerek bloklama işlemi gerçekleştirildi.

3.8.6.7. Primer antikor ile inkübasyon

Bloklamadan alınan membranlar Tween-20 içeren TBST ile 3 kez yıkandı. Membranlar, primer antikorlar olarak 1:500 oranında poliklonal rabbit Beclin 1, survivin, HIF-1 α ve CA9 antikorları (Cell Signaling Technology Inc., MA, USA) TBST ile hazırlandı. Membranlar hazırlanan primer antikorlar ile 1 gece +4⁰ C'de bekletildi. Ertesi gün alınarak 3 kez TBST ile yıkandı ve bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı.

3.8.6.8. Sekonder antikor ile inkübasyon

Primer antikor inkübasyonundan alınan ve yıkanan membranlar, 1:1000 oranında TBST ile hazırlanan anti-rabbit Ig G horseradish peroksidaz (HRP)-bağlı sekonder antikor (Cell Signaling Technology Inc., MA, USA) ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Membranlar 3 kez TBST ile yıkandı ve bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı.

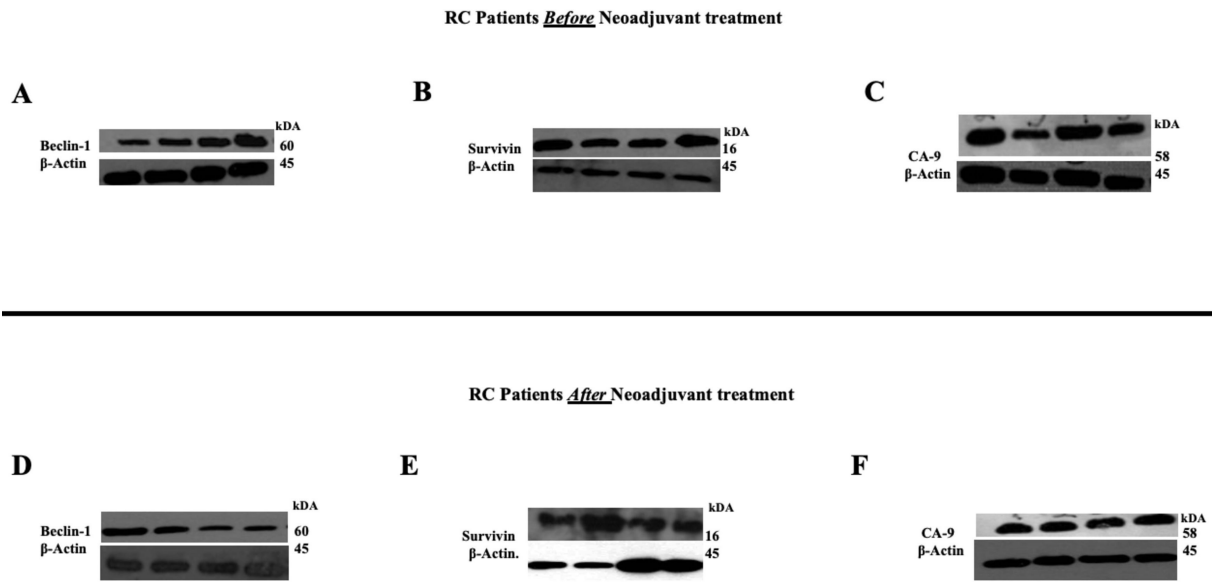
3.8.6.9. Görüntüleme

Tüm yıkamalar sonrasında deteksiyon kiti (Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore, MA, USA) kullanılarak proteinlerin tespiti yapıldı. Kit direktiflerine göre hazırlanan reaktif solüsyonundan membranı kaplayacak miktarda membran üstüne yayılarak 5 dakika bekletildi. Bu sürede sekonder antikorlara bağlı olan peroksidaz enzimleri reaktifteki substratları parçalar ve kimyasal bir ışığa gerçekleşir. Membranlar bir kaset içine alındıktan sonra üzerlerine kemiluminesansa duyarlı x-ray film (Kodak MXB Film, Carestream Health Inc., Essex, UK) koyuldu ve protein bantları görüntülendi.

3.8.6.10. Dansitometrik analiz

Protein bant yoğunlukları IMAGE-J Analysis Software programı (National Institute of Health, MD, USA) ile değerlendirildi. Veriler β -Aktine (Cell Signaling Technology Inc., MA, USA) oranlanarak standardize edildi. Sonuçlar Beclin/ β - Aktin, survivin/ β - Aktin, HIF-1 α / β -Aktin, CA9 / β - Aktin oranları şeklinde verildi.

Herbir hastaya ait Western Blot analiz görüntüsünü vermek yerine dört hastaya ait görüntüleri Şekil 8’de temsili olarak verildi. Bununla birlikte her türlü optimizasyon çalışmasına rağmen 25 hastada doku HIF-1 α protein seviyeleri elde edilemedi.



Şekil 8. Doku örneklerinin temsili Western Blot analiz görüntüleri. Üç bağımsız tekrardan birer temsili deney gösterildi. Üst panel (A, B, C) neoadjuvan tedavi öncesi Beclin, survivin ve CA9 protein düzeylerini ifade ederken, alt panelde (D, E, F) neoadjuvan tedavi sonrası protein düzeylerini belirtmektedir.

3.9. Verilerin değerlendirilmesi

Veriler Microsoft Office Excel 2007 ve IBM-Statistical Package for the Social Sciences Statistics 20.0 kullanılarak değerlendirildi.

Klinik evrelemedeki tümör evresi (T1, T2, T3, T4) veya lenf nodu tutulumu (N0, N1, N2), patolojik evrelemede en az bir evre gerilediğinde “evrede gerileme” olarak tanımlandı.

Histopatolojik olarak tümör regresyon sınıflamasına göre 0 ve 1 “tam yanıt ve tama yakın yanıt veren”, 2 ve 3 “parsiyel yanıt veren ve yanıt vermeyen” olarak tanımlandı. Buna göre iki grup arasındaki kan ve doku örneklerinde gen ifadenmesi ve protein düzeylerindeki farklılıklar Mann-Whitney testi ile analiz edildi. Sonuçlar ortanca ve %25-%75 yüzdeler olarak verildi.

Aynı hastaya ait farklı dönemlerde (neoadjuvan tedavi öncesi ve tümör rezeksiyonundan sonra) alınan kan ve dokuda gen ifadenmesi ve protein düzeylerindeki farklılıklar; biyopsi ve tümör rezeksiyonu ile alınan doku örnekleri arasındaki gen ifadenmesi ve protein düzeylerindeki farklılık Wilcoxon testi ile değerlendirildi. Sonuçlar ortanca ve %25-%75 yüzdeler olarak verildi.

Gen ifadenmesi ve protein düzeyleri arasındaki ilişkiler Spearman Korelasyon testi ile analiz edildi. Tüm p değerleri için <0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.10. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızın potansiyel sınırlılığı, etik nedenlerden dolayı sağlıklı kontrol grubu oluşturulup kan ve doku örnekleri veya hastanın komşu doku örneği alınamamasıdır. Eğer alınacak bu örneklerde aday belirteçler analiz edilmiş olsaydı hasta ve sağlıklı arasında var olan farkın yansıtılması mümkün olabilecekti. Bununla birlikte araştırmada neoadjuvan tedaviye yanıt hedeflendiği için her hastanın kendi içinde değerlendirilmesi bu dezavantajı gözardı edilebilir kılmıştır.

Başka bir zayıf yön teknik açıdan her türlü optimizasyon çalışmasına rağmen 25 hastada doku HIF-1 α protein seviyeleri elde edilememesidir. Önceki çalışmalar, HIF-1 α 'nın yalnızca hipoksik bir ortamda, CA9'un ise belirli fizyolojik ve düzenleyici koşullar altında normoksik ortamlarda da ifade edilebildiğini göstermiştir. Ayrıca CA9 ifadenmesi hipoksik ortamda HIF-1 α ile paralel olarak artmış olarak da tespit edilmiştir (127,128). Doku CA9 protein seviyeleri tespit edilebilirken doku HIF-1 α protein seviyelerinin belirlenememesinin nedeni posttranskripsiyonel düzenlemeler ve hedeflenen RK dokusunda hipoksinin dinamik fizyolojik durumu ve RK dokusunun ifadenme modeline yansıtılmaması olabilir.

4. BULGULAR

Hastalara ait tanımlayıcı özellikler Tablo 11’ de sunuldu. Buna göre çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyetleri %80 oranında ağırlıklı olarak erkekti. Klinik evrelemede hastalar T3 (%96) ve T4 (%1) evreye sahip iken patolojik evrelemede T0 (%12), T1 (%8), T2 (%12) ve T3 (%68) evresine gerilediği tespit edildi. Klinik evrelemede hastaların çoğunluğu N1 (%60) evresinde iken patolojik evrelemede N0 (%68) evresindeydi. Tümör regresyon sınıflamasına bakıldığında “tam yanıt ve tama yakın yanıt verenler” %40 iken “parsiyel yanıt veren ve yanıt vermeyenlerin” oranı %60 idi.

Tablo 11. Hastalara ait tanımlayıcı özellikler

Özellikler	Ortalama±Standart Sapma Ortanca (Min-Max)
Yaş	57.8±10.4 58 (36-71)
Cinsiyet	n (%)
Kadın	5 (%20)
Erkek	20 (%80)
Klinik evreleme	n (%)
T3b	10 (%40)
T3c	14 (%56)
T4b	1 (%4)
N0	1 (%4)
N1	15 (%60)
N2	9 (%36)
Patolojik evreleme	n (%)
T0	3 (%12)
T1	2 (%8)
T2	3 (%12)
T3	17 (%68)
N0	17 (%68)

N1	7 (%28)
N2	1 (%4)
Tümör regresyon sınıflaması	n (%)
0	3 (%12)
1	7 (%28)
2	7 (%28)
3	8 (%32)

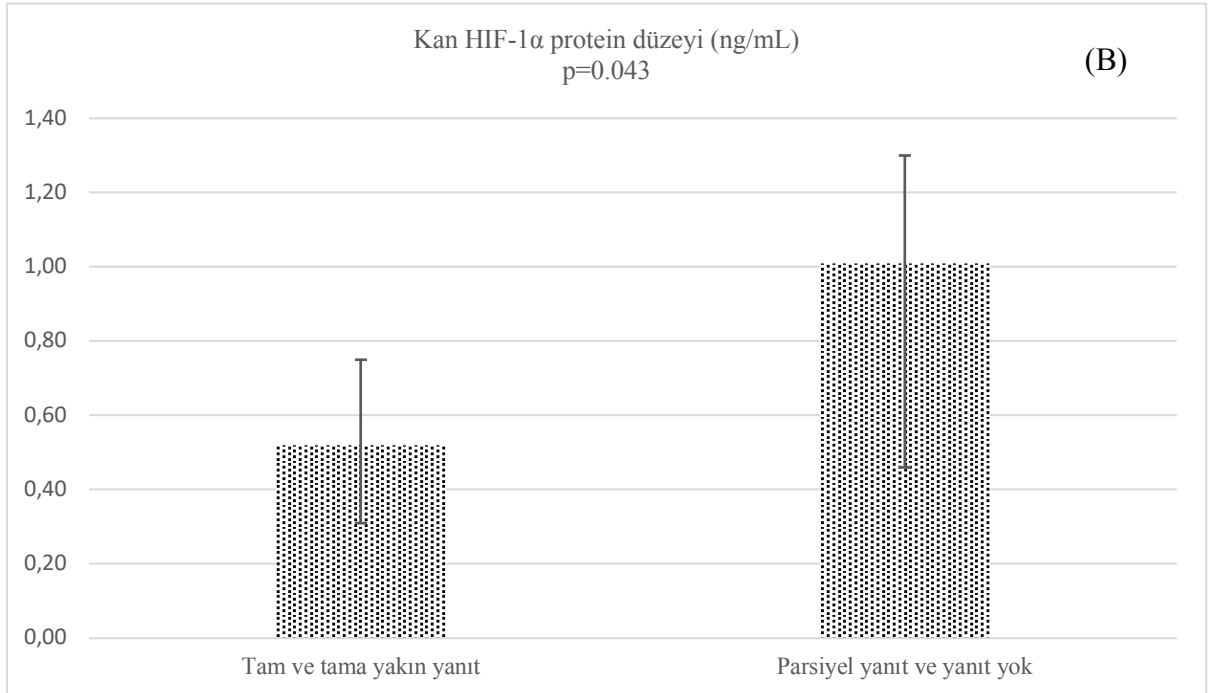
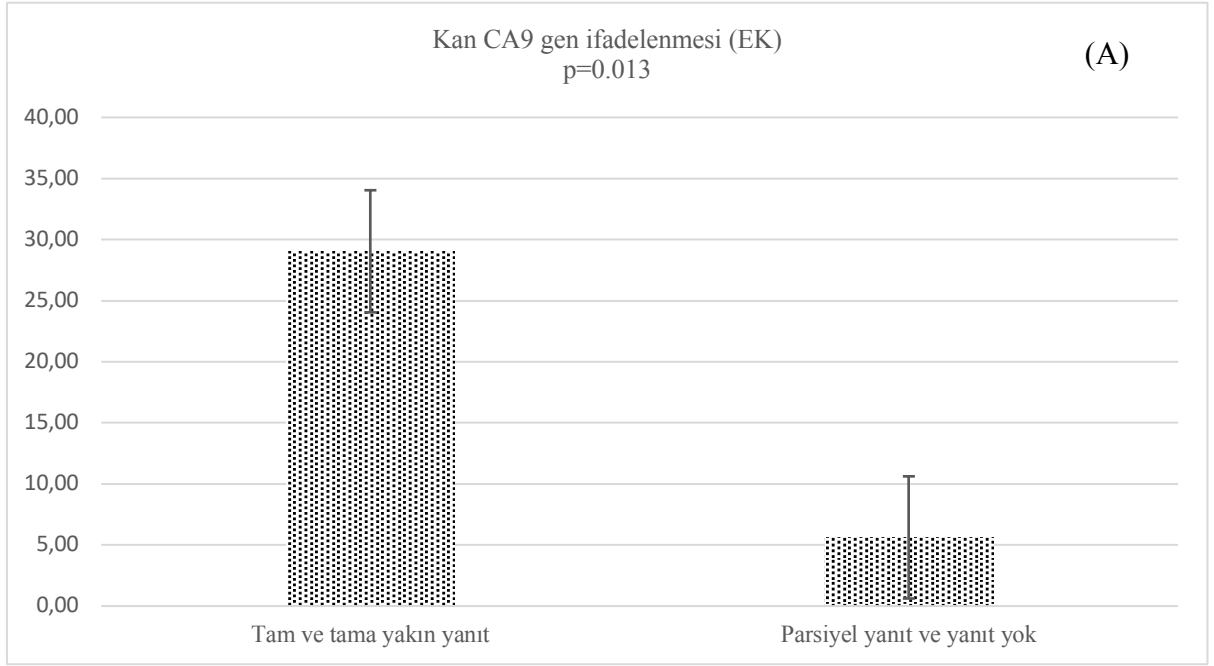
Tablo 12’ de “tam yanıt ve tama yakın yanıt verenler” ile “parsiyel yanıt veren ve yanıt vermeyenler” arasında doku ve kan düzeyindeki gen ifadenmesi ve protein düzeylerinin farkı araştırıldı. Buna göre kan *CA9* gen ifadenmesi düzeyleri “tam yanıt ve tama yakın yanıt verenlerde” istatistiksel olarak anlamlı yüksek ($p=0.013$) (Şekil 9A) ve kan HIF-1 α protein seviyeleri ise anlamlı düşük ($p=0.043$) (Şekil 9B) bulundu.

Tablo 12. Tümör regresyon sınıflamasına göre tedavi öncesi kan ve doku örneklerinde *Beclin 1*, *survivin*, *HIF-1 α* ve *CA9* gen ifadenmesi ve protein düzeyleri

Tam ve tama yakın yanıt				Parsiyel yanıt ve yanıt yok			
n (%)	10 (%40)			15 (%60)			
Gen ifadenmesi	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	p value
Doku <i>survivin</i> (EK)	97.34	6585.15	11113.30	44.02	127.56	1213.54	0.244
Doku <i>Beclin 1</i> (EK)	8659.09	130166.62	2232146.06	60.55	4269.94	1715264.94	0.415
Doku <i>HIF-1α</i> (EK)	279.17	515.56	35119.87	45.57	278.20	14664.09	1.000
Doku <i>CA9</i> (EK)	11.33	505.83	13193.14	3.57	47.42	1358.22	0.412
Kan <i>survivin</i> (EK)	0.001	0.002	0.183	0.005	0.032	1.266	0.107
Kan <i>Beclin 1</i> (EK)	0.22	21.41	107.78	0.75	19.97	359.54	0.881
Kan <i>HIF-1α</i> (EK)	0.000	0.006	0.039	0.001	0.012	2.505	0.302
Kan <i>CA9</i> (EK)	13.93	29.04	10734.74	0.02	5.62	16.45	0.013*
Protein düzeyleri	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	p value
Doku <i>survivin</i>	0.73	0.89	0.92	0.72	0.81	1.00	0.285
Doku <i>Beclin 1</i>	1.44	1.55	1.69	1.09	1.26	1.56	0.849
Doku <i>HIF-1α</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Doku <i>CA9</i>	1.07	1.47	1.68	0.98	1.09	1.36	0.569
Kan <i>survivin</i> (ng/L)	52.69	69.50	97.63	66.51	88.76	138.74	0.121
Kan <i>Beclin 1</i> (ng/mL)	2.79	4.50	9.04	2.56	6.98	9.22	0.558

Kan HIF-1 α (ng/mL)	0.31	0.52	0.75	0.46	1.01	1.30	0.043*
Kan CA9 (ng/mL)	0.02	0.09	0.48	0.02	0.39	1.61	0.319

EK: Ekspresyon katsayısı; TE: Tespit edilemedi. *p değeri <0.05 olduğu için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Doku protein düzeyleri Beclin/ β -Aktin, survivin/ β -Aktin, HIF-1 α / β -Aktin, CA9/ β -Aktin oranı olarak verildi.



Şekil 9. Neoadjuvan tedavi öncesi tümör regresyon derecesine göre kandaki *CA9* gen ifadenmesi (A) ve HIF-1 α protein seviyeleri (B). Bar grafiği ve hata çizgileri, medyan ve çeyrekler arası değeri göstermektedir. EK: Ekspresyon katsayısı.

Tablo 13’ de T evresindeki gerileme ile kan ve doku örneklerinde gen ifadenmesi ve protein düzeyleri arasındaki ilişki araştırıldı. Buna göre T evresinde gerileme olan ve olmayan hastalar arasında kan ve doku gen ifadenmesi ve protein düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 13. T evresindeki gerilemeye göre tedavi öncesi kan ve doku örneklerinde *Beclin 1*, *survivin*, *HIF-1 α* ve *CA9* gen ifadenmesi ve protein düzeyleri

T evresinde gerileme var				T evresinde gerileme yok			
n (%)	9 (%36)			16 (%64)			
Gen ifadenmesi	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	p value
Doku <i>survivin</i> (EK)	4.80	3341.25	9198.05	79.26	153.98	3472.71	0.428
Doku <i>Beclin 1</i> (EK)	7561.80	288051.24	2645707.55	71.14	25504.04	2102925.78	0.373
Doku <i>HIF-1α</i> (EK)	252.10	532.16	22365.85	47.45	278.69	17586.90	0.865
Doku <i>CA9</i> (EK)	10.14	530.64	946771.77	5.20	78.38	1060.96	0.298
Kan <i>survivin</i> (EK)	0.001	0.007	0.083	0.004	0.096	1.188	0.257
Kan <i>Beclin 1</i> (EK)	0.94	23.25	6673.89	0.20	20.11	35.10	0.560
Kan <i>HIF-1α</i> (EK)	0.001	0.009	0.899	0.001	0.008	1.924	0.711
Kan <i>CA9</i> (EK)	10.45	78.04	11112.51	0.02	5.66	18.99	0.054
Protein düzeyleri	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	p value
Doku <i>survivin</i>	0.56	0.67	0.79	0.725	0.89	1.02	0.934
Doku <i>Beclin 1</i>	1.19	1.37	1.55	1.125	1.41	1.73	0.121
Doku <i>HIF-1α</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Doku <i>CA9</i>	0.97	1.22	1.47	0.83	1.21	1.63	0.987
Kan <i>survivin</i> (ng/L)	49.39	84.96	113.01	63.59	75.52	126.78	0.633
Kan <i>Beclin 1</i> (ng/mL)	2.58	5.93	8.60	2.66	6.32	9.39	0.655
Kan <i>HIF-1α</i> (ng/mL)	0.41	0.73	1.09	0.36	0.75	1.29	0.698
Kan <i>CA9</i> (ng/mL)	0.02	0.11	0.70	0.02	0.16	1.59	0.612

EK: Ekspresyon katsayısı; TE: Tespit edilemedi. *p değeri <0.05 olduğu için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Doku protein düzeyleri *Beclin*/ β -Aktin, *survivin*/ β -Aktin, *HIF-1 α* / β -Aktin, *CA9*/ β -Aktin oranı olarak verildi.

