

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

MERAM TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**ÜLSERATİF KOLİTLİ VE KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA
TELOMERAZ AKTİVASYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

DR. TUĞBA AKIN DUMAN

UZMANLIK TEZİ

KONYA,2017

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**ÜLSERATİF KOLİTLİ VE KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA
TELOMERAZ AKTİVASYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Dr. TUĞBA AKIN DUMAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: PROF. DR. MAHMUT SELMAN YILDIRIM

KONYA,2017

TEŞEKKÜR

Tez aşamasında ve uzmanlık eğitimim sürecinde her türlü desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM' a ; asistanlık eğitimimde büyük emeği olan Doç.Dr.Ayşe Gül Zamani' ye ve bu süreçte desteğini her zaman hissettiğim Yrd.Doç.Dr. Mine Balasar ile diğer öğretim üyelerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezime katkılarından dolayı Prof.Dr.Hüseyin ATASEVEN , Doç.Dr.Murat ÇAKIR ile tezimin istatistik değerlendirmesini yapan ve bu süreçte yanımda olan sevgili eşim Dr.Alparslan DUMAN'a teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Daima yanımda olan ve beni her zaman destekleyen canım annem, babam ve kardeşime, varlığı ve sevgisiyle bana güç veren oğlum Ömer Talha'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

MAYIS 2017

Dr.Tuğba AKIN DUMAN

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 151518021 proje numarası ile desteklenmiştir.

ÖZET

ÜLSERATİF KOLİTLİ VE KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA TELOMERAZ AKTİVASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Dr. TUĞBA AKIN DUMAN, UZMANLIK TEZİ , KONYA-2017

Amaç: Ülseratif kolit , kolorektal kanser gelişimi açısından risk artışına neden olan ve dünya genelinde sıklığı giderek artan bir hastalıktır. Kolorektal kanserler ise dünyada en sık görülen üçüncü ve hem erkek hem de kadınlarda maligniteler içinde ölüme neden olan ikinci kanserdir. Çalışmamızda ülseratif kolit inflame dokusu, kolorektal tümör dokusu ve normal kolon mukozasında telomeraz aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ve Gastroenteroloji Kliniklerine başvuran , kolorektal tümör ya da ülseratif kolit tanısı alan hastalardan tümör dokusu, inflame doku ve normal kolon dokusundan biyopsi örneği alındı. TRAPeZe yöntemi (Merck Millipore TRAPeZe Kit RT Telomeraz saptama kiti (S7710)) kullanılarak telomeraz aktivitesi kantitatif olarak değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmamızda ülseratif kolit, kolorektal tümör dokusu ve normal kolon mukozası şeklinde 3 grup karşılaştırıldığında telomeraz aktivitesinde farklılık olduğu gözlemlendi. Daha sonra gerçekleştirilen ikili karşılaştırmalarda ülseratif kolit ile normal doku arasında telomeraz aktivitesi yönünden istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilemezken, kolorektal kanserli dokularda komşu normal mukozaya göre istatistiksel olarak telomeraz aktivitesinin artmış olduğu saptandı.

Sonuç: TRAPeZe yöntemi ile telomeraz aktivitesi kolorektal kanser, ülseratif kolit ve normal dokuda değerlendirildiğinde, kolorektal kanser ile normal doku arasında farklılık olduğu saptanmış, ancak ülseratif kolit ile normal doku arasında bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda telomeraz aktivitesinin kolorektal kanser açısından premalign bir durum olan ülseratif kolit olgularında kansere gidişi değerlendirmek açısından kullanışlı bir marker değilken kolorektal kanser için kullanılabilir bir marker olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler : telomeraz, kolorektal kanser, ülseratif kolit

ABSTRACT

INVESTIGATION OF TELOMERASE ACTIVATION IN ULCERATIVE COLITIS AND COLORECTAL CANCER PATIENTS

Dr. TUĞBA AKIN DUMAN, UZMANLIK TEZİ , KONYA-2017

Aim: Ulcerative colitis is an increasingly prevalent disease worldwide that increases the risk of developing colorectal cancer. On the other hand colorectal cancer is the third most common malignancy in the world and the second cause of cancer death in both men and women. In our study, it was aimed to evaluate telomerase activity in ulcerative colitis inflamed tissue, colorectal tumor tissue and normal colon mucosa.

Method: A biopsy was taken from tumor tissue, inflamed tissue and normal colon tissue (99 samples) from patients who were admitted to the Necmettin Erbakan University Meram Medical Faculty General Surgery and Gastroenterology clinics with colorectal tumor or ulcerative colitis. Telomerase activity was quantitatively assessed by using the TRAPeze method (Merck Millipore TRAPeze Kit RT Telomerase detection kit (S7710)).

Findings: In our study, we observed a difference in telomerase activity when 3 groups were compared as ulcerative colitis, colorectal tumor tissue and normal colon mucosa. Later, bilateral comparisons revealed no statistically significant difference between ulcerative colitis and normal tissue in terms of telomerase activity, but increased telomerase activity in colorectal cancer tissues was found statistically significant relative to neighboring normal mucosa.

Results: Telomerase activity in colorectal cancer, ulcerative colitis and normal tissue was assessed by TRAPEZE method and it was found that there was difference between colorectal cancer and normal tissue, but no difference between ulcerative colitis and normal tissue. These results suggest that telomerase activity may not be a useful marker for evaluating the development of cancer in patients with ulcerative colitis, a premalignant condition for colorectal cancer but may be useful marker for colorectal cancer

Keywords: telomerase, colorectal cancer, ulcerative colitis

İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TABLOLAR.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
SİMGE VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. ÜLSERATİF KOLİT.....	3
2.1.1. Tanım.....	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	3
2.1.3. Etyoloji.....	3
2.1.3.1. Çevresel Faktörler	3
2.1.3.2. Mikrobiyal faktörler	4
2.1.3.3. Psikolojik faktörler.....	5
2.1.3.4. İmmün faktörler.....	5
2.1.3.5. Genetik faktörler.....	6
2.1.4. Klinik Bulgular ve Tanı.....	9
2.1.5. Ülseratif Kolit ve Kolorektal Kanseri Gelişimi.....	9
2.2. KOLOREKTAL KANSER.....	11
2.2.1. Epidemiyoloji.....	11
2.2.2. Etyoloji.....	12
2.2.2.1. Çevresel faktörler.....	12
2.2.2.2. Kişisel Özellikler, Yaşam Biçimi ve Alışkanlıklar.....	12
2.2.2.3. Klinik Risk Faktörleri.....	13

2.2.3. Klinik Özellikler ve Tanı.....	13
2.2.4. Kolorektal Kanser ve Genetik.....	14
2.3. TELOMER.....	16
2.3.1. Telomerlerin Yapısı.....	17
2.3.2. Telomerlerin Özellikleri.....	22
2.3.3. Uç Replikasyon Problemi.....	25
2.4. TELOMERAZ ENZİMİ.....	27
2.4.1. Telomerazın Yapısı ve Fonksiyonu.....	28
2.4.2. Telomeraz İlişkili Proteinler.....	30
2.5. KANSER VE TELOMERAZ.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Araştırmanın Tipi.....	36
3.2. Araştırma Bölgesi ve Zamanı.....	36
3.3. Araştırma Evreni ve Yeri.....	36
3.4. Örneklem Seçme Kriterleri.....	36
3.5. Çalışma Gruplarının Randomizasyonu.....	37
3.6. Araştırma Öncesi Bilgilendirme	37
3.7. Araştırmanın İzni ve Etik Durum.....	37
3.8. Telomeraz Aktivitesini Belirlemede Kullanılan Yöntemler.....	38
3.8.1. Telomerik Tekrar Amplifikasyon Yöntemi (TRAP).....	38
3.8.2. TRAP-eze ELISA Yöntemi.....	39
3.8.3. Floresan-TRAP Yöntemi.....	39
3.8.4. Stretch-PCR Yöntemi.....	39
3.8.5. PicoGreen Yöntemi.....	40
3.8.6. Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi	40
3.8.7. Transkripsiyon Aracılı Amplifikasyon ve Hibridizasyon Koruma Yöntemi (TMA/HPA Yöntemi)	40
3.8.8. TRAP-eze Yöntemi.....	40

3.9. Doku Özütlelerinin Hazırlanması.....	41
3.10. DNA Standardının Hazırlanması.....	42
3.11. Pozitif Kontrol Örneğinin Hazırlanması.....	43
3.12. RealTime PCR yönteminin uygulanması.....	43
3.13. İstatistiksel Analiz	47
4.BULGULAR.....	48
5. TARTIŞMA.....	58
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
7.KAYNAKLAR.....	70
Ek1-Hasta Onam Formu	
EK2-Etik Kurul Kararı	
EK3-Etik Kurul Kararı	

TABLÖLER

Tablo 2.1. Kolorektal karsinogenezisde hücre içi moleküler lezyonlar.....	16
Tablo 2.2. Telomere bağlanan diğer proteinler.....	21
Tablo 2.3. İnsanlarda telomerazla ilişkili proteinler.....	31
Tablo 3.1. DNA standart eğrisinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarı.....	42
Tablo 3.2. Master mixlerin hazırlanışı.....	43
Tablo 3.3. Çalışma dizaynı	45
Tablo 3.4. PCR programı.....	47
Tablo 4.1. Ülser doku ile komşu normal dokuların ortalama Cp değerleri	49
Tablo 4.2. Pankolit ve normal dokuların ortalama Cp değerleri.....	51
Tablo 4.3. Pankolit ve diğer ülseratif kolitli dokuların ortalama Cp değerleri.....	51
Tablo 4.4. Kolorektal kanserli hastalara ait cinsiyet, yaş, tümör yerleşim yeri ve tümörün histolojik tipi.....	52-53
Tablo 4.5. Kolorektal kanser dokusu ile komşu normal mukozanın ortalama Cp değerleri.....	53
Tablo 4.6. Tümör yerleşim bölgesi ve ortalama Cp değerleri arasındaki ilişki.....	55
Tablo 4.7. Kolon tümörlerinin yerleşim yerleri ile Cp değerleri arasındaki ilişki.....	56
Tablo 4.8. KRK ile ÜK dokusunun ortalama Cp değerleri.....	57

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. İnflamatuar bağırsak hastalığı olan insan karyotipindeki duyarlılık lokusları....	7
Şekil 2.2. İnflamatuar bağırsak hastalığı lokusları	8
Şekil 2.3. Vogelstein ve Fearon tarafından tanımlanan kolorektal karsinogeneziste adenom-karsinom ardışıklığı.....	14
Şekil 2.4. Kolit-ilişkili KRK ve sporadik KRK 'daki moleküler değişiklikler	16
Şekil 2.5. İnsan telomerlerinde T loop ve D loop yapısı	17
Şekil 2.6. Telomer yapısı ve shelterin kompleksi	20
Şekil 2.7. G-tetrad ve G4 DNA Yapısı.....	22
Şekil 2.8. G-quadruplex yapısı	22
Şekil 2.9. Telomer Yapısı	24
Şekil 2.10. Kromozomlarda telomer bölgelerinin yeri	24
Şekil 2.11. DNA Replikasyonu.....	26
Şekil 2.12. Telomer kısalması ve hücre yaşlanma.....	27
Şekil 2.13. Telomeraz proteinin yapısı.....	29
Şekil 2.14. Tetrahymena'da telomerin uzama mekanizması.....	30
Şekil 2.15. Hücre yaşlanma ve ölümsüzlük.....	32
Şekil 2.16. Kanserli hücrelerde telomeraz aktivitesi ve ölümsüzlük.....	34
Şekil 2.17. Kanser tedavisinde telomeraz inhibitörleri.....	34
Şekil 3.1. TRAP yönteminin uygulanışı.....	38
Şekil 3.2. Roche Magna Lyser Green Bead.....	42
Şekil 3.3. Isı-döngü cihazı (Primus 96 plus , MWG AG Biotech, Almanya)	46
Şekil 3.4. Biosan LMC 3000 santrifüj cihazı.....	46
Şekil 3.5. LightCycler ® 480 (Roche).....	46
Şekil 3.6. Plate'in cihaza yüklenmesi.....	46
Şekil 4.1. 3 dokunun ortalama Cp değerleri.....	48
Şekil 4.2. ÜK ve komşu normal dokunun ortalama Cp değerleri.....	49
Şekil 4.3. ÜK olgularında inflame doku örneklerinin Cp değerleri.....	50
Şekil 4.4. ÜK olgularında normal mukoza örneklerinin Cp değerleri.....	50