Tablo 14’ de N evresindeki gerileme ile kan ve doku örneklerinde gen ifadenmesi ve protein düzeyleri arasındaki ilişki araştırıldı. Buna göre N evresinde gerileme olan ve olmayan hastalar arasında kan ve doku gen ifadenmesi ve protein düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 14. N evresindeki gerilemeye göre tedavi öncesi kan ve doku örneklerinde *Beclin 1*, *Survivin*, *HIF-1α* ve *CA9* gen ifadenmesi ve protein düzeyleri

		N evresinde gerileme var			N evresinde gerileme yok		
n (%)		18 (%72)			7 (%28)		
Gen ifadenmesi	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	p value
Doku <i>Survivin</i> (EK)	77.97	124.19	8066.01	39.74	254.48	7918.08	0.952
Doku <i>Beclin 1</i> (EK)	1199.54	76043.62	2102925.78	45.44	25504.04	5986331.48	0.673
Doku <i>HIF-1α</i> (EK)	57.26	422.63	19121.42	13.26	322.01	15638.36	0.506
Doku <i>CA9</i> (EK)	7.43	155.00	1894.12	16.70	78.38	1360.58	0.975
Kan <i>Survivin</i> (EK)	0.001	0.022	0.774	0.003	0.006	1.056	0.904
Kan <i>Beclin 1</i> (EK)	1.25	20.25	107.78	0.20	4.06	1562.89	0.634
Kan <i>HIF-1α</i> (EK)	0.001	0.011	0.483	0.001	0.002	2.532	0.927
Kan <i>CA9</i> (EK)	2.01	16.23	127.68	0.01	2.82	9.23	0.250
Protein düzeyleri	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	p value
Doku <i>Survivin</i>	0.79	0.81	0.89	0.64	0.89	0.95	0.574
Doku <i>Beclin 1</i>	1.19	1.33	1.49	1.26	1.63	1.83	0.586
Doku <i>HIF-1α</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Doku <i>CA9</i>	0.97	1.33	1.47	0.99	1.09	1.39	0.754
Kan <i>Survivin</i> (ng/L)	64.07	84.96	148.195	61.68	75.52	123.06	0.657
Kan <i>Beclin 1</i> (ng/mL)	2.575	6.61	9.05	2.66	5.38	9.16	0.924
Kan <i>HIF-1α</i> (ng/mL)	0.335	0.73	1.18	0.49	0.77	1.29	0.680
Kan <i>CA9</i> (ng/mL)	0.025	0.11	0.955	0.01	0.16	0.62	0.633

EK: Ekspresyon katsayısı; TE: Tespit edilemedi. *p değeri <0.05 olduğu için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Doku protein düzeyleri *Beclin*/β-Aktin, *Survivin*/β-Aktin, *HIF-1α* /β-Aktin, *CA9*/β-Aktin oranı olarak verildi.

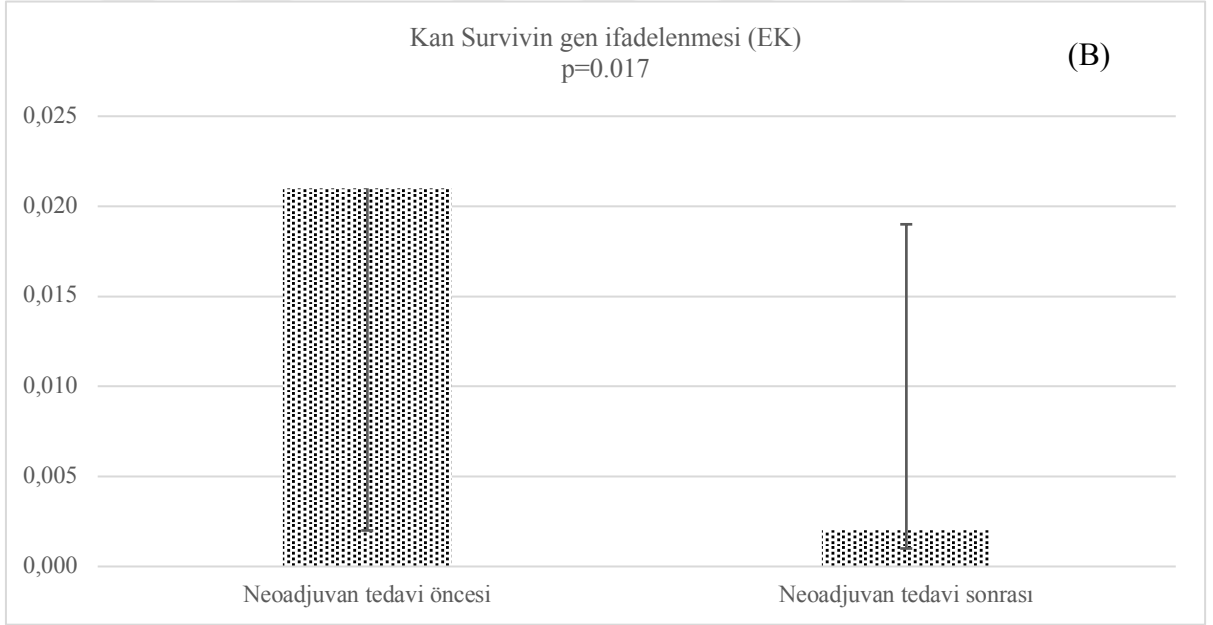
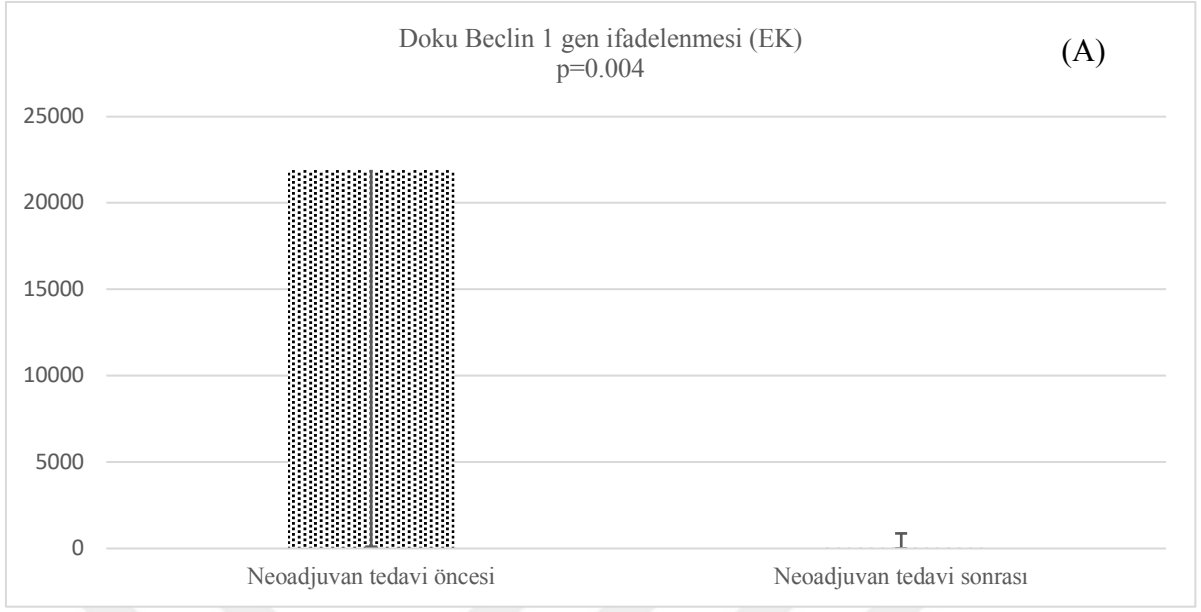
Tablo 15’ de cerrahi sonrası kan ve doku örneklerinde gen ifadenmesi ve protein düzeylerindeki değişimin istatistiksel olarak anlamlılığı araştırıldı. Buna göre doku *Beclin 1*

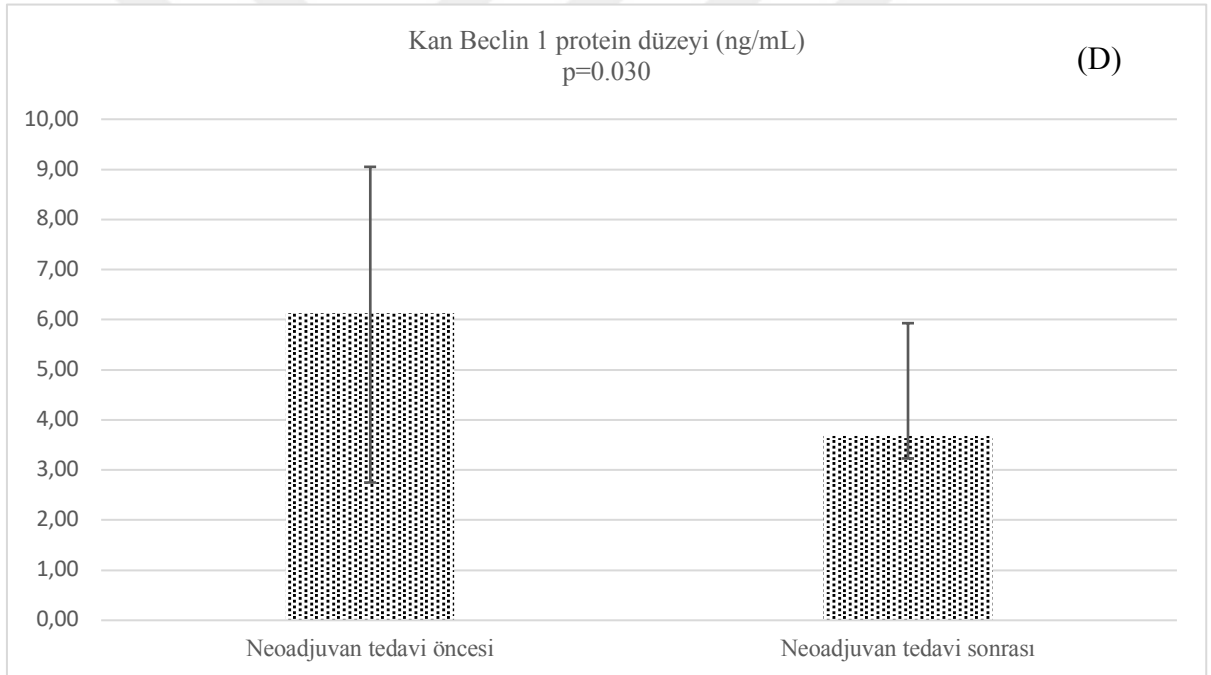
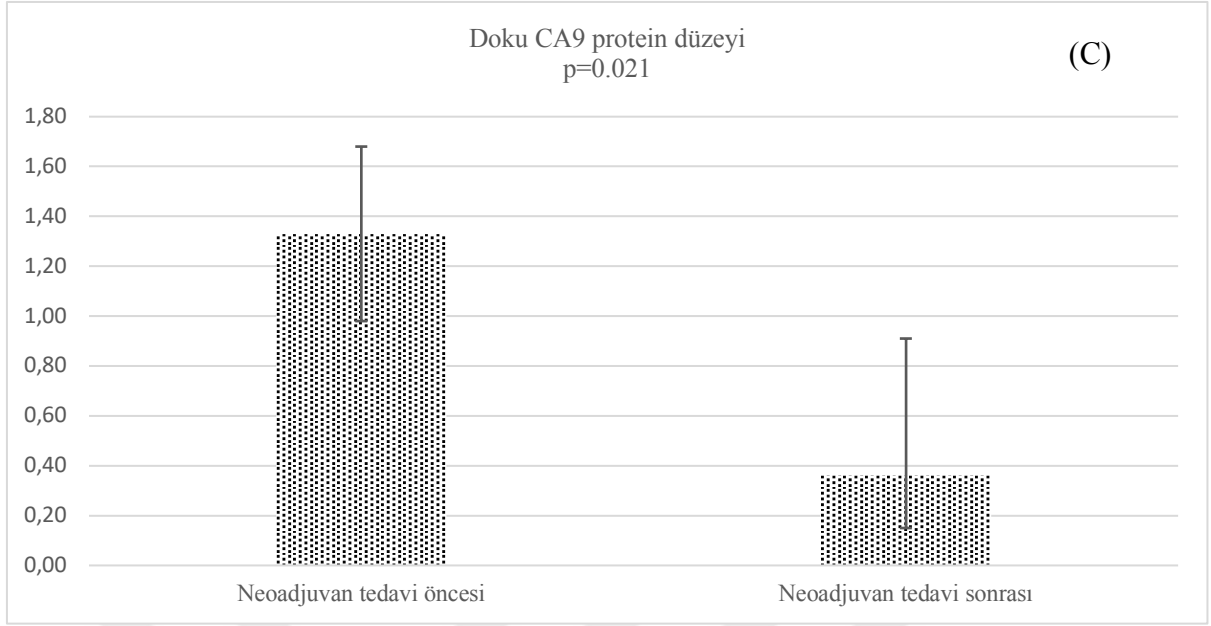
(p=0.004) (Şekil 10A) ve kan *Survivin* gen ifadesi (p=0.017) (Şekil 10B); doku CA9 (p=0.021) (Şekil 4C), kan Beclin 1 (p=0.030) (Şekil 10D) ve kan HIF-1 α (p=0.040) (Şekil 10E) protein düzeylerinin istatistiksel olarak azaldığı saptandı.

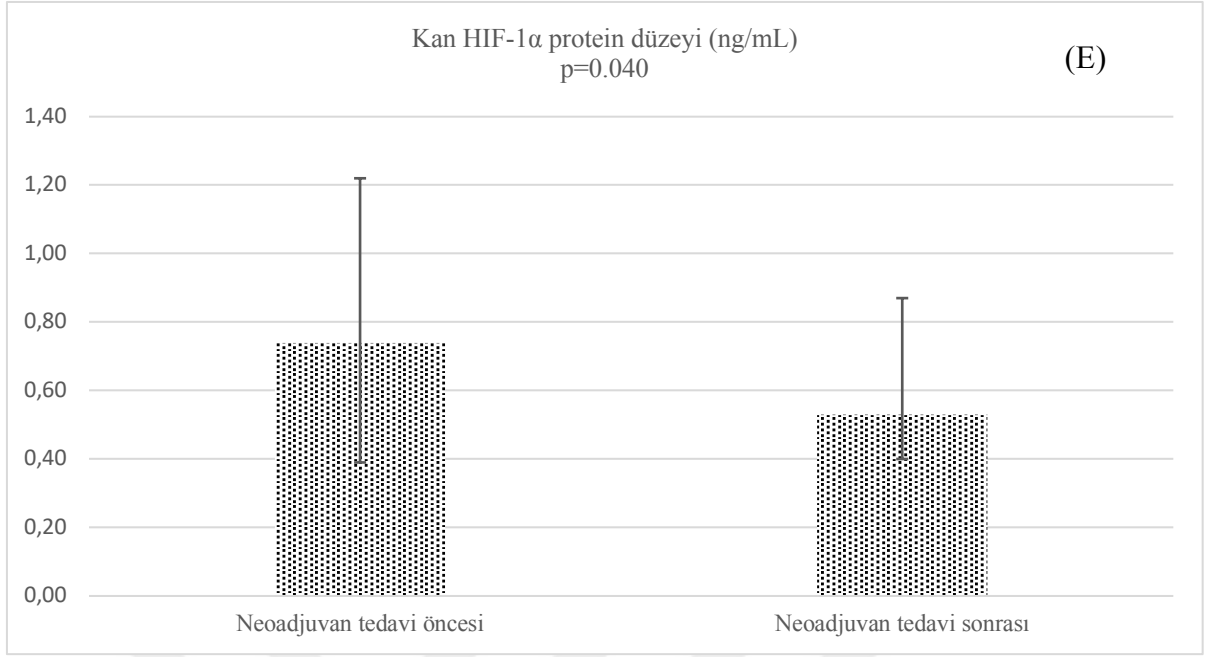
Tablo 15. Neoadjuvan tedavi öncesi ve sonrası kan ve doku örneklerinde *Beclin 1*, *Survivin*, *HIF-1 α* ve *CA9* gen ifadeleneşmesi ve protein düzeyleri

n=25	Neoadjuvan tedavi öncesi			Neoadjuvan tedavi sonrası			
Gen ifadeleneşmesi	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	p value
Doku <i>Survivin</i> (EK)	49.21	180.39	8404.31	9.98	88.44	421.18	0.244
Doku <i>Beclin 1</i> (EK)	102.89	21920.61	1715264.94	0.75	27.89	873.10	0.004*
Doku <i>HIF-1α</i> (EK)	20.81	279.17	6454.48	145.99	1584.71	4182.47	0.498
Doku <i>CA9</i> (EK)	3.21	25.68	956.83	5.22	86.07	429.84	0.639
Kan <i>Survivin</i> (EK)	0.002	0.021	0.948	0.001	0.002	0.019	0.017*
Kan <i>Beclin 1</i> (EK)	0.23	19.97	107.78	0.02	0.30	39.35	0.189
Kan <i>HIF-1α</i> (EK)	0.001	0.009	0.973	0.001	0.003	0.010	0.055
Kan <i>CA9</i> (EK)	0.10	10.62	75.14	0.12	9.58	40.33	0.627
Protein düzeyleri	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	25.yüzdelik	Ortanca	75.yüzdelik	p value
Doku <i>Survivin</i>	0.67	0.89	1.02	0.91	0.94	1.06	0.543
Doku <i>Beclin 1</i>	1.09	1.49	1.73	0.81	0.98	1.08	0.357
Doku <i>HIF-1α</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Doku <i>CA9</i>	0.98	1.33	1.68	0.15	0.36	0.91	0.021*
Kan <i>Survivin</i> (ng/L)	63.83	80.24	125.85	23.55	49.80	139.49	0.181
Kan <i>Beclin 1</i> (ng/mL)	2.75	6.13	9.05	3.23	3.68	5.93	0.030*
Kan <i>HIF-1α</i> (ng/mL)	0.39	0.74	1.22	0.40	0.53	0.87	0.040*
Kan <i>CA9</i> (ng/mL)	0.02	0.14	0.84	0.08	0.50	1.22	0.616

EK: Ekspresyon katsayısı; TE: Tespit edilemedi. *p değeri <0.05 olduğu için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Doku protein düzeyleri Beclin/ β -Aktin, *Survivin*/ β -Aktin, *HIF-1 α* / β -Aktin, *CA9*/ β -Aktin oranı olarak verildi.