Şekil 4.5. KKK ve komşu normal mukozanın ortalama Cp değerleri.....	54
Şekil 4.6. KKK olgularında tümörlü doku örneklerinin Cp değerleri.....	54
Şekil 4.7. KKK olgularında komşu normal mukoza örneklerinin Cp değerleri.....	55
Şekil 4.8. Tümör yerleşim yeri ile telomeraz aktivitesi arasındaki ilişki.....	56
Şekil 4.9. Tümörlü doku ve ÜK inflame dokuların Cp değerleri.....	57



SİMGELER ve KISALTMALAR

APC:	Adenomatosis poliposis geni
ATM:	Ataksi telenjipektazi mutated
bp:	Baz çifti
BT:	Bilgisayarlı tomografi
CH:	Crohn hastalığı
D loop:	Displasement loop
ECM1:	Ekstrasellüler matriks protein 1
G:	Guanin
HLA:	Human Lökosit Antijen
hTERT:	İnsan telomeraz ters transkriptaz
hTR/ hTER:	İnsan telomeraz RNA
İBH:	İnflamatuvar bağırsak hastalığı
kb:	Kilobaz
KRK:	Kolorektal kanser
M1:	Mortalite Evresi 1
M2:	Mortalite Evresi 2
MR:	Manyetik rezonans
NK:	Naturel killer hücreleri
nm :	Nanometre
nt:	Nükleotid
PARPs:	Poly (ADP-riboz) polimerazlar
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
POT1:	Protection of telomeres protein 1
PSK:	Primer sklerozan kolanjit
RAP1:	Repressor/ activator protein 1
RT:	Ters transkriptaz
snoRNP:	Küçük ribonükleoprotein kompleksi

T loop:	Telomerik loop
T:	Timin
TEP 1:	Telomeraz ilişkili protein 1
TIN2:	TRF1-interacting protein 2
TMA/HPA:	Transkripsiyon Aracılı Amplifikasyon ve Hibridizasyon Koruma
TPP1:	POT1-interacting protein
TRAP:	Telomerik tekrar amplifikasyon protokolü
TRF1:	Telomeric repeat binding factor 1
TRF2:	Telomeric repeat binding factor 2
Ü:	Ünite
ÜK:	Ülseratif kolit

1. GİRİŞ

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarından birisi olan ülseratif kolit; rektumu da içine alan, genellikle kolon proksimali boyunca uzanan, kronik, tekrarlayıcı bir durumdur. Hastalığın kesin patogenezi bilinmemekle beraber genetik faktörler, çevresel maruziyet ve bağışıklık yanıtının etkileşimi sorumlu tutulmuştur . Dünya genelinde 5 milyondan fazla insanın etkilendiği bilinmektedir. Ülseratif kolit , kolorektal kanser gelişimi açısından risk artışına neden olan bir durumdur. Bu hastaların kolorektal kanser gelişimi için riskleri normal popülasyona göre 2.4 kat artmıştır. Son zamanlarda yapılan bir metaanalize göre, ülseratif kolit hastalarının kümülatif şekilde olası kolorektal kanser geliştirme riski 10 yılda %2, 20 yılda %8 ve 30 yılda %18 dir.

Kolorektal kanserler ise dünyada en sık görülen üçüncü ve hem erkek hem de kadınlarda maligniteler içinde ölüme neden olan ikinci kanserdir. Türkiye' de kolorektal kanser insidansı erkeklerde dördüncü, kadınlarda beşinci sırada yer almaktadır. Her yıl 6000 civarında yeni vakanın görüldüğü tahmin edilmektedir.

Kolorektal kanserler farklı moleküler yollara sahip heterojen kompleks bir hastalıktır. Çeşitli genetik ve epigenetik olayların gözlemlendiği çok aşamalı bir süreç sonrası meydana gelmesi karakteristiktir. Kolorektal kanserlerin çoğunda gözlenen kromozomal instabilitenin karsinogenez sürecinde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir.

Telomer/telomeraz ise kromozom stabilitesinin sağlanmasında rol alan önemli mekanizmalardan birisidir. Kromozomların ucunda bulunan ve kromozomları DNA bozunmaları ile uç uca füzyonlardan koruyarak kromozomların stabilizasyonu için gerekli olan özelleşmiş DNA yapıları olan telomerler, DNA polimerazın kromozomların 3' ucunu tamamıyla replike edememesinden kaynaklanan DNA uçlarındaki dizilerin replikasyon bağımlı kaybı nedeniyle her hücre bölünmesinde devamlı şekilde kısalmaktadır. Ancak hücre bölünmesiyle ilişkili telomer kısalması; sınırsız hücre çoğalmasını ve böylelikle de tümör gelişimini önlemektedir. Çoğu tümör sonsuz büyüme yeteneğini, uygunsuz telomeraz ekspresyonu üzerinden sağlar. Bir kanserde mutlaka gerekli olan sınırsız hücre büyümesi için telomeraz aktivasyonu gereklidir. Özellikle kanserli hücrelerde telomeraz aktivitesi artmışken, çoğu normal hücrede sessiz kalmaktadır.

Çeşitli insan kanserlerinde hem in vivo, hem in vitro olarak telomeraz aktivitesi ve tümör malignitesi arasında güçlü bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Dünya çapında

çeşitli laboratuvarlarda yapılan çalışmalarda insan kanserlerinin %80-90' ında telomerazın aktif olduğu gözlenmiştir.

Sporadik kolon kanseri ve kolitle ilişkili kolorektal kanser arasında mikrosatellit instabilitesi, DNA metilasyonu ve sonunda p53 ün heterozigosite kaybını içeren genetik yolda benzerlikler vardır. Önceki çalışmalarda telomeraz aktivitesinin komşu kanserli olmayan mukozaya göre kolorektal kanserlerde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İlâveten bazı premalign dokularda telomerazın aktive olduğu saptanmıştır. Bu bilgiler bize, kolorektal kanser gelişimi bakımından riskli olan ülseratif kolit hastalığında da benzer şekilde telomeraz aktivitesinde değışiklik olabileceğini düşündürmektedir. Böyle bir değışikliğin bulunması durumunda ise, telomeraz aktivitesinin değerlendirilmesinin, ülseratif kolit hastalarında kolorektal kanser gelişimi açısından bir marker olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Yapacağımız çalışma ile normal kolon mukozası, ülseratif kolitli hastalardan ve kolorektal kanserden alınan dokular arasındaki telomeraz aktivitesi karşılaştırılarak ülseratif kolitli hastalardaki premalign lezyonlarda telomeraz aktivitesi açısından bir benzerlik olup olmadığının saptanması ve premalign lezyonların kansere dönüşmesinin hücresel düzeydeki önemini vurgulamak amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. ÜLSERATİF KOLİT

2.1.1. Tanım

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarından birisi olan ülseratif kolit (ÜK), kolonun kronik, tekrarlayıcı, kontrolsüz inflamasyonu ile giden ve rektumu da içine alacak şekilde kolonun proksimaline doğru yayılım gösteren bir hastalıktır (Kaya 2012).