Şekil 10. Neoadjuvan tedaviden önce ve sonra doku Beclin 1 (A) ve kan *Survivin* gen ifadesi (B); doku CA9 (C), kan Beclin 1 (D) ve kan HIF-1α (E) protein düzeyleri. Bar grafiği ve hata çizgileri, medyan ve çeyrekler arası değeri göstermektedir. EK: Ekspresyon katsayısı.

Çeşitli nedenlerle aralarında ilişki olabileceği düşünülen bu belirteçlerin tedavi öncesi kan ve dokudaki gen ifadelenmeleri ve protein düzeyleri arasındaki korelasyonu değerlendirildi (Tablo 16). Dokudaki *HIF-1α* ile *CA9* ($r=0.480$, $p=0.018$) ve *Beclin 1* ile *CA9* ($r=0.664$, $p=0.003$) gen ifadelenmesi arasında pozitif bir ilişki saptandı. Bununla birlikte kandaki örneklerde gen ifadelenmesi için benzer bir ilişki saptanamadı. Protein düzeyleri incelendiğinde dokudaki *Survivin* ve *Beclin 1* arasında negatif bir ilişki ($r=-0.590$, $p=0.002$) bulunurken, kan örneklerinde *Survivin* ile *HIF-1α* ($r=0.722$, $p<0.001$) ve *CA9* ($r=0.549$, $p=0.005$) arasında; kan *HIF-1α* ile *CA9* ($r=0.753$, $p<0.001$) arasında pozitif bir ilişki saptandı.

Tablo 16. Doku ve kandaki Beclin 1, *Survivin*, *HIF-1α* ve *CA9* arasındaki korelasyon katsayısı ve p değeri

Doku gen ifadelenmesi	Survivin	HIF-1α	CA9	Beclin 1
<i>Survivin</i>	1	-0.156 (0.456)	-0.101 (0.639)	0.021 (0.935)
<i>HIF-1α</i>		1	0.480 (0.018)*	0.416 (0.086)
<i>CA9</i>			1	0.664 (0.003)*

<i>Beclin 1</i>				1
Kan gen ifadelenmesi	Survivin	HIF-1 α	CA9	Beclin 1
<i>Survivin</i>	1	0.105 (0.616)	0.025 (0.907)	-0.089 (0.678)
<i>HIF-1α</i>		1	-0.356 (0.081)	-0.024 (0.913)
<i>CA9</i>			1	0.238 (0.262)
<i>Beclin 1</i>				1
Doku protein düzeyleri	Survivin	HIF-1 α	CA9	Beclin 1
Survivin	1	UD	0.419 (0.228)	-0.590 (0.002)*
HIF-1 α		UD	UD	UD
CA9			1	0.006 (0.987)
Beclin 1				1
Kan protein düzeyleri	Survivin	HIF-1 α	CA9	Beclin 1
Survivin	1	0.722 (< 0.001)*	0.549 (0.005)*	0.147 (0.493)
HIF-1 α		1	0.753 (< 0.001)*	0.121 (0.572)
CA9			1	0.054 (0.802)
Beclin 1				1

TE: Tespit edilemedi. *p değeri <0.05 olduğu için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda tedaviye direnç ve yanıt dengesinde önemli mekanizmalarla ilişkili olabileceği düşünülen apoptoz ailesi inhibitörlerinden biri olan Survivin, otofajik yolda pozitif düzenleyici olan Beclin 1 ve tümör doku hipoksisi ile ilgili HIF-1 α ve CA9 araştırıldı. Rektal kanserlerde neoadjuvan tedaviye yanıtı öngörmede birçok tümör belirteç ile ilgili araştırma bulunmasına rağmen dört farklı gen (*Beclin 1*, *Survivin*, *HIF-1 α* ve *CA9*) için çok az çalışma bulunmaktadır.

Ayrıca yapılan çalışmalarda parafine gömülmüş tümör örnekleri kullanılmıştır. Formalinle sabitlenmiş parafin doku örnekleri, rutin olarak toplanır, oda sıcaklığında depolanır ve yüksek numune sayılarını araştıran retrospektif patolojik analizler için uygun bir malzeme olarak kullanılabilir. Ancak yüksek kullanılabilirlik avantajına rağmen, bu korunmuş doku örneklerindeki fiksasyon prosedürü RNA degradasyonuna neden olduğu için gen ifadelenmesi

temelli çalışmalarda kullanımı daha sınırlıdır. Örnek toplama olanağı sınırlı olmakla birlikte taze dondurulmuş doku örnekleri, özellikle RNA kullanılarak gen ifadenmesinin araştırıldığı çalışmalarda güvenilir kaynak olarak kabul edilmektedir (129). Bu açıdan taze doku örneklerinde aday belirteçlerin gen ifadenmesi ve protein düzeylerinin değerlendirilmesi çalışmamıza değer kattığı düşünülmektedir.

RK hastalarının neoadjuvan sonrası yaklaşık %40' nın tümör evresinde gerileme yaşandığı ve tam yanıt oranlarının %8 ile %44 arası olduğu bilinmektedir. Hastaların yaklaşık %30' unda ise minimal yanıt veya hatta hastalığın ilerlediği görülmektedir (130). Çalışmamızda hastaların tümör regresyon sınıflamasına göre “tam ve tama yakın yanıt verenlerin” oranı %40 iken, “yanıt vermeyenler” %32 olarak bulundu. T evresindeki gerilemeye sahip olanların oranı ise %36 idi. Aldığımız hasta grubunda benzer sonuçlar çıkması uygulanan neoadjuvan tedavinin etkinliğini destekler şekildeydi.

Çalışmamız sonuçlarına göre kan ve doku *Beclin 1* ve *Survivin* gen ifadenme ve protein düzeylerinin tümör regresyon sınıflaması ile ilişkili olmadığı saptandı. Bununla birlikte sadece kandaki *CA9* gen ifadenme düzeylerinin “tam ve tama yakın yanıt verenlerde” daha yüksek olduğu tespit edildi. Bir başka çalışmada, uzun süreli neoadjuvan kemoradyoterapi öncesi kısa süreli neoadjuvan kemoterapisi tamamlanan hastalarda bazale göre artan serum *CA9* değerleri ile histolojik tümör evresi arasında anlamlı bir korelasyon bulundu. Bazale göre neoadjuvan kemoterapi sonrası serum *CA9* değerlerindeki artış 224 pg/ml'nin üzerinde olması durumunda progresyonsuz sağ kalım oranı anlamlı olarak artmaktaydı ve neoadjuvan sonrası bu fark histolojik tümör evresi ile korele bulundu. Fakat neoadjuvan kemoterapi sonrası serum *CA9* değerlerindeki artış ile tümör regresyon sınıflaması arasında korelasyon saptanmadı (131). Bizim çalışmamızda ise tespit edilen neoadjuvan tedavi öncesi yüksek kan *CA9* gen ifadenme düzeylerinin tedaviye pozitif yanıt için bir belirteç olabileceğini desteklemektedir.

HIF-1 α 'nın tedavi öncesi durumunun klinik evre II / III rektal kanserde patolojik cevabı ve sonuçları öngördüğü bulunmuştur (132). *HIF-1 α* gen ifadenmesi ile kötü sonuç veren ileri TNM evresi arasında bağımsız bir ilişki olduğu gösterilen çalışmada, HIF-1 α ' nın hastalık sürecini daha iyi yönetebilmek için halen kullanılan yöntemlere ek olarak prognostik olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (133). Tümör regresyon ve patolojik evrelemeye göre yanıt verenlerde, yanıt vermeyenlere göre tedavi öncesi tümör biyopsilerinde *HIF-1 α* gen ifadenme düzeyleri anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiş ve *HIF-1 α* geninin yüksek ifadenmesinin kemoradyasyona azalmış yanıtı tahmin edebileceği düşünülmüştür (134).

Bununla birlikte HIF-1 α pozitif grup ile HIF-1 α negatif grup arasında patolojik evreleme açısından anlamlı fark bulmayan çalışmalar da vardır (135). Çalışmamızda, “tam ve tama yakın yanıt verenlerde” düşük kan HIF-1 α protein seviyeleri, HIF-1 α 'nın prognostik bir belirteç olarak rol oynayabileceğini düşündürdü.

Sonuçlarımıza benzer şekilde, neoadjuvan kemoradyoterapi uygulanan hastalarda diğer bir aday belirteç olan *Survivin* gen ifadenme seviyelerinin evrede gerileme ile korele olmadığı saptanmıştır (136). Bununla birlikte, tedavi öncesi tümör biyopsisinde yüksek *Survivin* ifadenmesinin, neoadjuvan tedavi sonrası tümör evresinde gerilemenin daha az olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (137).

Tedavi öncesi kanser dokusundaki Beclin 1 ifadelenmesi ile tümör evresinde gerileme arasındaki ilişkiyi istatistiksel olarak anlamlı bulan çalışmada, Beclin 1'in rektal kanser hastalarında kemoradyoterapinin etkinliği için prediktif bir biyobelirteç olabileceği düşünülmüştür (12). Ancak bizim çalışmamızda Beclin 1'de neoadjuvan tedaviye yanıtı tahmin etmeye yardımcı olabilecek anlamlı bir değişiklik yoktu.

Araştırmamız lokal ileri evre RK'da neoadjuvan tedavi sonrası doku *Beclin 1* ve kan *Survivin* gen ifadenmesi ile doku CA9, serum Beclin 1 ve serum HIF-1 α protein düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını saptayan bilinen ilk klinik çalışmadır.

Diğer bir çalışmada rektal kanser dokularında HIF-1 α protein ifadenmesinin neoadjuvan tedavi sonrası azaldığı gösterilmiştir (138). *HIF-1 α* gen ifadenmesi preoperatif biyopsilerin çoğunda pozitifken postoperatif örneklerin çoğunda ekspresyonun azaldığı bir başka çalışmada da tespit edilmiştir (139). Araştırmamızda doku ve kan düzeyinde gen ifadenmesi ile ilgili neoadjuvan tedavi sonrası bir değişim saptanmamasına rağmen serum HIF-1 α protein düzeylerinin önemli ölçüde azalması dikkat çekmiştir.

Hücre sağkalımı, hücre proliferasyonu, epitelyaldan mezenkimal geçiş ve stroma üretimi gibi birçok biyolojik süreçleri düzenleyen yollardaki değişiklikler, kolorektal karsinogenez ve tümör progresyonuna katkıda bulunabilir. *Survivin* -31G/C genotipi ile kolorektal kanser gelişimi arasında ilişki olduğu (140) ve *Survivin* -31C alel ve CC genotipinin sıklığının kolorektal kanser hastalarında sağlıklı deneklere göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirtilmiştir. *Survivin* -31C/C genotipi, -31G/G ve -31G/C genotipleri olan vakalarla kıyaslandığında 1.6 kat daha yüksek mRNA ifadenmektedir (141).

Survivin geninin, RK hastalarında aşırı ifadelendiği, böylece tümör hücrelerinin hücre ölümünden korunduğu ve kötü prognozu gösterdiği belirtilmiştir (7,8). Bu nedenle tedavide

Survivin hedeflenmiştir. Survivin antisens oligonükleotidlerinin *in vitro* olarak RK hücrelerinde çarpıcı bir şekilde hücre ölümüne yol açtığı kanıtlanmıştır (9).

Neoadjuvan tedavi sonrası doku Survivin ifadelenmesinde belirgin bir düşüş gözleendiği, Survivin ifadelenmesinin rektal kanserlerde prognostik bir belirteç olabileceği ve bireysel yanıt izleme ve gelecekteki randomize klinik çalışmalarda multimodal rektal kanser tedavisinde anti-Survivin stratejileri için potansiyel olabileceği vurgulanmıştır (142). Araştırmamızda kan *Survivin* gen ifadesinin neoadjuvan tedavi sonrası azaldığının gösterilmesi yapılan çalışmaları desteklemektedir.

Hipoksi ve büyüme faktörünün olmadığı koşullarda otofaji yaşamı sürdürme kabiliyeti sağlar (10). Otofagozom oluşumu hipoksik bir ortamda büyüyen tümörlerin en belirgin özelliğidir. Beclin 1, hücrel strese tepki olarak indüklenir ve tümör hücre yaşamının devam etmesi için otofajik yolda pozitif düzenleyicidir. Beclin 1 süpresyonu, apoptoza RK hücrelerini duyarlı hale getirilmesi için bir tedavi hedefidir (12).

Önceki yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler, farklı fizyolojik koşullarda RK'de patofizyolojisinde rol oynayan yollar arasında çapraz iletişimi anlamak için önemlidir. Beclin 1'in değişime uğramamış formları otofajide fonksiyon görürken, kaspaz tarafından bölünme sonrası C-terminal fragmanı (Beclin 1-C) apoptozda rol oynar (143). Survivin kaspaz 3' ü baskılar, böylece kanser hücrelerinde apoptoz azalır (144). Beclin 1'in susturulması ile Survivin protein ifadesinin azaldığı ve hızla metabolize edildiği tespit edilmiştir (13). Bu durum otofaji ve apoptoz arasındaki bağlantının temelini açıklayabilir.

Tümör hücrelerinin otofaji gibi diğer yaşamı sürdürme kabiliyetini arttıran sebep hipoksiye uyumdur. Hipoksi anjiyogenez indüksiyonu için önemli bir sinyaldir ve hipoksi tarafından düzenlenen anjiyogenik faktörlerin çoğu, HIF-1 α 'nın kontrolü altındadır (14,15). HIF-1 α 'nın doğrudan *Survivin* geninin promotör bölgesine bağlandığı ve transkripsiyonel aktivatör ve upregulatör olarak işlev gördüğü belirtilmiştir (144,145). Doku CA9 ve doku *Beclin 1* gen ifadesi arasındaki ve kan Survivin ile kan HIF-1 α ve CA9 protein düzeyleri arasındaki pozitif ilişki hipoksiye uyum, apoptoz ve otofaji arasında geniş bağlantı mekanizmasını desteklemektedir. Çalışmamızda doku *HIF-1 α* ile *CA9* gen ifadelenmesi ve kan HIF-1 α ile CA9 arasında protein düzeyleri arasında bulunan pozitif ilişki ise diğer çalışmalardaki (16, 146, 147) gibi HIF-1 α 'nın CA9' un transkripsiyonel kontrolünü sağladığını düşündürmektedir.

Araştırmamızda en önemli kısıtlayıcı faktör, araştırmaya dahil edilme kriterlerine uyan hasta sayısının yetersizliği ve hastaların çalışmaya dahil olma konusunda isteksizliği nedeniyle hedeflenen hasta sayısına ulaşılamamasıdır. Çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyet dağılımları eşit olmamasına (%80 oranında erkek) rağmen farklı çalışmalarda RK' de erkek hasta oranının kadınlara göre daha yüksek olması (%57.5-70.7 / %29.3-42.5) toplumdaki dağılımı yansıttığını göstermektedir (148,149).

Başka bir zayıf yön teknik açıdan her türlü optimizasyon çalışmasına rağmen 25 hastada doku CA9 protein tespit edilmesine rağmen doku HIF-1 α protein seviyeleri elde edilememesidir. CA9 geni, transkripsiyon başlangıç bölgesinde lokalize HRE sekansına HIF-1'in bağlanması yoluyla transkripsiyonel olarak düzenlenir. CA9, düşük oksijene (anoksiden orta derecede hipoksiye kadar) en iyi yanıt verenlerden biridir. (17,150). Ayrıca HIF hücre tipine özgü artmış hücre yoğunluğu ve asidoz (hem hipoksik hem de normoksik şartlarda) ile CA9' un transkripsiyonel aktivasyonuna da neden olur (151,152). CA9, yüksek protein stabilitesi nedeniyle re-oksijenizasyondan saatler ve günler sonra bile düzeyleri devam edebildiği için (153), bölgesel dağılımı, HIF-1 α , VEGF ve GLUT1 dahil gibi hipoksi ile düzenlenen diğer moleküller ile her zaman örtüşmeyebilir (154). Ayrıca posttranskripsiyonel düzenlemeler, hedeflenen RK dokusunda hipoksinin dinamik fizyolojik durumu ve RK dokusunun HIF-1 α ifadenme modeline yansıtılmaması olabilir.

6. SONUC

Kan CA9 gen ifadenmesinin ve kan HIF-1 α protein düzeylerinin tedaviye yanıt ile ilişkili olması, doku *Beclin 1* ve kan *Survivin* gen ifadeleri ile doku CA9, serum Beclin 1 ve serum HIF-1 α protein düzeylerinin neoadjuvan tedavi sonrası azalması, bu belirteçlerin prognostik olarak kullanılmasına ve uygulanan tedavi rejiminin ya da yaklaşımının seçiminde veya etkilerini öngörmeye yarar sağlayabilir. Ayrıca zararlı yan etkileri olmayan veya az olan daha etkili kişiselleştirilmiş yeni tedavi stratejilerinin uygulanması veya geliştirilmesi ile tedavi yöntemlerinin optimizasyonunu sağlayabilir. Uzak metastaz ve sağ kalım ile ilgili ileri çalışmaların yapılması için öncü olabilir. Böylece maliyet etkinliği, kişiselleştirilmiş tedavi uygulanmasıyla artırılabilir.

Araştırmamızın sınırlamaları nedeniyle daha geniş hasta sayısına sahip cinsiyet açısından homojen dağılıma sahip daha ileri çalışmaların yapılması önerilmektedir. Değerlendirilen

Beclin 1, Survivin, HIF-1 α ve CA9 aday belirteçlerin, rektal kanserden başka farklı mekanizmalarla oluşan diğer tümörler çeşitlerindeki farklı etkinlik mekanizmalarına sahip tedavi yaklaşımlarında araştırılarak kanser tedavisinde yeni prognostik belirteçler saptanabilir.



7. KAYNAKLAR

1. Hawk ET, Linburg PJ, Viner JL. Epidemiology and prevention of colorectal cancer. Surg Clin North Am 2002; 82: 905-41.
2. Buroker T, Nigro N, Correa J, Vaitkevicius VK ve ark. Combination preoperative radiation and chemotherapy in adenocarcinoma of the rectum: preliminary report. Dis Colon Rectum 1979; 19: 660-3.
3. Minsky BD, Cohen AM, Kemeny N, Enker WE ve ark. Efficacy of preoperative 5-FU, high dose leucovorin, and sequential radiation therapy for unresectable rectal cancer. Cancer 1994; 73: 273-280.
4. Tian M, Wan Y, Tang J, Li H ve ark. Depletion of tissue factor suppresses hepatic metastasis and tumor growth in colorectal cancer via the downregulation of MMPs and the induction of autophagy and apoptosis. Cancer Biol Ther 2011; 12: 896-907.
5. Yang WL, Perillo W, Liou D, Marambaud P ve ark. AMPK inhibitor compound C suppresses cell proliferation by induction of apoptosis and autophagy in human colorectal cancer cells. J Surg Oncol 2012; 106: 680-8.
6. Raina K, Agarwal C, Wadhwa R, Serkova NJ ve ark. Energy deprivation by silibinin in colorectal cancer cells: a double-edged sword targeting both apoptotic and autophagic machineries. Autophagy 2013; 9: 697-713.
7. Hernandez JM, Farma JM, Coppola D, Hakam A ve ark. Expression of the antiapoptotic protein Survivin in colon cancer. Clin Colorectal Cancer 2011;10(3): 188-93.
8. Thomas AW, Pablo EV, Nikolas HS, Wolfram TK. Prognostic and Clinicopathological Significance of Survivin in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. PLoS One 2013; 3: 8(6), e65338.
9. Yao H, Huang ZH, Li Z, Su GQ ve ark. Specific killing effects of combination of recombinant adenovirus containing double suicide gene driven by KDR promoter and Survivin antisense oligonucleotide on colorectal cancer cells and vascular endothelial cells. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Zazhi 2008; 11: 61-6.
10. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K ve ark. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. Cancer Cell 2006; 10: 51-64.
11. Bhutia SK, Mukhopadhyay S, Sinha N, Das DN ve ark. Autophagy: cancer's friend or foe?. In Advances in Cancer Research 2013; 118: 61-95.