2.1.2. Epidemiyoloji

ÜK epidemiyolojisinde dünya genelinde coğrafik bölgeler arasında ve aynı coğrafik bölge içinde dahi belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Endüstrileşmenin yaygın olduğu toplumlarda daha sık gözlenmektedir. En yüksek insidans Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika 'da izlenmektedir. Ancak başta Asya ve Doğu Avrupa gibi daha az görüldüğü bölgeler olmak üzere dünya genelinde insidansı giderek artmaktadır. ÜK insidansı Avrupa'da yıllık 0,9-24/100.000, prevalansı ise 2,4-294/100.000'dir (Burisch 2015).

Ülkemizde ÜK prevalansı 79/1.000 olarak bildirilmiştir (Kalkan 2013).

2.1.3. Etyoloji

ÜK etyopatogenezi henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte ; genetik yatkınlık, bakteriyel antijenler, çevresel faktörler, immün cevap bozukluğu gibi çeşitli etkenlerin rol oynadığı literatürde bildirilmektedir.

2.1.3.1. Çevresel Faktörler

Son on yılda, dikkate değer bir şekilde Batı ülkelerinde diyetin yüksek yağ ve karbonhidrat ağırlıklı olarak şekillendiği bilinmektedir. Bu durumun bazı kronik hastalıklardaki artışın nedeni olabileceği ifade edilmektedir. Yüksek doymuş veya doymamış katı ve sıvı yağ içerikli yiyecekler, şeker / tatlandırıcılar, fastfood tarzı beslenmenin ÜK gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Hastaların %86' sı alkollü içecekler, soda, kahve ve fazla baharatlı yiyeceklerin relapsları tetiklediğini söylemektedir. Buna karşılık sebze ve meyve tüketimi ise koruyucudur. Koruyucu olduğu bilinen bir diğer besin ise anne sütüdür. Anne sütü

mikrobiyal flora ve besin antijenlerine karşı oral tolerans gelişimindeki etkisi sayesinde ÜK gelişimini önleyebildiği düşünülmektedir.

ÜK ile ilişkili iyi tanımlanmış bir diğer çevresel faktör ise sigaradır. Aktif sigara içen bireyler, hiç sigara kullanmayan ya da eskiden kullanmış bireylerle karşılaştırıldığında aktif içicilerde ÜK gelişiminin daha az olduğu gösterilmiştir. Ancak pasif içicilik koruyucu değildir.

2008 yılında yapılmış bir metaanaliz, ÜK ile oral kontraseptif ilaç kullanımı arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra çocukluk çağında antibiyotik kullanımının enterik bakterilere karşı tolerans gelişiminin normal sürecini etkileyerek ÜK gelişimine yol açabileceği ileri sürülmektedir. Felder ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları vaka-kontrol çalışmasında nonsteroid antiinflamatuvar ilaç kullanımı ile ÜK gelişimi arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

10 yaş öncesi çocuklarda apandisit nedeniyle gerçekleştirilen apendektomi ile ÜK gelişimi arasında negatif bir ilişki saptanmıştır. Çeşitli metaanalizlerde apendektomi sonrası ÜK gelişme riskinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Molodecky 2010; Annahazi 2014).

2.1.3.2.Mikrobiyal faktörler

15.000- 36.000' den fazla çeşitli bakteri, virüs, bakteriofaj ve mantarın yer aldığı bağırsak mikrobiyal florası ÜK patogeneğinde yer alan ana komponentlerdendir. Farklı veriler ÜK 'de bu mikrobiyal florada değişikliklerin olduğunu göstermektedir (Annahazi 2014) .

Hastalığın patogeneğinde rol oynayan çeşitli bakteriler (kızamık, mikobacterium paratüberkülozis) ve viral ajanlar ileri sürülmekle birlikte spesifik enfeksiyona ait herhangi bir bulgu tespit edilememiştir (Oktay 2001).

ÜK hastalarının operasyon örneklerinin normal kontrollerle karşılaştırıldığı bir çalışmada, bu hastalarda Bacteroidetes ve Lachnospiraceae gibi gastrointestinal yararlı bakterilerin azaldığı bulunmuştur. Diğer bir çalışmada ise ÜK hastalarının rektal biyopsi örneklerinde Clostridia ve E.coli deki artışa paralel olarak yararlı bakterilerden Bifidobakterin azaldığı gösterilmiştir (Annahazi 2014).

23 çalışmalık bir meta-analizde ise H.pylori enfeksiyonunun ÜK ile negatif ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. H.pylori enfeksiyonu regülatör T hücre fonksiyonlarında yer alan genlerin ekspresyonunu arttırarak kolit gelişimine karşı koruyucu olabilmektedir. Ancak ÜK hastalarındaki azalmış H. Pylori kolonizasyonu , H.pylori eradikasyonu oluşturabilen antibiyotik ve meselamin kullanıma sekonder de gerçekleşebilmektedir (Molodecky 2010).

2.1.3.3 Psikolojik faktörler

ÜK ‘nin arka planında yatan psikojenik faktörler önemli bir diğer konudur. Aşırı bağımlılık, immatür duygusal reaksiyonlar ve aşırı sorumluluk üzerinde durulması gereken kişilik bozukluklarıdır (Warren 1948).

Uzun süreli duygusal gerilimler ve stresin ÜK hastalarında relapsları şiddetlendirdiğini gösteren çalışmalar da vardır (Levenstein 2000; Bitton 2003).

2.1.3.4 İmmün faktörler

Mukozal immün sistemin disfonksiyonu inflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogeneğinde önemli bir yere sahiptir. Çeşitli inflamatuvar hücreler arasında mukozal CD4+T hücrelerin proinflamatuvar sitokinleri üreterek kronik inflamasyonun indüksiyonunda ve devamlılığında merkezi rol oynadığı düşünülmektedir.

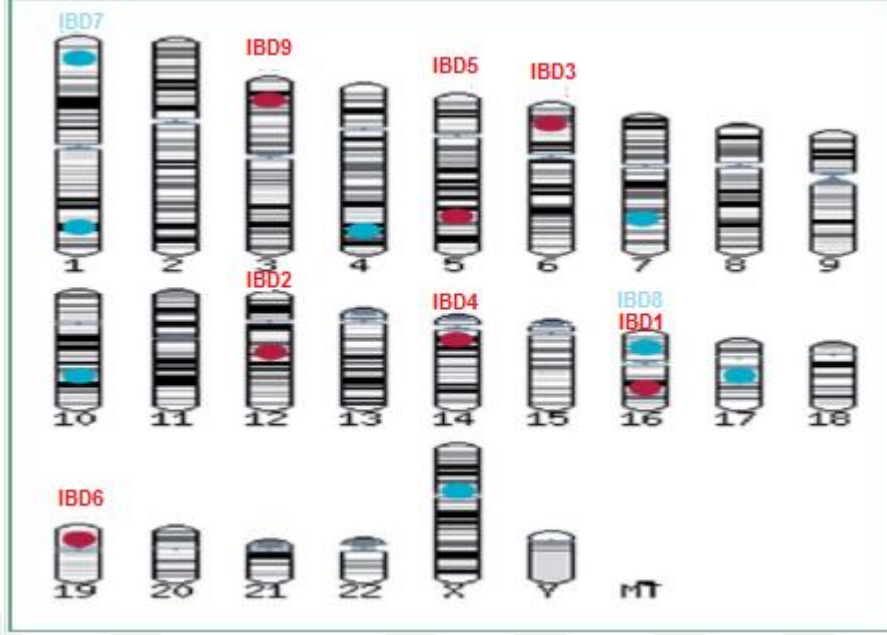
Fizyolojik koşullarda lamina propriada T hücreler, B hücreler, naturel killer (NK) hücreler, makrofajlar, dendritik hücreler, mast hücreleri, nötrofiller, eozinofiller, fibroblastlar gibi pek çok hücre bulunmaktadır. İnflamatuvar şartlarda , çok sayıda aktive olmuş immün hücre intestinal mukoza içine infiltre olur. Bu immün hücreler ve bazı stromal hücreler sadece yüksek oranda adezyon molekülleri, yardımcı sinyal molekülleri (CD54,CD62L gibi) değil ayrıca inflamatuvar mediatörler ve kemokin reseptörleri (CCR5, CCR6, CCR9) ve integrin eksprese ederler. Ayrıca intestinal mukozadaki fibroblastlar ve kapiller endotelial hücreler yüksek miktarda kemokin , selektin ve dolaşımdan intestinal mukozaya göç eden lökositlerin intrasellüler etkileşimini iyice arttıran intrasellüler adezyon moleküllerini (ICAM-1) de salgırlar.

ÜK' deki inflame dokularda CD4+T hücreler ve NK T hücreler çok miktarda IL-4, IL-13 gibi T-helper2 aracılı sitokinler ve T helper-17 ilişkili proinflamatuvar sitokinler (IL-17A) salgırlar. Pro/ antiinflamatuvar sitokinler arasındaki dengesizlik ÜK' de intestinal mukozadaki inflamasyona katkıda bulunmaktadır (Xu 2014).

2.1.3.5 Genetik faktörler

ÜK'deki ailesel kümelenme ilk olarak 1930'lu yıllarda fark edilmiştir. Pozitif aile öyküsü halen hastalık için en önemli bağımsız risk faktörlerinden birisidir. ÜK'li hastaların birinci derece akrabalarında ÜK gelişme oranı %5.7-15.5 , inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) gelişme oranı ise %6.6-15.8'dir. İBH duyarlılığında genetik faktörlerin katkısını en güçlü şekilde ortaya koyan ikiz çalışmaları olmuştur. İlk sistematik ikiz uyum çalışması monozigotik ikizlerde Crohn hastalığında (CH) %37.3, ÜK'de %10 ve dizigotik ikizlerde Crohn hastalarında %7, ÜK'de %3'lük birliktelik gösteren iki çalışma tarafından desteklenmiştir.

Bu bulgular göstermiştir ki, İBH poligenik bir hastalıktır. Şimdiye kadar yapılan 12 genom-wide çalışmada 12 kromozom üzerinde olası bölgeler tanımlanmıştır. Genetik heterojeniteyle uyumlu şekilde ,hastalıkla uyumlu tek bir lokus tespit edilememiştir. İlk raporlanma tarihlerine göre, kromozom 16, 12, 6, 14, 5, 19 ve 3 üzerindeki duyarlılık bölgeleri sırasıyla IBD1-9 şeklinde yeniden isimlendirilmiştir. Sonrasında pozisyonel klonlama teknikleri ve duyarlılık bölgelerinin genom taramaları yoluyla ince haritalanması ile daha fazla sayıda gen tespit edilmiştir (Baumgart 2007).



Şekil 2.1. İnflamatuvar bağırsak hastalığı olan insan karyotipindeki duyarlılık lokusları (Baumgart 2007)

(Çoğaltılmış ve doğrulanmış ilk belirlenen duyarlılık bölgeleri kırmızı dairelerle, diğer duyarlılık bölgeleri açık mavi dairelerle temsil edilmektedir)

Literatürde şimdiye kadar 163 duyarlılık lokusu tanımlanmıştır. Bunlardan 110'u hem ÜK hem CH ile bağlantılı iken , 30'u CH ve 23'ü ÜK 'ye spesifiktir. TNF ailesinin yeni saptanan üyelerinden TL1A 'yı kodlayan TNSF15 ile endoplazmik retikulum stres cevabında anahtar komponent olan XBP1 ve diğer endoplazmik retikulum stres genleri ; ORMDL3, AGR2 ve MUC19 'daki gen polimorfizmleri hem ÜK hem de CH ile ilişkilidir (Annahazi 2014).