12. Zaanan A, Park JM, Tougeron D, Huang S ve ark. Association of beclin 1 expression with response to neoadjuvant chemoradiation therapy in patients with locally advanced rectal carcinoma. *International Journal of Cancer* 2015; 137(6): 1498-1502.
13. Niu TK, Cheng Y, Ren X, Yang JM. Interaction of Beclin 1 with Survivin regulates sensitivity of human glioma cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett* 2010; 584(16): 3519-24.
14. Harris A. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 38-47.
15. Semenza G. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-32.
16. Opavsky R, Pastorekova S, Zelnik V, Gibadulinova A ve ark. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* 1996; 33: 480-7.
17. Wykoff C, Beasley N, Watson P, Turner K ve ark. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000; 60: 7075-83.
18. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila A, Haukipuro K ve ark. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol* 1998; 153: 279-85.
19. Korkeila E, Talvinen K, Jaakkola PM, Minn H ve ark. Expression of carbonic anhydrase IX suggests poor outcome in rectal cancer. *British Journal of Cancer* 2009; 100: 874-80.
20. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M ve ark. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2018.
21. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL ve ark. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer J Clin* 2018; 68: 394-424.
22. Glynne-Jones R, Wyrwicz, L, Tiret E, Brown G ve ark. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2017; 28: iv22-iv40.
23. Gültekin M, Boztaş G. T.C Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanseri Savaş Daire Başkanlığı. *Türkiye Kanseri İstatistikleri*, Ankara 2016.
24. Eddy DM. Screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med* 1990; 113:373.

25. Bailey CE, Hu CY, You YN, Bednarski BK ve ark. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA Surg* 2015; 150: 17-22.
26. Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C ve ark. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet* 1997;17(1):79.
27. Jung I, Gurzu S, Turdean GS. Current status of familial gas- trointestinal polyposis syndromes. *World J Gastrointest Oncol*. 2015; 7(11): 347-55.
28. Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med* 1995; 46: 371.
29. Tannergård P, Lipford JR, Kolodner R, Frödin JE ve ark. Mutation screening in the hMLH1 gene in Swedish hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res* 1995; 55: 6092.
30. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD ve ark. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:69.
31. Parry S, Win AK, Parry B, Macrae FA ve ark. Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery. *Gut* 2011; 60: 950.
32. Marra G, Boland CR. DNA repair and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin Nort Am*. 1996; 25(4): 755.
33. McVeigh TP, Duff M, Carroll C, O'Shea R ve ark. MUTYH- Associated Polyposis: The Irish Experience. *Ir Med J* 2016; 109(10): 485.
34. Bogaert J, Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of Gastroenterology* 2014; 27(1), 9.
35. Kantor M, Sobrado J, Patel S, Eiseler S ve ark. Hereditary Colorectal Tumors: A Literature Review on MUTYH-Associated Polyposis. *Gastroenterol Res Pract* 2017; 2017, 8693182.
36. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med* 1992; 326:658.
37. Tuohy TM, Rowe KG, Mineau GP, Pimentel R ve ark. Risk of colorectal cancer and adenomas in the families of patients with adenomas: a population-based study in Utah. *Cancer* 2014; 120:35.
38. Van Der Kraak L, Gros P, Beauchemin N. Colitis-associated colon cancer: Is it in your genes? *World J Gastroenterol* 2015; 21(41): 11688-99.

39. Henderson TO, Oeffinger KC, Whitton J, Leisenring W ve ark. Secondary gastrointestinal cancer in childhood cancer survivors: a cohort study. *Ann Intern Med* 2012; 156: 757.
40. Nottage K, McFarlane J, Krasin MJ, Li C ve ark. Secondary colorectal carcinoma after childhood cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30:2552.
41. <http://www.survivorshipguidelines.org/pdf/ColorectalCancer.pdf> (Accessed on June 19, 2012).
42. Baxter NN, Tepper JE, Durham SB, Rothenberger DA ve ark. Increased risk of rectal cancer after prostate radiation: a population-based study. *Gastroenterology* 2005; 128: 819.
43. Delhougne B, Deneux C, Abs R, Chanson P ve ark. The prevalence of colonic polyps in acromegaly: a colonoscopic and pathological study in 103 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3223.
44. Ilova skaia IA. Colorectal neo- and dysplasia in acromegaly. *Eksp Klin Gastroenterol*. 2014; (7): 32-7.
45. Melmed S, Colao A, Barkan A, Molitch M ve ark. Guidelines for acromegaly management: an update. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:1509.
46. Park JM, Choi MG, Kim SW, Chung IS ve ark. Increased incidence of colorectal malignancies in renal transplant recipients: a case control study. *Am J Transplant* 2010; 10:2043.
47. Webster AC, Craig JC, Simpson JM, Jones MP ve ark. Identifying high risk groups and quantifying absolute risk of cancer after kidney transplantation: a cohort study of 15,183 recipients. *Am J Transplant* 2007; 7:2140.
48. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2015; 181:832.
49. Mills KT, Bellows CF, Hoffman AE, Kelly TN ve ark. Diabetes mellitus and colorectal cancer prognosis: a meta- analysis. *Dis Colon Rectum*. 2013; 56(11): 1304-19.
50. Yuhara H, Steinmaus C, Cohen SE, Corley DA ve ark. Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer? *Am J Gastroenterol* 2011; 106:1911.
51. Koenuma M, Yamori T, Tsuruo T. Insulin and insulin-like growth factor 1 stimulate proliferation of metastatic variants of colon carcinoma 26. *Jpn J Cancer Res* 1989; 80:51.
52. Dehal AN, Newton CC, Jacobs EJ, Patel AV ve ark. Impact of diabetes mellitus and insulin use on survival after colorectal cancer diagnosis: the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. *J Clin Oncol* 2012; 30:53.

53. Kim E, Coelho D, Blachier F. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutr Res* 2013; 33(12): 983-94.
54. MacLennan R, Macrae F, Bain C, Battistutta D ve ark. Randomized trial of intake of fat, fiber, and beta carotene to prevent colorectal adenomas. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1760.
55. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S ve ark. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2008; 300: 2765.
56. Pande M, Lynch PM, Hopper JL, Jenkins MA ve ark. Smoking and colorectal cancer in Lynch syndrome: results from the Colon Cancer Family Registry and the University of Texas MD Anderson Cancer Center. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1331.
57. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M ve ark. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol* 2011; 22: 1958.
58. Harnack L, Jacobs DR, Nicodemus K, Lazovich D ve ark. Relationship of folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. *Nutr Cancer* 2002; 43: 152.
59. Gillesen S, Templeton A, Marra G, Kuo YF ve ark. Risk of colorectal cancer in men on long-term androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 1760.
60. Lagergren J, Ye W, Ekblom A. Intestinal cancer after cholecystectomy: is bile involved in carcinogenesis? *Gastroenterology* 2001; 121: 542.
61. Tocchi A, Basso L, Costa G, Lepre L ve ark. Is there a causal connection between bile acids and colorectal cancer? *Surg Today* 1996; 26:101.
62. Chan AO, Jim MH, Lam KF, Moris JS ve ark. Prevalence of colorectal neoplasm among patients with newly diagnosed coronary artery disease. *JAMA* 2007; 298: 1412.
63. Stewart M, Macrae FA, Williams CB. Neoplasia and ureterosigmoidostomy: a colonoscopy survey. *Br J Surg* 1982; 69: 414.
64. Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE ve ark. Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1365.
65. Singh H, Nugent Z, Demers A, Czaykowski PM ve ark. Risk of colorectal cancer after diagnosis of endometrial cancer: a population-based study. *J Clin Oncol* 2013; 31: 2010.
66. Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Potter JD. Infectious agents and colorectal cancer: a review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC virus, and human papilloma-virus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 2970.

67. Huang MY, Huang CW, Wang JY. Surgical treatment following neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 2020; 36(3): 152-159.
68. Dayde D, Tanaka I, Jain R, Tai MC, Taguchi A. Predictive and prognostic molecular biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18(3): 573.
69. Oronsky B, Reid T, Larson C, Knox SJ. Locally advanced rectal cancer: The past, present, and future. In *Seminars in Oncology*. WB Saunders 2020.
70. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM ve ark. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(33): 5313–5327.
71. Shinto E, Hashiguchi Y, Ueno H, Kobayashi H ve ark. Pretreatment CD133 and cyclooxygenase-2 expression as the predictive markers of the pathological effect of chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *Dis Colon Rectum* 2011; 54(9): 1098-1106.
72. Esposito G, Pucciarelli S, Alaggio R, Giacomelli L ve ark. P27kip1 expression is associated with tumor response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(4): 311-318.
73. Drebber U, Madeja M, Odenthal M, Wedemeyer I ve ark. Beta-catenin and Her2/neu expression in rectal cancer: Association with histomorphological response to neoadjuvant therapy and prognosis. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26(9): 1127-1134.
74. Agostini M, Pucciarelli S, Enzo MV, Del Bianco P ve ark. Circulating cell-free DNA: A promising marker of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2011; 18(9): 2461-2468.
75. Moertel CG. Chemotherapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 330(16): 1136-1142.
76. Jakob C, Aust DE, Meyer W, Baretton GB ve ark. Thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, dihydro- pyrimidine dehydrogenase expression, and histological tumour regression after 5-FU-based neo-adjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer. *J Pathol* 2004; 204(5): 562-568.
77. Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 1998; 24(5): 331–344.

78. Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol Res* 2016; 106: 27-36.
79. Huang MY, Huang ML, Chen MJ, Lu CY ve ark. Multiple genetic polymorphisms in the prediction of clinical outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFOX- 4 chemotherapy. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21(1): 18-25.
80. Huang MY, Huang JJ, Huang CM, Lin CH ve ark. Relationship between expression of proteins ERCC1, ERCC2, and XRCC1 and clinical outcomes in patients with rectal cancer treated with FOLFOX-based preoperative chemoradiotherapy. *World J Surg.* 2017; 41(11): 2884-2897.
81. Poynter L, Galea D, Veselkov K, Mirnezami A ve ark. Network mapping of molecular biomarkers influencing radiation response in rectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer* 2019; 18(2): e210-e222.
82. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-21.
83. Wheatley SP, McNeish IA. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol* 2005; 247: 35-88.
84. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *The Indian Journal of Medical Research* 2015; 141(4): 389.
85. Tamm I, Want Y, Sausville E, Scudiero DA ve ark. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 59: 5315-20.
86. Altieri DC. Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 478-82.
87. Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL ve ark. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 1999; 59: 59-65.
88. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K ve ark. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402: 672-676.
89. Vega-Rubín-de-Celis S. The Role of Beclin 1-Dependent Autophagy in Cancer. *Biology* 2020; 9(1): 4.
90. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132: 27-42.

91. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R ve ark. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005; 122: 927-939.
92. Lee JW, Jeong EG, Lee SH, Yoo NJ ve ark. Somatic mutations of BECN1, an autophagy-related gene in human cancers. *APMIS* 2007; 115: 750-756.
93. Laddha SV, Ganesan S, Chan CS, White E. Mutational landscape of the essential autophagy gene BECN1 in human cancers. *Mol. Cancer Res* 2014; 12: 485-490.
94. Guillemin K, Krasnow MA. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* 1997; 89: 9-12.
95. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 721-732.
96. Poon E, Harris AL, Ashcroft M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2009; 11.
97. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC ve ark. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 2001; 93: 309-314.
98. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M ve ark. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Research* 1999; 59: 5830-5835.
99. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholis L ve ark. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94: 8104-8109.
100. Staab A, Loeffler J, Said HM, Diehlmann D ve ark. Effects of HIF-1 inhibition by chetomin on hypoxia-related transcription and radiosensitivity in HT 1080 human fibrosarcoma cells. *BMC Cancer* 2007; 7: 213.
101. Williams KJ, Telfer BA, Xenaki D, Sheridan MR ve ark. Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1. *Radiotherapy and Oncology* 2005; 75: 89-98.
102. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW ve ark. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 2004; 5: 429-441.

103. Moeller BJ, Dreher MR, Rabbani ZN, Schroeder T ve ark. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell* 2005; 8: 99-110.
104. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford S ve ark. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399: 271-275.
105. Briere JJ, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP, Rustin P. Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 2006; 291: C1114-1120.
106. Pollard PJ, Briere JJ, Alam NA, Barwell J ve ark. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Human Molecular Genetics* 2005; 14: 2231-2239.
107. Berra E, Pages G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer and Metastasis Reviews* 2000; 19: 139-145.
108. Karni R, Dor Y, Keshet E, Meyuhas O ve ark. Activated pp60c-Src leads to elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha expression under normoxia. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 42919-42925.
109. Lee BL, Kim WH, Jung J, Cho SJ ve ark. A hypoxia-independent up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 by AKT contributes to angiogenesis in human gastric cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29: 44-51.
110. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E ve ark. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Research* 2000; 60: 1541-1545.
111. Bardos JJ, Ashcroft M. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays* 2004; 26: 262-269.
112. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A ve ark. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes and Development* 2000; 14: 391-396.
113. Fillies T, Werkmeister R, van Diest PJ, Brandt B ve ark. HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer* 2005; 5: 84.
114. Pastorekova S, Gillies RJ. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: Links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews* 2019; 38(1-2): 65-77.

115. Pastorek J, Pastorekova S, Callebaut I, Mornon JP ve ark. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene* 1994; 9: 2877–2888.
116. Pastorekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran CT. Carbonic anhydrases: Current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2004; 19: 199-229.
117. Grabmaier K, Vissers JL, De Weijert MC, Oosterwijk-Wakka JC ve ark. Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Int J Cancer* 2000; 85(6): 865-870.
118. Csaderova L, Debreova M, Radvak P, Stano M ve ark. The effect of carbonic anhydrase IX on focal contacts during cell spreading and migration. *Frontiers in Physiology* 2013; 4: 271.
119. Svastova E, Zilka N, Zatovicova M, Gibadulinova A ve ark. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Experimental Cell Research* 2003; 290: 332-345.
120. van Kuijk SJ, Yaromina A, Houben R, Niemans R ve ark. Prognostic significance of carbonic anhydrase IX expression in cancer patients: A meta-analysis. *Frontiers in Oncology* 2016; 6: 69.
121. Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Onogawa S ve ark. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 105(2): 176-81.
122. Wu S, Sun C, Tian D, Li Y ve ark. Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(4): 3882-91.
123. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Rectal Cancer 2016. Available from: www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx.
124. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR ve ark. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer, 2017; 252-4.
125. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
126. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods* 2001; 25: 402-8.

- 127.Said HM, Staab A, Hagemann C, Vince GH ve ark. Distinct patterns of hypoxic expression of carbonic anhydrase IX (CA IX) in human malignant glioma cell lines. *Journal of Neuro-Oncology* 2007; 81(1): 27-38.
- 128.Kockar F, Yildirim H, Sagkan RI, Hagemann C ve ark. Hypoxia and cytokines regulate carbonic anhydrase 9 expression in hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World J Clin Oncol* 2012; 3(6):82-91.
- 129.Kalmar A, Wichmann B, Galamb O, Spisák S ve ark. Gene expression analysis of normal and colorectal cancer tissue samples from fresh frozen and matched formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) specimens after manual and automated RNA isolation. *Methods* 2013; 59(1): 16-9.
- 130.Gantt GA, Kalady MF. Molecular markers for targeted neoadjuvant rectal cancer therapy. *Colorectal Cancer* 2013; 2(4): 321-331.
- 131.Hektoen HH, Flatmark K, Andersson Y, Dueland S ve ark. Early increase in circulating carbonic anhydrase IX during neoadjuvant treatment predicts favourable outcome in locally advanced rectal cancer. *BMC Cancer* 2015; 15(1): 543.
- 132.Lin S, Lai H, Qin Y, Chen J ve ark. Thymidine phosphorylase and hypoxia-inducible factor 1- α expression in clinical stage II/III rectal cancer: association with response to neoadjuvant chemoradiation therapy and prognosis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015; 8(9): 10680.
- 133.Rasheed S, Harris AL, Tekkis PP, Turley H ve ark. Hypoxia-inducible factor-1 α and-2 α are expressed in most rectal cancers but only hypoxia-inducible factor-1 α is associated with prognosis. *British Journal of Cancer* 2009;100(10): 1666.
- 134.Toiyama Y, Inoue Y, Saigusa S, Okugawa Y ve ark. Gene expression profiles of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 with special reference to local responsiveness to neoadjuvant chemoradiotherapy and disease recurrence after rectal cancer surgery. *Clinical Oncology* 2010; 22(4): 272-280.
- 135.Shioya M, Takahashi T, Ishikawa H, Sakurai H ve ark. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α predicts clinical outcome after preoperative hyperthermo-chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Journal of Radiation Research*. 2011; 52(6): 821-827.
- 136.Horisberger K, Erben P, Ströbel P, Bohn B ve ark. Annexin and Survivin in locally advanced rectal cancer: indicators of resistance to preoperative chemoradiotherapy?. *Oncology Research and Treatment* 2010; 33(8-9): 439-444.

137. Kim K, Chie EK, Wu HG, Kim SG ve ark. High Survivin expression as a predictor of poor response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease* 2011; 26(8): 1019-1023.
138. Kim HJ, Bae SB, Jeong D, Kim ES ve ark. Upregulation of stromal cell-derived factor 1 α expression is associated with the resistance to neoadjuvant chemoradiotherapy of locally advanced rectal cancer: Angiogenic markers of neoadjuvant chemoradiation. *Oncology Reports* 2014; 32(6): 2493-2500.
139. Korkeila E, Jaakkola PM, Syrjänen K, Sundström J ve ark. Preoperative radiotherapy downregulates the nuclear expression of hypoxia-inducible factor-1 α in rectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45(3): 40-8.
140. Antonacopoulou AG, Floratou K, Bravou V, Kottorou A ve ark. The survivin -31 snp in human colorectal cancer correlates with survivin splice variant expression and improved overall survival. *Cell Oncol* 2011; 34: 381-91.
141. Gazouli M, Tzanakis N, Rallis G, Theodoropoulos G ve ark. Survivin -31G/C promoter polymorphism and sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 145-50.
142. Sprenger T, Rödel F, Beissbarth T, Conradi LC ve ark. Failure of downregulation of Survivin following neoadjuvant radiochemotherapy in rectal cancer is associated with distant metastases and shortened survival. *Clinical Cancer Research* 2011; 17(6): 1623-1631.
143. Wirawan E, Walle LV, Kersse K, Cornelis S ve ark. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death & Disease* 2010; 1(1): e18-e18.
144. Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *J Cancer* 2016; 7(3): 314-23.
145. Chen Y, Klionsky DJ . The regulation of autophagy- unanswered questions. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 2): 161-70.
146. Kaluz S, Kaluzová M, Liao SY, Lerman M ve ark. Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2009; 1795(2): 162-172.
147. Said HM, Safari R, Al-Kafaji G, Ernestus RI ve ark. Time-and oxygen-dependent expression and regulation of NDRG1 in human brain cancer cells. *Oncology Reports* 2017; 37(6): 3625-3634.

148. Aklilu M, Eng C. The current landscape of locally advanced rectal cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2011; 8(11): 649.
149. Ren DL, Li J, Yu HC, Peng SY ve ark. Nomograms for predicting pathological response to neoadjuvant treatments in patients with rectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 2019; 25(1): 118.
150. Suzuki N, Vojnovic N, Lee KL, Yang H ve ark. HIF-dependent and reversible nucleosome disassembly in hypoxia-inducible gene promoters. *Experimental Cell Research* 2018; 366: 181-191.
151. Kaluz S, Kaluzova M, Chrastina A, Olive PL ve ark. Lowered oxygen tension induces expression of the hypoxia marker MN/carbonic anhydrase IX in the absence of hypoxia inducible factor 1 alpha stabilization: A role for phosphatidylinositol 3'-kinase. *Cancer Research* 2002; 62: 4469-4477.
152. Ihnatko R, Kubes M, Takacova M, Sedlakova O ve ark. Extracellular acidosis elevates carbonic anhydrase IX in human glioblastoma cells via transcriptional modulation that does not depend on hypoxia. *International Journal of Oncology* 2006; 29: 1025-1033.
153. Rafajová, M, Zatovicová M, Kettmann R, Pastorek J ve ark. Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells. *International Journal of Oncology* 2004; 24: 995-1004.
154. Rohani N, Hao L, Alexis MS, Joughin BA ve ark. Acidification of tumor at stromal boundaries drives transcriptome alterations associated with aggressive phenotypes. *Cancer Research* 2019; 79: 1952–1966.

T. C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İzmir Kuzey Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi

EĞİTİM PLANLAMA VE KOORDİNASYON KURULU
KARARI

Karar Tarihi : 18/02/2016

Toplantı Sayısı : 3

Karar Sayısı : 15

Kurulumuz Hastane Yöneticisi / Başhekim Prof. Dr. Gökhan AKBULUT'un başkanlığında toplanmış olup;

Hastanemiz Tıbbi Biyokimya başasistanı,

Uzm. Dr. Fatma Demet İNCE'nin

yürütücülüğünü yaptığı “**Rektal Kanser Tedavi Etkinliğinin Takibinde Kullanılabilecek Aday Tümör Belirteçlerin Gen İfadelemesinin Araştırılması**” başlıklı Moleküler Tıp Anabilim Dalı doktora tez projesinin hastanemiz imkanları kullanılarak,

(Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği tarafından kolonoskopik incelemede rektum tümörü saptanmış, histopatolojik olarak rektal kanser tanısı doğrulanmış ve klinik olarak lokal ileri evre rektum kanseri olduğu belirlenmiş 40 hasta çalışmaya alınacaktır.

Genel Cerrah, Tıbbi Onkolog, Radyasyon Onkoloğu, Patolog ve Radyolog dahil multidisipliner bir ekibin oluşturduğu Cerrahi Onkoloji konsey tarafından National Comprehensive Cancer Network (NCCN) rehber alınarak neoadjuvan ve cerrahi tedavi protokolü uygulanacak hastaların çalışmaya katılımı sürdürülecektir. Çalışmaya dahil edilen hastaya herhangi bir ilaç tedavisi veya bir müdahale yapılmayacaktır. Çalışmanın hastanın tedavi protokolü üzerinde hiçbir etkisi yoktur. Bu süreçler hastanın normal takibi sırasında yapılmakta olup, çalışma hastaların klinik takibini etkilememekte ve çalışmanın bu süreçte bir rolü bulunmamaktadır.

Gönüllülerde veri toplama araçları ve analiz yöntemleri olarak hastaların rutin teşhis (biyopsi aşamasında) ve tedavi (tümör rezeksiyonu aşamasında) sürecinde alınan tümör dokusu ve hastaların hali hazırda tedavi sürecinde klinisyen hekim tarafından istenen rutin testler için alınan kan örnekleri kullanılacaktır. Çalışma için hastadan ayrıca ekstra bir materyal alınmayacaktır)

yapılmasının uygunluğuna,

Oy birliği ile karar verilmiştir.





DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÖĞRENME KAYNAKLARI MERKEZİ
ARAŞTIRMA LABORATUVARI-ARLAB

arlab

Sayı : 2016 /01

İzmir,29/01/2016

Konu: Uzm.Dr.Fatma Demet İNCE ARLAB kullanım izni

Sn.Uzm.Dr.Fatma Demet İNCE

"Rektal kanser tedavi etkinliğinin takibinde kullanılabilecek aday tümör belirteçlerin gen ifadelenmesinin araştırılması" isimli bilimsel çalışmanızda ARLAB'ı kullanma izni talebiniz olumlu karşılanmıştır.

Saygılarımla,

Prof.Dr.Gül AKDOĞAN
ARLAB Yöneticisi

Telefon : 0 - 232 – 412 46 75
Adres : İnciraltı 35340- İZMİR

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.- 549

13.07.2015

Sayın Uzm.Dr.Fatma Demet İNCE,

Kurulumuz tarafından 09.07.2015 tarih ve 2204-GOA protokol numaralı 2015/17-50 karar numarası ile görüşülen **"Rektal Kanser Tedavisi Sürecinin Etkinliğinin Takibinde Kullanılabilecek Belirli Aday Tümör Marker Genlerinin Gen İfadelenmesinin Araştırılması "** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2015/17-50	Tarih: 09.07.2015
	Uzm.Dr.Fatma Demet İNCE'nin sorumlusu olduğu “Rektal Kanser Tedavisi Sürecinin Etkinliğinin Takibinde Kullanılabilecek Belirli Aday Tümör Marker Genlerinin Gen İfadelenmesinin Araştırılması” isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.
Sayı : 25

11.01.2016

Sayın Uzm.Dr.Fatma Demet İNCE,

Kurulumuz tarafından 07.01.2016 tarih ve 2204-GOA protokol numaralı 2016/01-24 karar numarası ile görüşülen “**Rektal Kanser Tedavi Etkinliğinin Takibinde Kullanılabilecek Aday Tümör Belirteçlerin Gen İfadelenmesinin Araştırılması**” konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Ek: Etik Kurul Kararı

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/01-24	Tarih: 07.01.2016
	Uzm.Dr.Fatma Demet İNCE'nin sorumlusu olduğu "Rektal Kanser Tedavisi Sürecinin Etkinliğinin Takibinde Kullanılabilecek Belirli Aday Tümör Marker Genlerinin Gen İfadelenmesinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait araştırıcı dilekçesine ilişkin olarak; -Çalışma adının "Rektal Kanser Tedavi Etkinliğinin Takibinde Kullanılabilecek Aday Tümör Belirteçlerin Gen İfadelenmesinin Araştırılması" olarak değiştirilmesi, -Çalışmaya Biyolog Duygu Purcu Ünüvar , Radyolog Dilek Öncel, Biyoistatistik uzmanı Bülent Özkan'ın dahil edilmesi, -Araştırma yönteminde yapılan değişiklikler, - Çalışma laboratuvarı olarak, ARLAB Laboratuvarının eklenmesi, ile ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		



FATMA DEMET ARSLAN

Öğrenim Bilgileri

29 Ağustos 2014 - Şu Anda (6 yıl 6 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (DR)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.71 / 4.0

01 Ekim 2002 - 01 Kasım 2006 (4 yıl 2 ay)
Tıpta Uzmanlık, Anadal/Normal Öğretim, SAĞLIK BAKANLIĞI TÜRKİYE KAMU
HASTANELERİ KURUMU BAŞKANLIĞI İZMİR İLİ GÜNEY BÖLGESİ TÜRKİYE KAMU
HASTANE BİRLİĞİ GENEL SEKRETERLİĞİ İZMİR SAĞLIK BAKANLIĞI KATİP ÇELEBİ
ÜNİVERSİTESİ ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ, TÜRKİYE
Tez Başlığı: Genetik Risk Faktörlerinin Koroner Arter Hastalığı Şiddeti Üzerine Olan
Etkisi
Tez Konusu: Genetik Risk Faktörlerinin Koroner Arter Hastalığı Şiddeti Üzerine
Olan Etkisi
Tarih: 2006
Tez Danışmanı: MEHMET HİCRİ KÖSEOĞLU
Diploma Numarası: 2844

01 Eylül 1995 - 01 Nisan 2002 (6 yıl 8 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, GAZİ ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
TIP FAKÜLTESİ, TIP PR.

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Ocak 2013 - Şu Anda (8 yıl 2 ay) (Tam Zamanlı)
DANIŞMAN, DR., DİĞER (İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi)

01 Ocak 2011 - 01 Ocak 2013 (2 yıl 1 ay) (Tam Zamanlı)
DANIŞMAN, DİĞER (Özel Tarsus Medical Park Hastanesi)

01 Ocak 2008 - 01 Ocak 2011 (3 yıl 1 ay) (Tam Zamanlı)
DANIŞMAN, DİĞER (Aksaray Devlet Hastanesi)

01 Ocak 2006 - 01 Ocak 2008 (2 yıl 1 ay) (Tam Zamanlı)
DANIŞMAN, DİĞER (İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi)

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Anahtar Kelimeler

Antikanser İlaç Direnci
Doğumsal Metabolik Hastalıklar
Klinik ve Laboratuvar Çalışmaları
Moleküler Belirteçler
Analitik Yöntem Validasyonu
Kalite Yönetim Sistemleri
Spermatolojik Parametreler

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

F. D. ARSLAN, A. KOÇAK SEZGİN, C. AYDIN, E. E. PALA, D. ÖNCEL, A. G. DİNİZ ÜNLÜ, T. KAYA, L. UĞURLU, M. DEĞİRMENÇİ, B. ÖZKAN, Y. SOYSAL & H. M. SAİD, Evaluation of potential tumor markers that may predict neoadjuvant treatment efficiency in rectal cancer, Turkish Journal of Biochemistry, 2021, 1303-829X, -, -, -.

M. O. OZTAN, A. A. GOKMEN, F. D. ARSLAN, E. CAKİR, A. SAYAN, E. ABAY, S. KAYA & G. KOYLUOĞLU, Diagnostic Value of Serum Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor in Children With Acute Appendicitis, PEDIATRIC EMERGENCY CARE, 2020, 0749-5161, 36, 7, 332-337.

F. D. ARSLAN, I. KARAKOYUN, B. I. BASOK, H. SOLMAZ, M. Z. AKSİT, A. BAYSOY & C. DUMAN, Digoxin Levels and It's Stability in Different Blood Collection Tubes, JOURNAL OF ACADEMIC RESEARCH IN MEDICINE-JAREM, 2020, 2146-6505, 10, 2, 111-116.

C. TURK, M. CAMLAR, G. DİNİZ, F. D. ARSLAN, M. M. OREN & F. OZER, Effects of Lutein on Brain Damage and Vasospasm in an Experimental Subarachnoid Hemorrhage Model, WORLD NEUROSURGERY, 2020, 1878-8750, 143, E450-E455.

M. BARAN, Y. C. APPAK, F. D. ARSLAN, D. S. KAHRAMAN, M. KARAKOYUN, I. KARAKOYUN, B. EMİR & G. DİNİZ, Evaluation of the Relationship between Mucosal Diseases and Faecal Calprotectin Levels in Children who Underwent Upper Gastrointestinal System Endoscopy, JOURNAL OF PEDIATRIC RESEARCH, 2020, 2147-9445, 7, 3, 185-191.

I. KARAKOYUN, F. K. ISMAN, B. I. BASOK, F. D. ARSLAN, B. CALIK, N. G. KAHRAMAN, G. AKBULUT & C. ULASOĞLU, Serum Fetuin A and Secreted Phosphoprotein 24 as Diagnostic Markers in Inflammatory Bowel Disease, JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES, 2020, 2458-8938, 4, 3, 318-323.

C. YUCEL, E. E. YUCEL, F. D. ARSLAN, S. EKMEKÇİ, E. KİSA, V. ULKER, M. UCAR, Y. O. ILBEY, O. CELİK, B. I. BASOK & Z. KOZACIOĞLU, All-trans retinoic acid prevents cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, 2019, 0028-1298, 392, 2, 159-164.

M. O. OZTAN, F. D. ARSLAN, S. OZTAN, G. DİNİZ & G. KOYLUOĞLU, Effects of topical application of platelet-rich plasma on esophageal stricture and oxidative stress after caustic burn in rats: Is autologous treatment possible?, JOURNAL OF PEDIATRIC SURGERY, 2019, 0022-3468, 54, 7, 1397-1404.

C. YUCEL, F. D. ARSLAN, S. EKMEKÇİ, V. ULKER, E. KİSA, E. E. YUCEL, M. UCAR, Y. O. ILBEY, O. ÇELİK, B. İ. BASOK & Z. KOZACIOĞLU, Protective Effect of All-Trans Retinoic Acid in Cisplatin-Induced Testicular Damage in Rats, *WORLD JOURNAL OF MENS HEALTH*, 2019, 2287-4208, 37, 2, 249-256.

I. KARAKOYUN, C. DUMAN, F. D. ARSLAN, A. BAYSOY & B. İ. BASOK, Vitamin B12 and folic acid associated megaloblastic anemia: Could it mislead the diagnosis of breast cancer?, *INTERNATIONAL JOURNAL FOR VITAMIN AND NUTRITION RESEARCH*, 2019, 0300-9831, 89, 5-6, 255-260.

G. OZYURT, Y. OZTURK, Y. C. APPAK, F. D. ARSLAN, M. BARAN, I. KARAKOYUN, A. E. TUFAN & A. A. PEKCANLAR, Increased zonulin is associated with hyperactivity and social dysfunctions in children with attention deficit hyperactivity disorder, *COMPREHENSIVE PSYCHIATRY*, 2018, 0010-440X, 87, 138-142.

F. D. ARSLAN, İ. KARAKOYUN, A. BAYSOY, S. ONUR, B. İ. BAŞOK, A. ÇOLAK & C. DUMAN, Ischemia modified albumin levels in vitamin D deficiency, *International Journal of Medical Biochemistry*, 2018, 2587-2362, 1, 1, 6-10.

F. D. ARSLAN, I. KARAKOYUN, B. TATAR, E. E. PALA, M. YILDIRIM, C. ULASOGLU, C. DUMAN, H. AKAR, S. KOSE & B. İ. BASOK, SHFI: A Novel Noninvasive Predictive Model for Significant Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis B, *HEPATITIS MONTHLY*, 2018, 1735-143X, 18, 2.

F. D. ARSLAN, İ. KARAKOYUN, B. İ. BAŞOK, M. Z. AKŞİT, E. ÇELİK, K. DOĞAN & C. DUMAN, The Effects of Education and Training Given to Phlebotomists for Reducing Preanalytical Errors, *Journal of Medical Biochemistry*, 2018, 1452-8266, 37, 1-9.

F. D. ARSLAN, İ. FİGEN, M. KÖSEOĞLU, A. ATAY, A. GÖNEL & T. AYDIN, Şalgam Suyu Tüketiminin Serum Total Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi, *Klinik Tıp Aile Hekimliği Dergisi*, 2018, 1309-0461, 10, 1, 13-16.

F. DEMİRCİ, İ. KARAKOYUN, C. DUMAN, F. D. ARSLAN, D. ÖZBEK & D. KALENCİ, ?Reflex Test? Implementation on Thyroid Function Test Requests and Examination of the Effect on Health Expenditures, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2017, 1304-0790, 15, 2, 67-74.

E. TAŞKIRAN, M. Y. TAŞ, B. HIŞMİ, F. D. ARSLAN, S. EKMEKÇİ, D. K. SOLAKOĞLU & H. AKAR, A late diagnosis of alkaptonuria in an elderly patient, *EUROPEAN GERIATRIC MEDICINE*, 2017, 1878-7649, 8, 2, 178-180.

I. KARAKOYUN, A. COLAK, F. D. ARSLAN, A. G. HASTURK & C. DUMAN, Anemia considerations when assessing natriuretic peptide levels in ED patients, *AMERICAN JOURNAL OF EMERGENCY MEDICINE*, 2017, 0735-6757, 35, 11, 1677-1681.

A. KILIÇ, M. ÖZEN, O. EROL, H. Y. ELLİDAĞ, F. D. ARSLAN, E. EREN & N. Y. AZ, Effects of serum paraoxonase and paraoxonase phenotypic distribution on the parameters of first trimester screening, *BIOMEDICAL RESEARCH-INDIA*, 2017, 0970-938X, 28, 7, 3286-3292.

F. D. ARSLAN, M. KOSEOGU, A. ATAY, Y. YİĞİT, Y. AKCAY & E. SOZMEN, Evaluation of Postprandial Total Antioxidant Activity in Normal and Overweight Individuals, *JOURNAL OF CLINICAL AND ANALYTICAL MEDICINE*, 2017, 1309-0720, 8, 2, 134-137.

H. Y. ELLİDAĞ, O. AYDIN, E. EREN, N. YILMAZ, T. GENÇPINAR, S. KÜÇÜKSEYMEN, A. YILMAZ & F. D. ARSLAN, Phenotype distribution of the paraoxonase gene in patients with cardiac disease, *ARCHIVES OF MEDICAL SCIENCE*, 2017, 1734-1922, 13, 4, 820-826.

F. D. ARSLAN, M. Z. AKŞİT, M. D. KÖSE, Ö. İLHAN, A. HASTÜRK & F. İŞLETEN, Propionic Acidemia Accompanied by Hyperglycemia, Indian Journal of Applied Research, 2017, 2249-555X, 7, 10, 599-600.

F. D. ARSLAN, İ. KARAKOYUN, B. İ. BASOK, M. Z. AKŞİT, A. BAYSOY, Y. K. OZTURK, Y. A. GUCLU & C. DUMAN, The local clinical validation of a new lithium heparin tube with a barrier: BD Vacutainer (R) Barricor LH Plasma tube, BIOCHEMIA MEDICA, 2017, 1330-0962, 27, 3, 535-545.

İ. KARAKOYUN, A. ÇOLAK, F. D. ARSLAN, M. Z. AKŞİT & Ö. ÇAKMAK, An Example for Investigation of Unnecessary Laboratory Testing: Free PSA Test, İzmir Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi, 2016, 1305-7073, 27, 1, 47-51.

F. D. ARSLAN, P. BİLGİ, N. DOĞAN, E. M. ARI & L. DEMİR, Anormal coagulation test results in the pediatric patient without the bleeding: A case report, İzmir Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi, 2016, 1305-7073, 26, 2, 156-160.

F. D. ARSLAN, F. D. ARSLAN, M. SERDAR, M. SERDAR, E. M. ARI, E. M. ARI, M. O. OZTAN, M. O. OZTAN, S. H. KOZCU, S. H. KOZCU, H. TARHAN, H. TARHAN, O. ÇAKMAK, O. ÇAKMAK, M. ZEYİNLİ, M. ZEYİNLİ, H. Y. ELLİDAG & H. Y. ELLİDAG, Determination of Age-Dependent Reference Ranges for Coagulation Tests Performed Using Destiny Plus, IRANIAN JOURNAL OF PEDIATRICS, 2016, 2008-2142, 26, 3.

F. D. ARSLAN, H. Y. ELLİDAĞ, M. ZEYİNLİ, R. AVCI, D. ÖZBEK & E. M. ARI, Immunoturbidimetric and Electrochemiluminescence Methods for Ferritin Measurement, Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2016, 1304-0790, 14, 1, 51-57.

F. D. ARSLAN & İ. KARAKOYUN, Stability of PT and aPTT in Frozen Plasma, Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2016, 1304-0790, 14, 2, 87-93.

F. D. ARSLAN, M. H. KÖSEOĞLU, T. SEMERCİ & A. ATAY, The Effects of Walnut Consumption on Plasma Antioxidant Capacity, Asian Journal of Medical and Pharmaceutical Researches, 2016, 2322-4789, 6, 4, 41-45.

F. D. ARSLAN, B. ARSLAN, Y. C. KAPLAN & H. ELLİDAĞ, The Evaluation of Uncertainty for the Measurement of Blood Ethanol, Journal of Clinical and Analytical Medicine, 2016, 1309-0720, 7, 5, 648-651.

H. Y. ELLİDAG, H. Y. ELLİDAG, N. YILMAZ, N. YILMAZ, F. KURTULUS, F. KURTULUS, O. AYDIN, O. AYDIN, E. EREN, E. EREN, A. İNCİ, A. İNCİ, S. DOLU, S. DOLU, F. D. A. İNCE, F. D. A. İNCE, O. GİRAY, O. GİRAY, A. YAMAN & A. YAMAN, The Three Sisters of Fate in Multiple Sclerosis: Klotho (Clotho), Fibroblast Growth Factor-23 (Lachesis), and Vitamin D (Atropos), ANNALS OF NEUROSCIENCES, 2016, 0972-7531, 23, 3, 155-161.