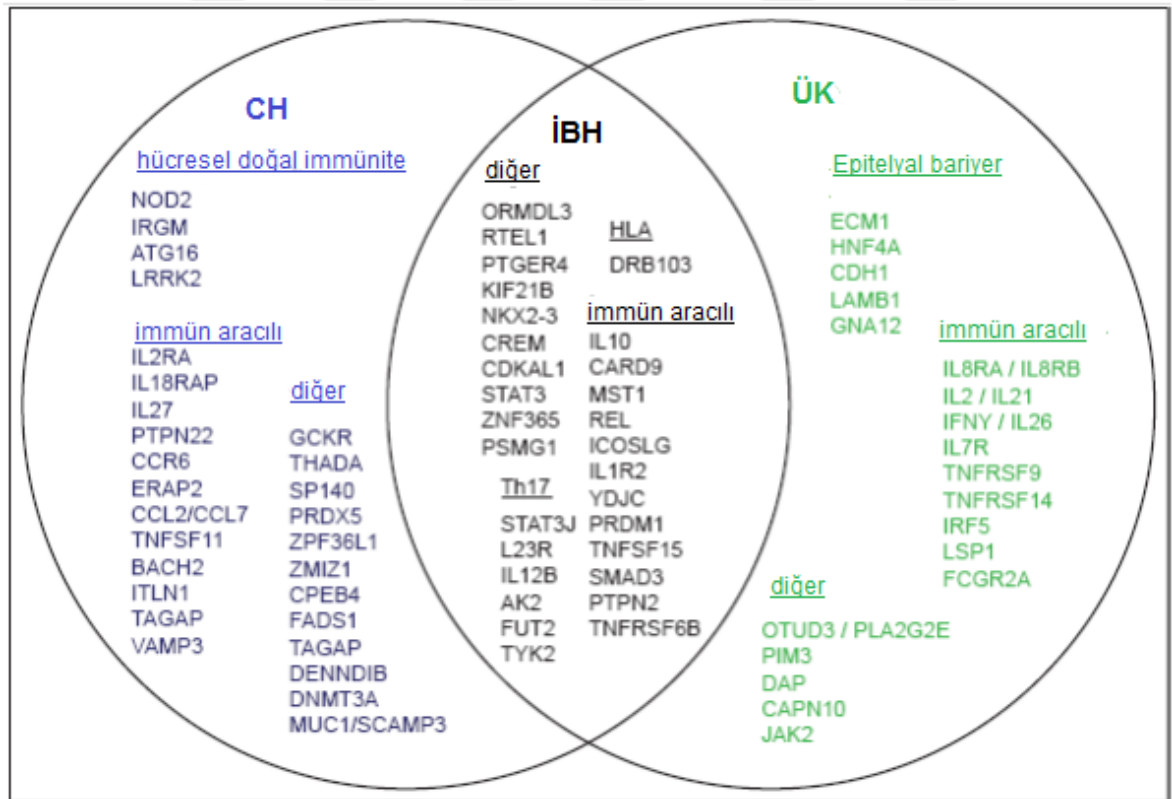
Özellikle ÜK için, önemli aday genlerden birisi 4q24 üzerinde lokalize Nükleer Faktör Kappa Beta Subünit 1 (NFKB1) genidir. NFKB1; immünite ve inflamasyonla ilişkili genleri kodlar (Karban 2003).

Epitelyal bütünlüğün sağlanmasında yardımcı proteinleri kodlayan Disks large homolog 5 (DLG5) geninin iki haplotipi ÜK ve CH ile ilişkilidir. Yine Multi-Drug Resistance gen (MDR1) varyantları hem ÜK hem de CH ile ilişkilidir. Ayrıca Mdr1 delete olan farelerde kolit geliştiği gözlenmiştir (Sartor 2006).

Spesifik olarak ÜK'yi hedefleyen ilk geniş kapsamlı assosiasyon çalışması 2008 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada ÜK'ye ait 3 lokus tanımlanmıştır. Bunlar MHC bölgesi, ekstrasellüler matriks protein 1(ECM1) kodlayan gen ve makrofaj stimüle edici gen MST1 dir (Ek 2014).

Human Lökosit Antijen (HLA) genleri İBH genetik çalışmalarında birincil aday genler olmuştur. Çünkü bu genler antijen sunan hücrelerdeki hücre yüzey glikoproteinlerini kodlayarak antijen tanınması ve sağlıklı lökosit cevabı gibi immünregülasyon fonksiyonları ile otoimmün hastalıklarla ilişkilidir. Çeşitli çalışmalarda özellikle HLA sınıf 2' ye ait HLA DR varyantları ile İBH gelişimi arasında artmış risk olduğu bulunmuştur. ÜK; HLA DR2 ile pozitif ilişkili iken HLA DR 4 ve DR6 ile negatif ilişkilidir. Bazı alleller, özellikle DRB1* 0103 ve B *52 hem ÜK hem CH ile ilişkilidir (Yang 1993;Annahazi 2014).

DRB1*0103 ve DRB1*15 allellerinin kolektomiye gitmek zorunda kalan , yaygın hastalığı olanlarda daha sık olduğu gözlenmiştir (Bouma 1999).



Şekil 2.2. İnflamatuvar bağırsak hastalığı lokusları (Ek 2014)

2.1.4. Klinik Bulgular ve Tanı

ÜK rektumu içerecek şekilde kalın bağırsak mukozasını etkileyen, kesintisiz olarak proksimale doğru ilerleyen bir hastalıktır. Bazen bu inflamasyon tüm kolonu da içine alacak şekildedir. Anatomik tutulumla bağlı olarak hastalar proktitis (rektuma sınırlı tutulum), sol taraflı kolit (splenik fleksuradan ileriye ulaşamayan tutulum) veya ilerlemiş kolit olarak sınıflandırılırlar .

Klinik bulgular tutulumla ve hastalığın ilerlemişliğine göre değişmektedir. Kanlı mukuslu ishal, karın ağrısı, gaytada zorlanma, acil gayta yapma isteği ve rektal kanama en sık görülen bulgulardır. Kanlı dışkılama hastaların %90'ından fazlasında görülmektedir. İştahsızlık, ateş, kırgınlık gibi sistemik bulgular ciddi atak belirtisidir.

Tanı için tek bir test mevcut değildir. Hastanın tıbbi öyküsü, endoskopik bulgular, kolonoskopik çeşitli biyopsi örneklerinin histopatolojik değerlendirmesi ve enfeksiyöz ajanlara yönelik negatif gayta testleri ile tanı konulmaktadır. Kolonoskopi ve sigmoidoskopi ÜK'nin karakteristik mukozal değişikliklerinin saptanmasında önemlidir. Karakteristik endoskopik değişiklikler; damarsal ağ yapısının kaybı, granüler görünüm, kırılganlık ve ülserasyonlardır. Bu değişiklikler tipik olarak distal rektumda başlayıp, simetrik, devamlı ve dairesel biçimde kolonun bir bölümünü ya da tümünü içerecek şekilde proksimale doğru ilerler (Dignass 2012; Boirivant 2012).