F. D. ARSLAN, H. Y. ELLİDAĞ, M. KÖSEOĞLU, N. ŞİMŞEK, H. YALÇIN & M. O. ZENGİN, The comparison of automated urine analyzers with manual microscopic examination for urinalysis automated urine analyzers and manual urinalysis, Practical Laboratory Medicine, 2016, 23525517, 5, 14-20.

F. D. ARSLAN, A. ATAY, M. KÖSEOĞLU, H. Y. ELLİDAĞ, M. YEŞİL, M. YEŞİL & E. DEVECİ, The severity of coronary artery disease and methylenetetrahydrofolate reductase MTHFR enzyme gene polymorphism, International Cardiovascular Research Journal, 2016, 2251-9130, 10, 4, 172-178.

M. C. UĞUR, F. D. ARSLAN, H. DURAK, B. TOPRAK, B. BAYRAK, C. CEYLAN & H. AKAR, Trombositopenili hastalarda trombosit fonksiyon bozukluğunun klinik öneminin araştırılması, İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi, 2016, 2149-4401, 2, 1, 20-24.

A. KANİK, A. KANİK, M. BARAN, M. BARAN, F. D. INCE, F. D. INCE, O. CEBECİ, O. CEBECİ, M. BOZKURT, M. BOZKURT, D. CAVUSOĞLU, D. CAVUSOĞLU, K. ELİACIK, K. ELİACIK, O. YAVASCAN, O. YAVASCAN, M. HELVACI, M. HELVACI, N. AKSU & N. AKSU, Faecal calprotectin levels in children with Henoch-Schonlein purpura: is this a new marker for gastrointestinal involvement?, EUROPEAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY, 2015, 0954-691X, 27, 3, 254-258.

H. Y. ELLİDAG, H. Y. ELLİDAG, E. EREN, E. EREN, O. AYDİN, O. AYDİN, F. D. A. INCE, F. D. A. INCE, I. GOK, I. GOK, N. YILMAZ & N. YILMAZ, Comparison of Agilent 1100 (Chromsystems) and Tosoh HLC-723 G8 HPLC systems in thalassemia screening, TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY-TURK BIYOKIMYA DERGISI, 2014, 0250-4685, 39, 4, 544-548.

F. D. A. INCE, F. D. A. INCE, A. ATAY, A. ATAY, M. KOSEOGU, M. KOSEOGU, M. YESİL, M. YESİL, E. DEVECİ & E. DEVECİ, Relationship between severity of coronary artery disease and apolipoprotein E gene polymorphism, ANADOLU KARDIOLOJİ DERGISI-THE ANATOLIAN JOURNAL OF CARDIOLOGY, 2010, 1302-8723, 10, 3, 202-208.

B. A. ŞENTÜRK, F. ÜSTÜNER, E. AKGÖL, F. D. ARSLAN & M. CİRİT, Böbrek Hastalarında Proteinüri Göstergesi Olarak Spot İdrar Örneklerinde Protein Kreatinin Oranı, Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2008, 1304-0790, 6, 2, 59-63.

F. D. ARSLAN, M. KÖSEOĞLU, M. YEŞİL & E. DEVECİ, Koroner Arter Hastalığı Şiddeti ve Hemostatik Sisteme Ait Genetik Risk Faktörleri, İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi, 2008, 0000-0000, 46, 2, 85-92.

F. D. ARSLAN, B. A. ŞENTÜRK, H. ELLİDAĞ, S. KAP & F. ÜSTÜNER, Akut Miyokard Enfarktüs Tanısı İçin Serum Troponin I Eşik Değeri, Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2007, 1304-0790, 5, 2, 43-48.

F. D. ARSLAN, B. A. ŞENTÜRK, S. KAP, E. AKGÖL & F. ÜSTÜNER, Klinik Biyokimya Laboratuvarında Glukoz Parametresi İçin Ölçüm Belirsizliği Değerlendirilmesi, Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2007, 1304-0790, 5, 1, 1-5.

Bildiriler

F. D. ARSLAN, BECKMAN COULTER AU5800 VE ROCHE COBAS E601 ANALİZÖRLERİ İÇİN FERRİTİN DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI, Poster Sunumu, 27.ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ, 03 Kasım 2015, 03 Kasım 2015.

F. D. ARSLAN, DİABETİK KETOASİDOZU TAKLİT EDEN ERKEN BAŞLANGIŞLI PROPİYONİK ASİDEMİ, Sözlü Sunum, 27.ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ, 03 Kasım 2015, 03 Kasım 2015.

F. D. ARSLAN, KALP HASTALARINDA PAROKSONAZ GENİNİN FENOTİP DAĞILIMI, Poster Sunumu, 27.ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ, 03 Kasım 2015, 03 Kasım 2015.

F. D. ARSLAN, TAM OTOMATİK İDRAR ANALİZÖRLERİ İLE MANUEL İDRAR SEDİMENT İNCELEMESİNİN UYUMU, Poster Sunumu, 27.ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ, 03 Kasım 2015, 03 Kasım 2015.

F. D. ARSLAN, CAN I USE REFERENCE METHOD VALUES OF EQAS TO ESTIMATE MEASUREMENT UNCERTAINTY?, Poster Sunumu, V. INTERNATIONAL CONGRESS OF MOLECULAR MEDICINE, 19 Mayıs 2015, 19 Mayıs 2015.

F. D. ARSLAN, PROLACTIN HORMONE REFERENCE VALUE FOR WOMEN AGED BETWEEN 18-45 YEARS, Poster Sunumu, V. INTERNATIONAL CONGRESS OF MOLECULAR MEDICINE, 19 Mayıs 2015, 19 Mayıs 2015.

F. D. ARSLAN, THE VITAMIN D STATUS IN PATIENTS WITH NEOPLASIA, Poster Sunumu, V. INTERNATIONAL CONGRESS OF MOLECULAR MEDICINE, 19 Mayıs 2015, 19 Mayıs 2015.

F. D. ARSLAN, VERİFİKATION OF PRECISION PERFORMANCE FOR FOUR COAGULATION ASSAYS ON AMAX DESTİNY PLUS ANALYSER. , Poster Sunumu, V. INTERNATIONAL CONGRESS OF MOLECULER MEDİCİNE, 19 Mayıs 2015, 19 Mayıs 2015.

F. D. ARSLAN, YÜKSEK HEMATOKRİTLİ HASTADA PIHTILAŞMA TESTLERİNİN HESAPLANMASI; OLGU SUNUMU, Poster Sunumu, 15.ULUSAL KLİNİK BİYOKİMYA KONGRESİ, 23 Nisan 2015, 23 Nisan 2015.

F. D. ARSLAN, ETİYOLOJİSİNE GÖRE HİPONATREMİK YATAN HASTALARDA SODYUM KONSANTRASYONLARI, Poster Sunumu, KBUD ULUSLARARASI KATILIMLI KONGRE & LAB EXPO 2014, 16 Eylül 2014, 16 Eylül 2014.

F. D. ARSLAN, HEMOLYSIS EFFECT ON CARDİAC TROPONİN MEASUREMENT, Poster Sunumu, IFCC WORLD LAB İSTANBUL 2014, 22 Haziran 2014, 22 Haziran 2014.

F. D. ARSLAN, PREANALYTICAL ERRORS İN BLOOD COLLECTION UNİT, Poster Sunumu, IFCC WORLD LAB İSTANBUL 2014, 22 Haziran 2014, 22 Haziran 2014.

F. D. ARSLAN, THE VERİFİKATION OF TNI-ULTRA ON THE ADVIA CENTAUR CP SYSTEM İN ROUTİNE LABORATORY, Poster Sunumu, IFCC WORLD LAB İSTANBUL 2014, 22 Haziran 2014, 22 Haziran 2014.

F. D. ARSLAN, HENOCİ-SCHÖNLEİN PURPURALI ÇOCUKLARDA GASTROİNTESİNAL İNFLAMASYONU SAPTAMADA DIŞKI KALPROTEKTİN ÖLÇÜMÜ KULLANILABİLİR Mİ?, Poster Sunumu, 10. ULUSAL ÇOCUK GASTROENTROLOJİ, HEPATOLOJİ VE BESLENME KONGRESİ, 30 Nisan 2014, 30 Nisan 2014.

F. D. ARSLAN, KORONER ARTER SENDROMU OLMAYAN HASTALARDA ULTRA-TROPONİN I YÜKSEKLİĞİ, Poster Sunumu, 14.ULUSAL KLİNİK BİYOKİMYA KONGRESİ, 24 Nisan 2014, 24 Nisan 2014.

F. D. ARSLAN, KAN ALMA BİRİMİNDE MEMNUNİYET DÜZEYİ VE FARKINDALIĞIN ÖLÇÜLMESİ, Poster Sunumu, 5.TEPECİK ENFEKSİYON GÜNLERİ SEMPOZYUMU, 25 Ekim 2013, 25 Ekim 2013.

F. D. ARSLAN, PROTROMBİN ZAMANI VE AKTİVE PARŞİYEL TROMBOPLASTİN ZAMANI SONUÇLARI ÜZERİNE HEMOLİZİN ETKİSİ, Poster Sunumu, KBUD ULUSLARARASI KATILIMLI KONGRE & LAB EXPO 2013, 24 Eylül 2013, 24 Eylül 2013.

F. D. ARSLAN, SİKLOSPORİN, TAKROLİMUS VE SİROLİMUS TESTLERİNİN ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ, Poster Sunumu, KBUD ULUSLARARASI KATILIMLI KONGRE & LAB EXPO 2013, 24 Eylül 2013, 24 Eylül 2013.

F. D. ARSLAN, BÖBREK NAKLİ YAPILAN HASTALARDA HEMATOKRİT İLE TAKROLİMUS VE SİROLİMUS KAN DÜZEYLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ, Poster Sunumu, XXV.ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ, 03 Eylül 2013, 03 Eylül 2013.

F. D. ARSLAN, GÜNLERARASI DEĞİŞKENLİK KATSAYISI HESAPLAMADA ÇALIŞMA SAYISININ ÖNEMİ, Poster Sunumu, XXV.ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ, 03 Eylül 2013, 03 Eylül 2013.

F. D. ARSLAN, 25 OH VİTAMİN D3 İÇİN ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ, Poster Sunumu, KLİNİK BİYOKİMYA UZMANLARI DERNEĞİ 8.ULUSAL KONGRESİ, 18 Eylül 2012, 18 Eylül 2012.

F. D. ARSLAN, KORONER ARTER HASTALIĞINDA YÜKSEK DUYARLIKLİ C-REAKTİF PROTEİN: HASTALIĞIN YAYGINLIK VE ŞİDDETİ İLE İLİŞKİSİ, Poster Sunumu, XXII.

F. D. ARSLAN, KORONER ARTER HASTALIĞI ŞİDDETİ VE HEMOSTATİK SİSTEMLERE AİT GENETİK RİSK FAKTÖRLERİ, Poster Sunumu, 8.ULUSAL KLİNİK BİYOKİMYA KONGRESİ, 08 Mayıs 2008, 08 Mayıs 2008.

F. D. ARSLAN, KLİNİK BİYOKİMYA LABORATUVARINDA GLUKOZ PARAMETRESİ İÇİN ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ DEĞERLENDİRİLMESİ, Poster Sunumu, KLİNİK BİYOKİMYA UZMANLARI DERNEĞİ 4. ULUSAL KONGRESİ, 16 Ekim 2007, 16 Ekim 2007.

F. D. ARSLAN, KORONER ARTER HASTALIĞI ŞİDDETİ İLE APOLİPOPROTEİN E VE B-100 GEN POLİMORFİZM ARASINDAKİ İLİŞKİ, Poster Sunumu, KLİNİK BİYOKİMYA UZMANLARI DERNEĞİ 4.ULUSAL KONGRESİ, 16 Ekim 2007, 16 Ekim 2007.

F. D. ARSLAN, UNCERTAİNTY OF MEASUREMENT FOR TROPONİN I AND ACTİVİTY OF CREATİNE KİNASE-MB İN CLİNICAL CHEMİSTRY, Poster Sunumu, 11TH ASİAN PACİFİC CONGRESS OF CLİNICAL BİOCHEMİSTRY, 14 Ekim 2007, 14 Ekim 2007.

F. D. ARSLAN, UNCERTAİNTY OF MEASUREMENT FOR ETHANOL İN CLİNICAL CHEMİSTRY, Poster Sunumu, 15TH MEETİNG OF BALKAN CLİNICAL LABORATORY FEDERATİON, 04 Eylül 2007, 04 Eylül 2007.

F. D. ARSLAN, BÖBREK HASTALARINDA PROTEİNÜRİ GÖSTERGESİ OLARAK SPOT İDRAR ÖRNEKLERİNDE PROTEİN/KREATİNİN ORANI ÖLÇÜMÜ, Poster Sunumu, 7.ULUSAL KLİNİK BİYOKİMYA KONGRESİ, 19 Nisan 2007, 19 Nisan 2007.

F. D. ARSLAN, GÖĞÜS AĞRISIYLA GELEN HASTALARDA MYOKARD ENFARKTÜS İÇİN TROPONİN I CUT-OFF DEĞERİ, Poster Sunumu, 7.ULUSAL KLİNİK BİYOKİMYA KONGRESİ, 19 Nisan 2007, 19 Nisan 2007.

F. D. ARSLAN, SERUM VE PLAZMA D-DİMER DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI, Poster Sunumu, 7.ULUSAL KLİNİK BİYOKİMYA KONGRESİ, 19 Nisan 2007, 19 Nisan 2007.

F. D. ARSLAN, KORONER ARTER HASTALIĞINDA METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ ENZİM GEN POLİMORFİZMİNİN SERUM HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİ İLE OLAN İLİŞKİSİ, Poster Sunumu, 6.ULUSAL KLİNİK BİYOKİMYA KONGRESİ, 27 Nisan 2006, 27 Nisan 2006.

F. D. ARSLAN, EFFECT OF ASPIRİN SUPPLEMENTATİON ON THYROİD STİMULATİNG HORMONE TEST İN HEALTHY SUBJECTS, Poster Sunumu, XXIII.WORLD CONGRESS OF PATHOLOGY AND LABORATORY MEDİCİNE, 26 Mayıs 2005, 26 Mayıs 2005.

F. D. ARSLAN, INFLUENCE OF POSTPRANDİAL SERUM LİPİD ALTERATİONS ON COAGULATİON İN OBESE İNDİVİDUALS, Poster Sunumu, XXIII. WORLD CONGRESS OF PATHOLOGY AND LABORATORY MEDİCİNE, 26 Mayıs 2005, 26 Mayıs 2005.

F. D. ARSLAN, HEMOLİZİN BAZI HORMON PARAMETRELERİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİ, Poster Sunumu, 4.ULUSAL KLİNİK BİYOKİMYA KONGRESİ, 05 Eylül 2004, 05 Eylül 2004.

F. D. ARSLAN, AÇLIK KAN GLUKOZ DÜZEYİ NORMAL OLAN KİŞİLERDE OGTT VE HBA1C ARASINDAKİ İLİŞKİLER, Poster Sunumu, 3.ULUSAL KLİNİK BİYOKİMYA KONGRESİ, 30 Mart 2003, 30 Mart 2003.

Yönetilen Tezler

M. ZEYİTLİ AKŞİT (Tez Yazarı) , F. D. ARSLAN (Tez Danışmanı) , OBEZİTE CERRAHİSİNDE İNFLAMATUAR YANIT İLE SERUM GALEKTİN-3 DÜZEYİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ, TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ, TIP

Projeler

3001 - BAŞLANGIÇ AR-GE, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, REKTAL KANSER TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN TAKİBİNDE KULLANILABİLECEK ADAY TÜMÖR BELİRTEÇLERİN GEN İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: , 01 Temmuz 2016, 01 Temmuz 2018.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri**Proje Bilgileri**

116S255, Rektal Kanser Tedavi Etkinliğinin Takibinde Kullanılabilecek Aday Tümör Belirteçlerin Gen İfadelenmesinin Araştırılması, 3001 - Başlangıç AR-GE, Yürütücü, Sonuç raporu kabul, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.07.2016 - 01.01.2019, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.07.2016 - 01.01.2019.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

Research Article

Fatma Demet Arslan*, Ayse Kocak, Cengiz Aydın, Emel Ebru Pala, Dilek Oncel, Gulden Diniz, Tayfun Kaya, Levent Ugurlu, Mustafa Degirmenci, Bulent Ozkan, Yasemin Soysal and Harun Muayad Said



Evaluation of potential tumor markers that may predict neoadjuvant treatment efficiency in rectal cancer

Rektal kanserde neoadjuvan tedavi etkinliğini öngörebilecek potansiyel tümör belirteçlerinin değerlendirilmesi

<https://doi.org/10.1515/tjb-2020-0507>

Received January 28, 2020; accepted November 6, 2020;
published online January 5, 2021

Abstract

Objectives: The recurrence of rectal cancer or its resistance to neoadjuvant treatment develops due to the adaptation to hypoxia, apoptosis or autophagy. Survivin, one of the inhibitors of apoptosis; Beclin 1, which is a positive regulator in the autophagy pathway; and hypoxia-

inducible factor-1 α (HIF-1 α) and carbonic anhydrase-9 (CA9), which are associated with tumor tissue hypoxia, may be related to resistance to treatment. Our aim was to evaluate the potential tumor markers that may help to monitor the response to neoadjuvant treatment in locally advanced rectal cancer (RC).

Methods: Twenty-five patients with locally advanced RC were included in the study. Gene expression and protein levels of Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA9 were analyzed in fresh tissue specimens and blood samples. The relationships of these markers to tumor staging and regression grade were evaluated.

Results: Higher blood CA9 gene expression levels and lower blood HIF-1 α protein levels were found in the response group according to tumor regression grade. After neoadjuvant treatment, tissue Beclin 1 and blood Survivin gene expressions and tissue CA9, blood Beclin 1 and blood HIF-1 α protein levels decreased significantly.

Conclusion: Beclin 1, Survivin, HIF-1 α ve CA9 may help to predict the effects of the applied treatment approach.

Keywords: Beclin 1; carbonic anhydrase-9; hypoxia-inducible factor-1 alpha; neoadjuvant treatment; rectal cancer; Survivin.

Öz

Amaç: Rektal kanser nüksü veya neoadjuvan tedaviye direnci hipoksi, apoptoz veya otofajiye adaptasyona bağlı olarak gelişir. Apoptoz inhibitörlerinden biri olan Survivin, otofaji yolağında pozitif bir düzenleyici olan Beclin 1 ve

*Corresponding author: Fatma Demet Arslan, MD, Department of Medical Biochemistry, University of Health Sciences, Tepecik Training and Research Hospital, Gaziler Street, No: 468, 35180, Yenisehir, Izmir, Turkey, Phone: +90 5056468214, Fax: +90 2324330756, E-mail: fatmademet.arslan@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-0766-0303>

Ayşe Kocak, Yasemin Soysal and Harun Muayad Said, Department of Molecular Medicine, Institute of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey. <https://orcid.org/0000-0002-1510-2937> (A. Kocak). <https://orcid.org/0000-0002-7032-2668> (H.M. Said)

Cengiz Aydın, Tayfun Kaya and Levent Ugurlu, General Surgery Clinic, University of Health Sciences, Tepecik Training and Research Hospital, Izmir, Turkey

Emel Ebru Pala and Gulden Diniz, Medical Pathology Clinic, University of Health Sciences, Tepecik Training and Research Hospital, Izmir, Turkey. <https://orcid.org/0000-0003-1512-7584> (G. Diniz)

Dilek Oncel, Radiology Clinic, University of Health Sciences, Tepecik Training and Research Hospital, Izmir, Turkey

Mustafa Degirmenci, Oncology Clinic, University of Health Sciences, Tepecik Training and Research Hospital, Izmir, Turkey

Bulent Ozkan, Department of Biostatistics, Faculty of Medicine, Katip Celebi University, Izmir, Turkey

tümör doku hipoksisi ile ilişkili olan hipoksi ile indüklebilir faktör-1 α (HIF-1 α) ve karbonik anhidraz-9 (CA9), tedaviye direnç ile ilişkili olabilir. Amacımız lokal ileri evre rektal kanserde (RK) neoadjuvan tedaviye yanıtı izlemeye yardımcı olabilecek potansiyel tümör belirteçlerini değerlendirmektir.