2.1.5. Ülseratif Kolit ve Kolorektal Kanseri Gelişimi

ÜK hastaları displazi ve kolorektal kanser (KRK) gelişimi açısından normal popülasyona göre daha riskli durumdadırlar. Crohn ve Rosenberg tarafından ÜK komplikasyonu olarak adenokarsinom gelişen ilk vaka 1925 yılında tanımlanmıştır. Bundan sonra ÜK gibi uzun süredir İBH olan kişilerde KRK gelişim riskinin artmış olduğu kabul edilmiştir.

İBH'da KRK gelişimine ilişkin hastalığın süresi, tutulumun yaygınlığı, inflamasyonun derecesi , tanı yaşı, aile öyküsü ve primer sklerozan kolanjit (PSK) varlığı gibi birçok risk faktörü tanımlanmıştır (Yashiro 2015).

Kolit ilişkili kolorektal kanser gelişim riski kolondaki inflamasyon süresinin uzamasıyla birlikte artar. Özellikle kolondaki inflamasyondan 8-10 yıl sonrasında görülmeye başlar (Bektaş 2014).

ÜK hastalarında genel KRK gelişim riski 2,4 kat artmış durumdadır. Yeni bir meta-analize göre, ÜK hastalarında kümülatif KRK geliştirme olasılığı 10 yılda %2, 20 yılda %8 ve 30 yılda %18 'dir. Kronik inflamasyon ve epitel hücrelerindeki artmış dönüşüm displazi gelişimine katkıda bulunmaktadır (Sameshima 2015).

Önemli bağımsız risk faktörlerinden birisi de hastalığın yaygınlığıdır. Yapılan çalışmalarda pankoliti olan hastaların KRK gelişimi açısından en riskli oldukları bilinmektedir. Eaden ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı, dünya genelinde birçok coğrafi bölgeyi kapsayan 116 çalışmayı içeren metaanalizde ÜK hastalarında KRK gelişme insidansı %0,3 olarak bulunmuştur. Aynı analizde ÜK hastalarında KRK gelişim prevalansı %3,7 iken, pankolitli olgularda bu oran %5.4 olarak bulunmuştur. ÜK tanılı 1515 hastanın yer aldığı yeni bir Danimarka popülasyon temelli kohort çalışmasında, ÜK ilişkili KRK gelişim riskinin en yüksek oranda bulunduğu grubun yaygın koliti olan hastalar olduğu gözlenmiştir (Kim 2014; Yashiro 2015).

İBH'larındaki kronik inflamasyonun karsinogenezisi desteklediği düşünülmektedir. Kronik inflamasyon seviyesinin İBH ilişkili KRK ile direk etkisi olup olmadığını araştıran birkaç çalışma mevcuttur. Retrospektif bir vaka kontrol çalışmasında kolonoskopik ve histolojik inflamasyon skorları ile kolorektal neoplazi arasında önemli bir korelasyon saptanmıştır. Ancak çok değişkenli analizlerde yalnızca histolojik inflamasyonun önemli bir risk faktörü olduğu ortaya konmuştur (Kim 2014).

Mathy ve ark. (2003) 30 kolektomi örneğini yeniden incelediklerinde, gross kolitli alanların proksimalindeki mikroskobik kolit alanlarında displazi ve KRK ortaya çıkabildiğini göstermişlerdir. Bu da kolonoskopik değişiklikler olmasa bile, gerçek histolojik değişikliklerin kanser riskinin değerlendirilmesinde hastalığın yaygınlığını daha iyi tanımlanabileceğini göstermektedir (Xie 2008).

ÜK'de inflamasyonun terminal ileuma kadar ilerlemesi olarak tanımlanan backwash ileitis durumunda KRK gelişim riskinin arttığı ileri sürülmektedir. Ancak bu teoriyi destekleyen kesin bir veri henüz yayınlanmamıştır ve doğrulanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Xie 2008; Sunkara 2011).

Hastalığın erken yaşta ortaya çıkması süreden bağımsız olarak riski arttırmaktadır. 15-29 yaş arası tanı alanlara göre 15 yaş öncesi tanı alanlarda risk 4 kat artmıştır (Özer 2011).

Geniş bir kore popölasyon çalışmasında, ÜK ilişkili KKK 'ların kadınlarda daha fazla görüldüğü saptanmıştır. 169 hastayı içeren başka bir Japon popölasyon çalışmasında ise kadın erkek arasında bir farklılık tespit edilmemiştir (Zhiqin 2014).

PSK, İBH ile güçlü ilişki içerisinde olan kronik kolestatik karaciğer hastalığıdır. İBH komplikasyonu olarak PSK olan hastalarda KKK gelişme riskinin artmış olduğu gözlenmektedir. Molodocky ve ark. (2011) yaptığı bir metaanalizde PSK olgularında İBH oranı %68 olarak raporlanmıştır. İBH alt tipleri içinde %80'e karşılık % 10 gibi bir oranla CH'na göre ÜK'de PSK daha sıktır. Soetikno ve ark. (2002) 16844 hastayı kapsayan 11 çalışmadan oluşan metaanalizlerinde, PSK olmayan hastalarda KKK gelişme riski %4 iken, ÜK ve PSK birlikteliği olan hastalarda bu oran %21 şeklide bulunmuştur (Kim 2014).

2.2. Kolorektal Kanser

KKK özellikle batı toplumlarında ciddi bir halk sağlığı problemidir. Dünya genelinde erkeklerde üçüncü, kadınlarda ise en sık görülen ikinci kanserdir (Aiello 2011; Arvelo 2015).

2.2.1. Epidemiyoloji

KKK dünya genelindeki major mortalite ve morbidite sebeplerindendir. Tüm kanserlerin %9 kadarını oluşturmaktadır. Dünya genelinde en sık görülen üçüncü, en sık ölüme neden olan dördüncü kanserdir. Kadınlarda ve erkeklerde hemen hemen eşit sıklıktadır (Haggar 2009).

Uluslararası Kanser Ajansı tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre hem dünyada hem de ülkemizde erkeklerde en sık görülen 3 kanser akciğer, prostat ve kolorektal kanserdir. Kadınlarda en sık gözlenen 3 kanser türüne bakıldığında ise dünyada sıralama meme, kolorektal, uterus-serviks kanseri iken Türkiye' de meme, tiroit ve kolorektal kanser şeklindedir. Ülkemizde kolorektal kanserler hem kadınlarda hem de erkeklerde 3. sırada yer almaktadır. Erkeklerde yüzbinde 24,4 ve kadınlarda ise yüzbinde 15,3 sıklıkta görülmektedir (Türkiye Kanseri İstatistikleri, Ankara 2016).