Yöntemler: Çalışmaya lokal ileri evre RK'li 25 hasta dahil edildi. Beclin 1, Survivin, HIF-1 α ve CA9'un gen ekspresyonu ve protein seviyeleri, taze doku ve kan örneklerinde analiz edildi. Bu belirteçlerin tümör evresi ve regresyon derecesi ile ilişkileri değerlendirildi.

Bulgular: Tümör gerileme derecesine göre yanıt grubunda daha yüksek kan CA9 gen ekspresyon seviyeleri ve daha düşük kan HIF-1 α protein seviyeleri bulundu. Neoadjuvan tedaviden sonra, Beclin 1 dokusu ve kan Survivin gen ekspresyonları ve CA9 dokusu, kan Beclin 1 ve kan HIF-1 α protein seviyeleri önemli ölçüde azaldı.

Sonuç: Beclin 1, Survivin, HIF-1 α ve CA9 uygulanan tedavi yaklaşımının etkilerini tahmin etmeye yardımcı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Beclin 1; hipoksi ile indüklebilir faktör-1 alfa; karbonik anhidraz-9; neoadjuvan tedavi; rektal kanser; Survivin.

Introduction

Rectal cancer (RC) is one of the highest morbidity- and mortality-causing factors in humans worldwide [1]. Radical surgery is the main RC treatment approach, but neoadjuvant treatments can be considered as a complementary approach. After neoadjuvant treatment, 8–20% of RC patients had a complete response, 30–60% had a partial response, and the remainder had resistance to treatment [2, 3]. Cell death was the aim of these treatments. However, resistance to apoptosis is an important factor responsible for inadequate treatment and relapse in gastrointestinal oncology. There is a regulatory association between apoptosis and autophagy. Therefore, combined treatments that include apoptotic and autophagic mechanisms, have been investigated in order to overcome cell death resistance in RC [4–6].

Survivin, an inhibitor of the apoptosis family of genes, acts by blocking caspase activity. The Survivin gene has been found to be overexpressed in RC patients, thereby protecting the tumor cells from cell death and, as a consequence, indicating a poor prognosis [7, 8]. For this reason, Survivin is targeted during treatment. Survivin antisense oligonucleotides have been proven to effectively induce cell death in RC cells *in vitro* [9].

In addition to apoptosis inhibition, autophagy is also required for the survival of cancer cells. Autophagy

provides the ability to maintain life under hypoxic conditions [10]. Beclin 1 is induced in response to cellular stress and is a positive regulator in the autophagic pathway to sustain tumor cell survival. Beclin 1 suppression is another therapeutic goal for sensitizing RC cells to apoptosis [11]. Likewise, interaction between Beclin 1 and Survivin has been demonstrated; specifically, the Survivin protein expression decreased and its turnover increased when Beclin 1 was downregulated [12]. This relationship can explain the connection between autophagy and apoptosis.

Adaptation to hypoxia, such as autophagy, is one factor that enhances the ability of tumor cells to survive. Hypoxia is present in many tumor tissues due to structural and functional abnormalities in the vessels and rapid tumor cell proliferation. The tumor cannot grow more than 2 mm³ in the absence of angiogenesis. Hypoxia is an important triggering signal for angiogenesis induction, and most of the angiogenic factors regulated by hypoxia are under the control of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) [13, 14]. One of the genes in which HIF-1 α increases gene expression is carbonic anhydrase (CA9) [15]. It has been shown that the CA9 gene encodes CA9 protein and can be strongly induced by hypoxia in tumor cells [16]. CA9 gene expression is found to be high in rectal tumors, especially in high-proliferation areas [17], and it has been found to be an important prognostic factor [18].

Resistance to cancer treatment is an important clinical problem for RC patients. The determination of expression in key genes related to adaptation to hypoxia and the apoptotic–autophagic balance may be useful in predicting response to treatment in gastrointestinal cancers. There is a clinical need to establish molecular biomarkers to separate sensitive and resistant tumors. Such biomarkers can be used to predict the individual tumor response of the patient to multimodal therapy. However, there are very few studies investigating the association of Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA9 with response to neoadjuvant therapy in RC.

In this study, by analyzing both the gene expression and the protein levels of potential markers (Beclin 1, Survivin, HIF-1 α and CA9) that may be helpful in monitoring response to therapy in locally advanced RC patients, the relationship of these markers with tumor staging and regression grade has been investigated.

Materials and methods

A total of 25 patients with locally advanced RC were included in this study. Locally advanced RC (stage II/III) is defined as T3 or T4 rectal adenocarcinoma advanced with mesorectal invasion $\geq$ 5 mm, with or

without lymph node metastasis (within no more than 10 cm from the anal canal) or as T1 or T2 rectal adenocarcinoma with lymph node metastasis. Following the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines [19], the patients underwent surgical and neo-adjuvant treatment. Patients with T1 or T2 rectal adenocarcinoma without lymph node metastasis or with distant organ metastasis were excluded from the study.

The diagnosis of rectal adenocarcinoma was confirmed in patients by histopathological examination of colonoscopic biopsies. Lymph nodes and distant metastases were scanned by chest and abdominal computed tomography. Pre-operative clinical Tumor-Lymph Node-Metastasis (TNM) staging was assessed by physical examination, magnetic resonance imaging, and biopsy material according to the American Cancer Joint Committee (AJCC) guidelines [20]. Chemotherapy (capecitabine 1,650 mg/m²/day) protocol was applied simultaneously to external radiotherapy (50.4 Gy/28 fraction) for two months as neo-adjuvant therapy. Surgical resection was performed two months after radiochemotherapy. Response to the post-surgical neoadjuvant therapy was assessed according to the tumor regression grade in the AJCC guidelines [20]. Tumor regression was classified into four groups: (0) no residual tumor cells, (1) single cells or small groups of tumor cells, (2) residual cancer with desmoplastic response, and (3) minimal evidence of tumor response. Postoperative pathological TNM staging was performed according to the AJCC guidelines [20].

Tissue total mRNA and protein isolation and measurement

Tissues for molecular analysis were obtained from the endoscopic biopsies, and the tumor bed area of the resection specimens. Tumor tissues were stored at -80°C until total mRNA and protein isolation were performed. These tissues were homogenized by a mechanical homogenizer (TissueLyser LT, Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Total mRNA and protein were isolated from the tissue sample using an isolation reagent (TriPure Isolation Reagent, Roche Applied Science, Indianapolis, IN).

The total amount of mRNA obtained was evaluated with a micro-volume spectrophotometer (NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific, ME, USA) at a wavelength of 260 and 280 nm. If the A260/A280 absorbance ratio was 1.8–2.0, it was accepted as pure for mRNA. The total protein levels were measured by the bicinchoninic acid (BCA) method (BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific, IL, USA). The total protein levels were calculated as $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Blood total mRNA isolation

Blood samples were collected into tubes containing EDTA immediately after biopsy and surgery resection. Total mRNA isolation was performed using an mRNA isolation kit (QIAamp RNA Blood Mini Kit, Qiagen GmbH, Courtabeuf, France). mRNA purity measurements in blood samples were performed as in the tissue samples.

Tissue and blood Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA9 gene expression analysis

The following primers were used for the expression of tissue and blood Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA9 genes.

- HIF-1 α – Forward primer: ‘5-TTCCAGTTACGTTCTTCGATCA-3’
- HIF-1 α – Reverse primer: ‘5-TTTGAGGACTTGCGCTTTCA-3’
- CA9 – Forward primer: ‘5-TCTCGCTTGAAGAAATCGC-3’
- CA9 – Reverse primer: ‘5-CTGAAGTCAGAGGGCAGGAG-3’
- Beclin 1 – Forward primer: ‘5-GGCTGAGAGACTGGATCAGG-3’
- Beclin 1 – Reverse primer: ‘5-CTGCGTCTGGGCATAACG-3’
- Survivin – Forward primer: ‘5-AGAACTGGCCCTTCTGGAG-3’
- Survivin – Reverse primer: ‘5-CTTTTATGTTCTCTATGGGGTC-3’
- β -Actin – Forward primer: ‘5-CGGGGCCAATCAGCGT-3’
- β -Actin – Reverse primer: ‘5-GCCGCTGGGTTTATAGGG-3’

The guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method was used with TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) for mRNA isolation as described above, and cDNA was synthesized from the template mRNA using a cDNA synthesis kit (QuantiTect Reverse Transcription kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The β -Actin gene was selected as the housekeeping gene. Levels of mRNA were analyzed using the real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) method by a thermal cycler device and analysis software (Rotor Gene Q and Q-Rex Software, Qiagen, Valencia, CA, USA). The RT-qPCR cycle consisted of denaturation for 15 s at 95°C , annealing for 30 s at 53°C , and extension for 30 s at 72°C . Each cycle was repeated 40 times. The results were presented as the fold change (FC) of expression according to the delta delta cycle threshold ($\Delta\Delta\text{Ct}$) value [21]. These experiments were performed in triplicate.

Blood Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA9 protein level analysis

Blood samples were collected into tubes with a gel separator immediately after biopsy and surgical resection. Blood samples were centrifuged at 1,500 rpm for 10 min, and the separated serum was stored at -20°C until analysis. The serum Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA9 protein levels were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China). The intraassay and interassay coefficients of variation of the ELISA kits were $<8.0\%$ and $<10.0\%$, respectively. The assay ranges of the Beclin 1 (Catalog number E2011Hu), Survivin (Catalog number E1612Hu), HIF-1 α (Catalog number E0422Hu), and CA9 (Catalog number E2273Hu) kits were 0.2–60.0, 5.0–1,000.0, 0.05–15.0, 0.05–30.0 ng/mL, respectively. The analytical sensitivities of the Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA9 kits were 0.1, 2.49, 0.01, and 0.021 ng/mL, respectively. The results were presented as Beclin 1 levels ng/mL, Survivin levels ng/L, HIF-1 α levels ng/mL, and CA9 levels ng/mL. The ELISA experiments were performed in duplicate.

Tissue Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA9 protein level analysis

Tissue Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA9 protein levels were analyzed by the Western blot method. For this, a vertical electrophoresis system (Mini-PROTEAN[®] Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) with sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was used, and 30 μg protein per well was loaded in each well in SDS-PAGE. The wet transfer method was applied to transfer the proteins to the membrane. The blots were incubated overnight at 4°C with a 1:500 dilution of appropriate primary antibody

in 5% skim milk/tris-buffered saline with Tween. The antibodies used at these dilution rates were Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA9 polyclonal rabbit antibodies (Cell Signaling Technology Inc., MA, USA). After the primary incubation, the membranes were washed with tris-buffered saline with Tween; the blots were incubated at 1:1,000 with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated mouse anti-rabbit secondary antibody (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) at room temperature for 1 h. As a control for equal protein loading, the membranes were stripped and re-incubated overnight at 4 °C for 1:500 dilution with β -Actin primer antibody (Cell Signaling Technology Inc., MA, USA). Protein bands were detected using an enhanced chemiluminescence (Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore, MA, USA) kit for 20 min. Protein bands were visualized with chemiluminescence-sensitive X-ray film (Kodak MXB Film, Carestream Health Inc., Essex, UK). Protein band densities were evaluated using IMAGE-J Analysis Software (National Institute of Health, MD, USA). Data were quantified and normalized according to β -Actin (Cell Signaling Technology Inc., MA, USA). The results were presented as Beclin 1/ β -Actin, Survivin/ β -Actin, and CA9/ β -Actin ratios. These experiments were performed in triplicate, and the Western blotting images were presented as representative of one image.

Statistical evaluation

Data were evaluated using Microsoft Office Excel 2007 and Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Statistics 20.0. The tumor stage (T1, T2, T3, T4) or lymph node stage (N0, N1, N2) were determined during clinical staging. If there was regression by at least one stage during pathological staging, it was defined as downstaging. Tumor regression grades 0 and 1 were defined as the “response group”; 2 and 3 were defined as the “non-response group.” After tumor regression grading, the differences for gene expression and protein levels in blood and tissue samples between the two groups were analyzed by the Mann-Whitney test. The results were defined as median and 25th–75th percentile.

Blood and tissue samples taken after biopsy and surgical resection were considered as samples before and after neoadjuvant therapy, respectively. The differences in gene expression and protein levels in each patient’s blood and tissue before and after neoadjuvant therapy were evaluated by Wilcoxon test. The results were defined as median and 25th–75th percentile. The relationships between Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA in blood and tissue were analyzed using the Spearman correlation test. For all p values, <0.05 was considered statistically significant.

Results

The mean age $\pm$ standard deviation of the patients was 57.8 ± 10.4 . The gender of the patients was predominantly male (n=20, 80%). According to the tumor regression grade, the response group comprised 40% of the patients, and the non-response group, 60%. After neoadjuvant therapy, 36% of the patients had downstaging according to the T stage, and 72% of them had downstaging according to the N stage.

The differences between the response and non-response groups were investigated (Table 1) for gene expression and protein levels. Higher blood CA9 gene expression levels (p=0.013) and lower blood HIF-1 α protein levels (p=0.043) were found in the response group (Figure 1).

When the relationship between T or N downstaging and gene expression or protein levels was investigated, no statistically significant change was found in gene expression and protein levels in patients who had T or N downstaging.

Changes in gene expression and protein levels before and after neoadjuvant therapy were also investigated (Table 2). Tissue Beclin 1 (p=0.004) and blood Survivin gene expression (p=0.017) and tissue CA9 (p=0.021), blood Beclin 1 (p=0.030), and blood HIF-1 α (p=0.040) protein levels had statistically decreased after neoadjuvant therapy (Figure 2).

Positive correlations were found solely between CA9 and HIF-1 α (r=0.480, p=0.018) gene expression and between CA9 and Beclin 1 (r=0.664, p=0.003) gene expression in tissue. However, no similar association was found in blood samples. Interestingly, when the protein levels were examined, there was a negative relationship between Survivin and Beclin 1 in the tissue (r=−0.590, p=0.002), whereas a positive correlation was found between blood Survivin and HIF-1 α (r=0.722, p<0.001), between blood Survivin and CA9 (r=0.549, p=0.005) and between blood HIF-1 α and CA9 (r=0.753, p<0.001) (Table 3).

Discussion

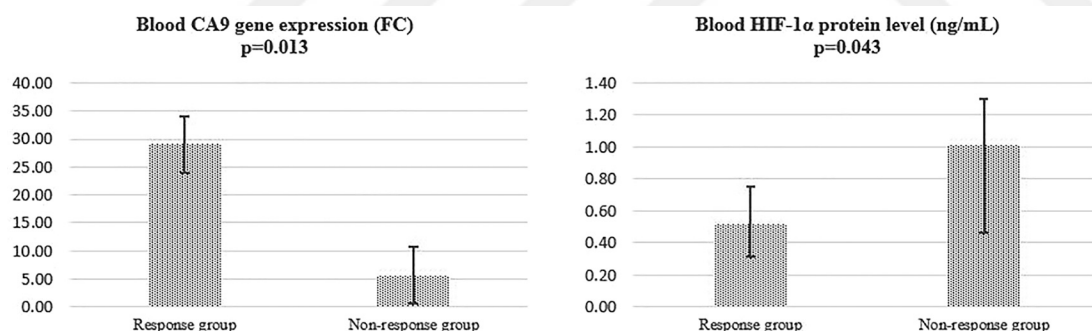
Although there are many studies about the role of tumor markers in predicting the response to neoadjuvant therapy in RC, there are few studies focusing on four different genes (Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA9). In our study, Survivin, an inhibitor of the apoptosis family; Beclin 1, a positive regulator of the autophagic pathway; and HIF-1 α and CA9, related to tumor tissue hypoxia, were investigated. All may be associated with mechanisms of resistance to treatment and response to treatment.

It is known that complete response rates of RC patients after neoadjuvant treatment are between 8 and 44%. Approximately 40% of patients experienced tumor downstaging [22]. In our study, according to the tumor regression grade, the response group was found to be 40% of RC patients. The percentage of those with T downstaging was 36%. Similar results previously published by other researchers support the effectiveness of applied neoadjuvant therapy [22].

Table 1: Gene expression and protein levels of Beclin 1, Survivin, HIF-1 α and CA9 according to tumor regression grade before neoadjuvant treatment.

n, %	Response group			Non-response group			p-Value
	10 (40%)			15 (60%)			
	25%	Median	75%	25%	Median	75%	
Gene expression							
Tissue Survivin (FC)	97.34	6,585.15	11,113.30	44.02	127.56	1,213.54	0.244
Tissue Beclin 1 (FC)	8,659.09	130,166.62	2,232,146.06	60.55	4,269.94	1,715,264.94	0.415
Tissue HIF-1α (FC)	279.17	515.56	35,119.87	45.57	278.20	14,664.09	1.000
Tissue CA9 (FC)	11.33	505.83	13,193.14	3.57	47.42	1,358.22	0.412
Blood Survivin (FC)	0.001	0.002	0.183	0.005	0.032	1.266	0.107
Blood Beclin 1 (FC)	0.22	21.41	107.78	0.75	19.97	359.54	0.881
Blood HIF-1α (FC)	0.000	0.006	0.039	0.001	0.012	2.505	0.302
Blood CA9 (FC)	13.93	29.04	10,734.74	0.02	5.62	16.45	0.013*
Protein levels	25%	Median	75%	25%	Median	75%	p-Value
Tissue Survivin	0.73	0.89	0.92	0.72	0.81	1.00	0.285
Tissue Beclin 1	1.44	1.55	1.69	1.09	1.26	1.56	0.849
Tissue HIF-1α	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
Tissue CA9	1.07	1.47	1.68	0.98	1.09	1.36	0.569
Blood Survivin, ng/L	52.69	69.50	97.63	66.51	88.76	138.74	0.121
Blood Beclin1, ng/mL	2.79	4.50	9.04	2.56	6.98	9.22	0.558
Blood HIF-1α, ng/mL	0.31	0.52	0.75	0.46	1.01	1.30	0.043*
Blood CA9, ng/mL	0.02	0.09	0.48	0.02	0.39	1.61	0.319

FC, Fold change; UD, Undetermined. *p-Value <0.05 was considered to be statistically significant. Tissue protein levels given as Beclin/ β -Aktin, Survivin/ β -Aktin, HIF-1 α / β -Aktin, CA9/ β -Aktin ratio.

**Figure 1:** CA9 gene expression and HIF-1 α protein levels in blood according to tumor regression grade before neoadjuvant treatment. The bars and error lines are presented as median and interquartile values.

According to our results, Beclin 1 and Survivin gene expression and protein levels in blood and tissue were not associated with tumor regression grade or T and N down-staging. However, the levels of CA9 gene expression in the blood were higher in the response group. In another study, a significant correlation was found between the increasing serum CA9 after neoadjuvant treatment chemotherapy and histological tumor stage. But the increase in serum CA9 were not correlated with histologic tumor regression score [23]. In our study, the high levels of CA9 gene expression in

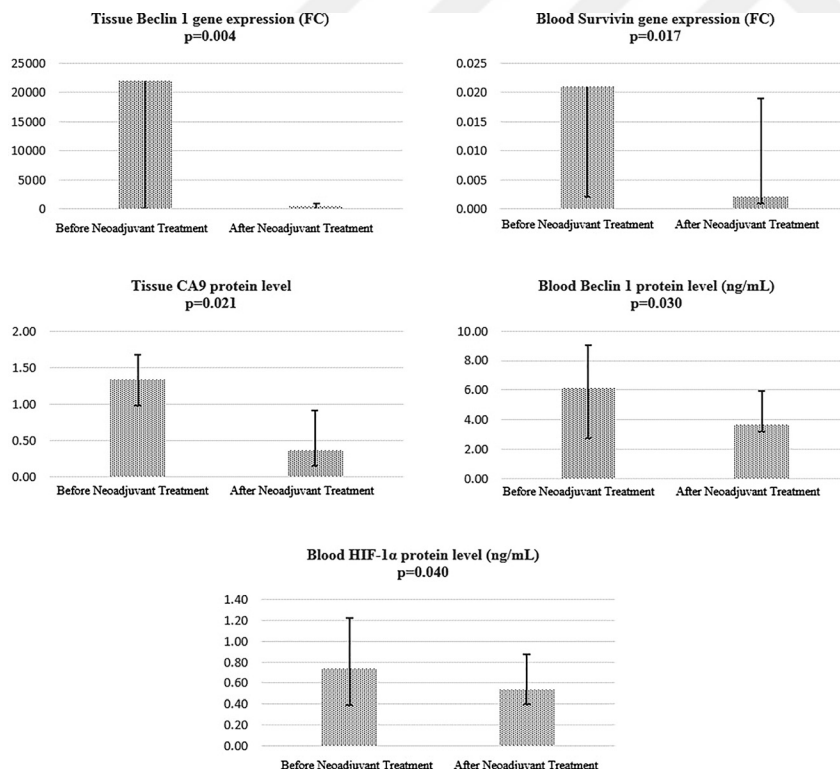
the blood before neoadjuvant treatment suggested that CA9 might be a marker for positive response to treatment.

The pre-treatment status of HIF-1 α has been found to predict pathological response and outcomes in clinical stage II/III RC [24]. Another study, which showed an independent relationship between HIF-1 α gene expression and poor response in advanced TNM stage RC, argued that HIF-1 α can supplement the currently used prognostic methods to better manage the disease treatment process [25]. It showed that HIF-1 α tissue gene expression in the response group was

Table 2: Beclin 1, Survivin, HIF-1 α and CA9 gene expression and protein levels before and after neoadjuvant therapy.

Gene expression	Before neoadjuvant therapy			After neoadjuvant therapy			p-Value
	25%	Median	75%	25%	Median	75%	
Tissue Survivin (FC)	49.21	180.39	8,404.31	9.98	88.44	421.18	0.244
Tissue Beclin 1 (FC)	102.89	21,920.61	1,715,264.94	0.75	27.89	873.10	0.004*
Tissue HIF-1 α (FC)	20.81	279.17	6454.48	145.99	1584.71	4,182.47	0.498
Tissue CA9 (FC)	3.21	25.68	956.83	5.22	86.07	429.84	0.639
Blood Survivin (FC)	0.002	0.021	0.948	0.001	0.002	0.019	0.017*
Blood Beclin 1 (FC)	0.23	19.97	107.78	0.02	0.30	39.35	0.189
Blood HIF-1 α (FC)	0.001	0.009	0.973	0.001	0.003	0.010	0.055
Blood CA9 (FC)	0.10	10.62	75.14	0.12	9.58	40.33	0.627
Protein levels	Before neoadjuvant therapy			After neoadjuvant therapy			p-Value
	25%	Median	75%	25%	Median	75%	
Tissue Survivin	0.67	0.89	1.02	0.91	0.94	1.06	0.543
Tissue Beclin 1	1.09	1.49	1.73	0.81	0.98	1.08	0.357
Tissue HIF-1 α	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
Tissue CA9	0.98	1.33	1.68	0.15	0.36	0.91	0.021*
Blood Survivin, ng/L	63.83	80.24	125.85	23.55	49.80	139.49	0.181
Blood Beclin 1, ng/mL	2.75	6.13	9.05	3.23	3.68	5.93	0.030*
Blood HIF-1 α , ng/mL	0.39	0.74	1.22	0.40	0.53	0.87	0.040*
Blood CA9, ng/mL	0.02	0.14	0.84	0.08	0.50	1.22	0.616

FC, Fold change; UD, Undetermined. *p-Value <0.05 was considered to be statistically significant. Tissue protein levels given as Beclin/ β -Actin, Survivin/ β -Actin, HIF-1 α / β -Actin, CA9/ β -Actin ratio.

**Figure 2:** Examined gene mRNA expression and protein level in tissue and blood before and after neoadjuvant treatment. The bars and error lines are presented as median and interquartile values.

significantly lower than in the non-response group, and it was thought that HIF-1 α gene expression might predict response to chemoradiation [26]. However, there are studies that do not find any significant difference between the

HIF-1 α -positive group and the HIF-1 α -negative group in terms of pathological staging [27]. In our study, low HIF-1 α protein levels in the response group suggested that blood HIF-1 α may play a role as a prognostic marker.

Table 3: The relation among Beclin 1, Survivin, HIF-1 α and CA9 in tissue and blood (correlation coefficient and p value).

Tissue gene expression	Survivin	HIF-1 α	CA9	Beclin 1
Survivin	1	−0.156 (0.456)	−0.101 (0.639)	0.021 (0.935)
HIF-1 α		1	0.480 (0.018)*	0.416 (0.086)
CA9			1	0.664 (0.003)*
Beclin 1				1
Blood gene expression	Survivin	HIF-1 α	CA9	Beclin 1
Survivin	1	0.105 (0.616)	0.025 (0.907)	−0.089 (0.678)
HIF-1 α		1	−0.356 (0.081)	−0.024 (0.913)
CA9			1	0.238 (0.262)
Beclin 1				1
Tissue protein levels	Survivin	HIF-1 α	CA9	Beclin 1
Survivin	1	UD	0.419 (0.228)	−0.590 (0.002)*
HIF-1 α		UD	UD	UD
CA9			1	0.006 (0.987)
Beclin 1				1
Blood protein levels	Survivin	HIF-1 α	CA9	Beclin 1
Survivin	1	0.722 (<0.001)*	0.549 (0.005)*	0.147 (0.493)
HIF-1 α		1	0.753 (<0.001)*	0.121 (0.572)
CA9			1	0.054 (0.802)
Beclin 1				1

UD, Undetermined. *p-Value <0.05 was considered to be statistically significant.

Similar to our findings, it has been shown that the gene expression levels of Survivin, which is another candidate marker in patients who underwent neoadjuvant therapy, did not correlate with downstaging [28]. However, some studies suggest that the stage of the tumor in tissue that had pre-treatment high Survivin gene expression levels regressed less after neoadjuvant therapy [29].

In a study that found a statistically significant relationship between the pre-treatment expression of Beclin 1 in cancer tissue and the tumor downstaging, Beclin 1 was thought to be a predictive biomarker for the efficacy of chemoradiotherapy in RC patients [11]. In our study, however, there was no significant change in Beclin 1 that could help predict the response to neoadjuvant therapy.

Our study determined that tissue Beclin 1 and blood Survivin gene expressions and tissue CA9, blood Beclin 1, and blood HIF-1 α protein levels decreased significantly after neoadjuvant therapy. This is the first known clinical study showing that the levels of tissue Beclin 1 and blood Survivin gene expression and tissue CA9, blood Beclin 1, and blood HIF-1 α protein levels have decreased with neoadjuvant treatment in locally advanced RC.

In a previous study, HIF-1 α protein expression in RC tissues was shown to decrease after neoadjuvant therapy [30]. While HIF-1 α gene expression was positive in most of the preoperative biopsies, Korkeila et al. determined that

HIF-1 α gene expression decreased in most of the post-operative samples [31]. In our study, it was remarkable that the levels of blood HIF-1 α protein decreased significantly, although there was no change in tissue and blood gene expression after neoadjuvant treatment.

Sprenger et al. found that tissue Survivin expression significantly decreased after neoadjuvant therapy in RC. They highlighted that Survivin gene expression may be an optimal prognostic marker for individual response monitoring and bears the potential for anti-Survivin strategies in future randomized clinical trials [32]. In the present study, although the Survivin gene expression level did not decrease in the tissue, its decrease in the blood after neoadjuvant treatment suggests that it be considered to function as a potential prognostic marker.

The present findings are significant for understanding the regulative crosstalk that occurs between the pathways during different physiological conditions in RC. While the unmodified forms of Beclin 1 function in autophagy, the C-terminal fragment of Beclin 1 (Beclin 1-C) after cleavage by caspase plays an important role in apoptosis. Survivin suppresses caspase 3, thereby decreasing apoptosis in cancer cells. It has been determined that the Survivin protein expression decreased and the turnover of Survivin protein increased by the downregulation of Beclin 1 [33, 34]. This position may explain the linkage between

autophagy and apoptosis. HIF-1 α directly binds to the promoter region of the CA9 and Survivin genes and functions as a transcriptional activator and upregulator [34–36]. Detecting a relationship between tissue HIF-1 α and CA9 gene expression, between blood HIF-1 α and CA9 protein levels, between tissue CA9 and Beclin 1 gene expression, and between blood Survivin with HIF-1 α and CA9 protein levels can explain the mechanism linking apoptosis, autophagy, and the adaptation to hypoxia.

The most important limitation of the current study is the inability to reach a sufficient number of targeted patients who complied with the inclusion criteria and the reluctance of patients to participate in the study. The gender distribution of the patients included in the study seems to be a disadvantage (male and female proportions were 80 and 20%, respectively). However, other studies have also stated that the rates of female and male patients were 29.3–42.5 and 57.5–70.7% in RC, respectively [37, 38]. Due to the epidemiological nature of RC, our data was thought to reflect the distribution in the local population.

In addition, tissue HIF-1 α protein levels could not be analyzed, despite many optimization studies. Previous studies have shown that HIF-1 α can only be expressed in a hypoxic environment, whereas CA9 is expressed in normoxic environments under certain physiological and regulative conditions. However, the expression of CA9 in a hypoxic environment increased in parallel with HIF-1 α [39, 40], and while tissue CA9 protein levels can be detected, the reason why tissue HIF-1 α protein levels cannot be determined could be related to post-transcriptional regulations and the dynamic physiological condition of hypoxia within the targeted RC tissue that was reflected in the expression pattern of the RC tissue.

In this study, the gene expression and protein expression levels of the same molecules in the same samples (blood and tissue) were not consistent with each other. The reason for this may be that gene expression is regulated in various steps and that the various processes involved in this arrangement are integrated. For example, miRNAs and siRNAs in cells are complementary to the regulation of target mRNAs and protein levels. Furthermore, transcription factor binding sites and chromatin modifications are affected by transcriptional control in the different organisms and physiological conditions.

Conclusion

Our study found a statistically significant relationship between blood levels of CA9 gene expression and HIF-1 α protein and response to treatment, and it also found that

tissue Beclin 1 and blood Survivin gene expression and tissue CA9, blood Beclin 1, and blood HIF-1 α protein levels were reduced after neoadjuvant therapy. Therefore, these markers may be useful in prognosis and in predicting the selection or efficacy of the applied treatment regimen. Unnecessary surgical indications of patients with complete response to treatment by gene expression or protein level analysis examined before and after neoadjuvant therapy may be prevented.

Thus, the optimization of treatment methods can be accomplished by the application or development of new treatment strategies that have fewer or no harmful side effects. This can be a preliminary study for further studies on distant metastasis and survival. Cost effectiveness can be increased by applying personalized treatment.

Due to the limitations of our study, further studies with larger numbers of patients and more homogeneous gender distribution might be necessary. Beclin 1, Survivin, HIF-1 α , and CA9 candidate markers may also be promising in treatment management in other tumor types developing due to different physiopathological reasons.

Research funding: The present study was funded by a grant from the Scientific and Technological Research Council of Turkey with the number 116S225.

Author contributions: All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

Competing interests: The authors declare that they have no conflict of interest with the content of the manuscript. Funding entities have no influence on the type or content of study.

Ethical considerations: Detailed information was given to all participants about the study before their participation, and their signed consents were obtained. This original research study was performed in accordance with the Helsinki Declaration and with the approval of Izmir Dokuz Eylul University's Ethics Committee.

References

1. Hawk ET, Linburg PJ, Viner JL. Epidemiology and prevention of colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 2002;82:905–41.
2. Buroker T, Nigro N, Correa J, Vaitkevicius VK, Samson M, Considine B. Combination preoperative radiation and chemotherapy in adeno-carcinoma of the rectum: preliminary report. *Dis Colon Rectum* 1979;19:660–3.
3. Minsky BD, Cohen AM, Kemeny N, Enker WE, Kelsen DP, Saltz L, et al. Efficacy of preoperative 5-FU, high dose leucovorin, and sequential radiation therapy for unresectable rectal cancer. *Cancer* 1994;73:273–80.

4. Tian M, Wan Y, Tang J, Li H, Yu G, Zhu J, et al. Depletion of tissue factor suppresses hepatic metastasis and tumor growth in colorectal cancer via the downregulation of MMPs and the induction of autophagy and apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2011;12: 896–907.
5. Yang WL, Perillo W, Liou D, Marambaud P, Wang P. AMPK inhibitor compound C suppresses cell proliferation by induction of apoptosis and autophagy in human colorectal cancer cells. *J Surg Oncol* 2012;106:680–8.
6. Raina K, Agarwal C, Wadhwa R, Serkova NJ, Agarwal R. Energy deprivation by silibinin in colorectal cancer cells: a double-edged sword targeting both apoptotic and autophagic machineries. *Autophagy* 2013;9:697–713.
7. Hernandez JM, Farma JM, Coppola D, Hakam A, Fulp WJ, Chen DT, et al. Expression of the antiapoptotic protein Survivin in colon cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2011;10:188–93.
8. Thomas AW, Pablo EV, Nikolas HS, Wolfram TK. Prognostic and clinicopathological significance of Survivin in colorectal cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e65338.
9. Yao H, Huang ZH, Li Z, Su GQ, He R, Gao F, et al. Specific killing effects of combination of recombinant adenovirus containing double suicide gene driven by KDR promoter and Survivin antisense oligonucleotide on colorectal cancer cells and vascular endothelial cells. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Zazhi* 2008;11:61–6.
10. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Canc Cell* 2006;10: 51–64.
11. Zaanen A, Park JM, Tougeron D, Huang S, Wu TT, Foster NR, et al. Association of Beclin 1 expression with response to neoadjuvant chemoradiation therapy in patients with locally advanced rectal carcinoma. *Int J Canc* 2015;137:1498–502.
12. Niu TK, Cheng Y, Ren X, Yang JM. Interaction of Beclin 1 with Survivin regulates sensitivity of human glioma cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett* 2010;584:3519–24.
13. Harris A. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Canc* 2002;2:38–47.
14. Semenza G. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Canc* 2003;3:721–32.
15. Opavsky R, Pastorekova S, Zelnik V, Gibadulinova A, Stanbridge E, Zavada J, et al. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* 1996;33:480–7.
16. Wykoff C, Beasley N, Watson P, Turner K, Pastorek J, Sibtain A, et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2002;60:7075–83.
17. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila A, Haukipuro K, Pastorekova S, Pastorek J, et al. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol* 1998;153:279–85.
18. Korkeila E, Talvinen K, Jaakkola PM, Minn H, Syrjänen K, Sundström J, et al. Expression of carbonic anhydrase IX suggests poor outcome in rectal cancer. *Br J Canc* 2009;100:874–80.
19. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Rectal Cancer; 2016. Available from: www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx.
20. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th ed. New York, NY: Springer; 2017: 252–4 pp.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods* 2001;25:402–8.
22. Gantt GA, Kalady MF. Molecular markers for targeted neoadjuvant rectal cancer therapy. *Colorectal Canc* 2013;2:321–31.
23. Hektoen HH, Flatmark K, Andersson Y, Dueland S, Redalen KR, Ree AH. Early increase in circulating carbonic anhydrase IX during neoadjuvant treatment predicts favourable outcome in locally advanced rectal cancer. *BMC Canc* 2015;15:543.
24. Lin S, Lai H, Qin Y, Chen J, Lin Y. Thymidine phosphorylase and hypoxia-inducible factor 1- α expression in clinical stage II/III rectal cancer: association with response to neoadjuvant chemoradiation therapy and prognosis. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8:10680.
25. Rasheed S, Harris AL, Tekkis PP, Turley H, Silver A, McDonald PJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α are expressed in most rectal cancers but only hypoxia-inducible factor-1 α is associated with prognosis. *Br J Canc* 2009; 18:101:742.
26. Toiyama Y, Inoue Y, Saigusa S, Okugawa Y, Yokoe T, Tanaka K, et al. Gene expression profiles of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 with special reference to local responsiveness to neoadjuvant chemoradiotherapy and disease recurrence after rectal cancer surgery. *Clin Oncol* 2010; 22:272–80.
27. Shioya M, Takahashi T, Ishikawa H, Sakurai H, Ebara T, Suzuki Y, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α predicts clinical outcome after preoperative hyperthermo-chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *J Radiat Res* 2011;52:821–7.
28. Horisberger K, Erben P, Ströbel P, Bohn B, Hahn M, Kähler G, et al. Annexin and Survivin in locally advanced rectal cancer: indicators of resistance to preoperative chemoradiotherapy? *Oncol Res Treat* 2010;33:439–44.
29. Kim K, Chie EK, Wu HG, Kim SG, Lee SH, Kang GH, et al. High Survivin expression as a predictor of poor response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2011;26:1019–23.
30. Kim HJ, Bae SB, Jeong D, Kim ES, Kim CN, Park DG, et al. Upregulation of stromal cell-derived factor 1 α expression is associated with the resistance to neoadjuvant chemoradiotherapy of locally advanced rectal cancer: angiogenic markers of neoadjuvant chemoradiation. *Oncol Rep* 2014;32: 2493–500.
31. Korkeila E, Jaakkola PM, Syrjänen K, Sundström J, Pyrhönen S. Preoperative radiotherapy downregulates the nuclear expression of hypoxia-inducible factor-1 α in rectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:40–8.
32. Sprenger T, Rödel F, Beissbarth T, Conradi LC, Rothe H, Homayounfar K, et al. Failure of downregulation of Survivin following neoadjuvant radiochemotherapy in rectal cancer is associated with distant metastases and shortened survival. *Clin Canc Res* 2011;17:1623–31.

33. Chen Y, Klionsky DJ. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci* 2011;124:161–70.
34. Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W. Survivin and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *J Canc* 2016;7: 314–23.
35. Said HM, Supuran CT, Hageman C, Staab A, Polat B, Katzer A, et al. Active modulation of hypoxia induced human brain cancer regulative gene carbonic anhydrase 9 (CA9). *Curr Pharmaceut Des* 2010;16:3288–99.
36. Said HM, Safari R, Al-Kafaji G, Ernestus RI, Löhr M, Katzer A, et al. Time-and oxygen-dependent expression and regulation of NDRG1 in human brain cancer cells. *Oncol Rep* 2017;37: 3625–34.
37. Aklilu M, Eng C. The current landscape of locally advanced rectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:649.
38. Ren DL, Li J, Yu HC, Peng SY, Lin WD, Wang XL, et al. Nomograms for predicting pathological response to neoadjuvant treatments in patients with rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2019;25:118.
39. Said HM, Staab A, Hagemann C, Vince GH, Katzer A, Flentje M, et al. Distinct patterns of hypoxic expression of carbonic anhydrase IX (CA IX) in human malignant glioma cell lines. *J Neuro Oncol* 2007;81:27–38.
40. Kockar F, Yildirim H, Sagkan RI, Hagemann C, Soysal Y, Anacker J, et al. Hypoxia and cytokines regulate carbonic anhydrase 9 expression in hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World J Clin Oncol* 2012;3:82–91.