Dünyada 550.000'i erkek ve 470.000'i kadın olmak üzere her yıl bir milyon yeni vaka bildirilmektedir. Bu da ne denli önemli bir halk sağlığı problemi olduğunu ortaya koymaktadır (Arvelo 2015).

Hastaların %90'ından fazlası 50 yaş üzerindedir. Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da sık iken ülkemizde orta derece sıklıktadır (Uyanıkoğlu 2015).

2.2.2. Etiyoloji

KRK gelişimi çeşitli çevresel ve genetik faktörlerin bir araya gelmesi sonucu meydana gelen bir süreçtir.

2.2.2.1. Çevresel faktörler

Çeşitli çalışmalar çevresel risk faktörlerinin toplumlardaki KRK gelişme riskinin en önemli belirleyicilerinden olduğunu göstermiştir. KRK; Amerika, Kanada, Batı Avrupa ülkeleri gibi gelişmiş ülkelerde daha sık iken az gelişmiş ülkelerde daha azdır (Gertig 1998).

Düşük riskli bölgelerden yüksek riskli bölgeler göç edenlerde KRK insidansının artma eğiliminde olması çevresel koşulların önemini ortaya koymaktadır. Yine kentlerde yaşayanlarda KRK görülme riski daha fazladır (Haggar 2009).

2.2.2.2. Kişisel Özellikler, Yaşam Biçimi ve Alışkanlıklar

Hayvansal yağlardan ve kırmızı etten zengin, lif oranı düşük besinlerle beslenme KRK gelişim riskini arttırmaktadır. Buna karşılık lif oranı yüksek sebze meyvelerle beslenme riski azaltmaktadır. Fiziksel inaktivite ve şişmanlık KRK gelişen hastaların dörtte üçünde bildirilmiştir. Sigara KRK öncü lezyonları olan adenomatöz polip gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Sigara içenlerde ortalama KRK gelişim yaşının daha erken olduğu gösterilmiştir. Düzenli alkol kullanımı da daha erken yaşlarda KRK gelişimi ile ilişkilidir (Haggar 2009).

2.2.2.3. Klinik Risk Faktörleri

Belli başlı poliplerin bir kısmının malignite gelişimi ile ilişkisi tespit edilmiştir. Polipin neoplastik olarak sınıflandırılması için polip epitel hücrelerinde atipi görülmesi gerekir. (Yamaner 2007).

Tübüler ve villöz adenomlar gibi neoplastik polipler KKK gelişimi için predispozandır. Sporadik KKK'ların %95'i bu adenomlardan gelişmektedir. Adenom öyküsü olan kişilerde olmayanlara göre risk artmıştır. Malign dönüşüm olmadan önce adenomların tespit edilerek çıkarılması KKK riskini azaltmaktadır (Haggar 2009).

İBH; ÜK ve Crohn hastalığı varlığı genel olarak KKK gelişme riskini arttırmaktadır. Bu hastalarda KKK gelişim riski rölatif olarak 4-20 kat artmaktadır. Bu nedenle bu bireylerin yaşı kaç olursa olsun daha sık bir şekilde KKK için taranması gerekmektedir (Haggar 2009).

2.2.3.Klinik Özellikler ve Tanı

Semptom ve bulgular tümörün yerleşimi, makroskopik yapısı, yayılımı, kanama, tıkanma, perforasyon gibi komplikasyonların varlığına göre değişiklik göstermektedir.

Sağ kolon kanserlerinde; halsizlik, dispeptik yakınmalar, karın sağ alt kadranda ele gelen kitle ve karın ağrısı en sık görülen bulgulardır. Nedeni bulunamayan anemi ve hızlı kilo kaybı durumunda sağ kolon tümörü mutlaka akla gelmelidir. Sağ kolon tümörlerinde tıkanma nadiren görülür.

Sol kolon tümörlerinde ise, sol kolon çapının daha dar olması nedeniyle temel yakınmalar dışkılama ile ilişkilidir. Dışkılama güçlüğü, dışkı çapında incelmeye, kabızlık veya kabızlığı takiben ishal, kolik tarzında karın ağrısı ve dışkıya bulaşmış kan görünümü olası bulgulardır. Tıkanmalar daha sık görülür. Rektal kanserlerde ise ana semptom rektal kanama ve boşalamama hissidir.

Fizik muayene, öykü ve diğer testlerle tanıya gidilmektedir. Fizik muayenede karın muayenesi, kanama açısından rektal tuşe mutlaka yapılmalıdır (Karahasanoğlu 2001).

KKK tanısında endoskopi, çift kontrastlı baryum grafisi ve bilgisayarlı tomografik (BT) kolonografi olmak üzere üç methodun oldukça etkin olduğu gösterilmiştir.

Göğüs, pelvis ve karının kontrastlı BT ile değerlendirilmesi evrenin belirlenmesi ve uzak matastazların değerlendirilmesi bakımından oldukça duyarlıdır. Karaciğerin ultrasonografi ve manyetik rezonans (MR) ile görüntülenmesi BT 'de tam olarak belirlenmeyen lezyonların tespitinde karakteristiktir. Karaciğer MR, karaciğere olan matastazların doğru şekilde değerlendirilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Diagnosis and management of colorectal cancer .A national clinical guideline 2011).

2.2.4. Kolorektal Kanser ve Genetik

KRK'nın moleküler genetik analizlerinden, kanser oluşumuna ilişkin dört merkezi ilke saptanmıştır. Bunlardan ilki, kolon kanser gelişiminin altında yatan genetik ve epigenetik değişikliklerdir. Bu değişiklikler hücrelere klonal büyüme avantajı kazandırır. İkincisi, kanser hem moleküler hem de morfolojik düzeyde çok aşamalı bir süreçte ortaya çıkmaktadır. Üçüncüsü genomik stabilite kaybıdır ki bu kanser oluşumunda anahtar moleküler basamaktır. Sonuncu olarak herediter kanser sendromları; sıklıkla somatik olarak görüldüğünde sporadik kolorektal kanser oluşumuna götüren anahtar genetik defektlerin germ line formlarına karşılık gelmektedir.

KRK'ya hızlanmış kolonosit çoğalması ve lokal DNA replikasyonu bozukluğuna yol açan genetik mutasyon kaskadının sebep olduğuna inanılmaktadır. Çeşitli genetik mutasyonların ilerleyici biçimde birikmesi normal mukozadan, benign adenom, ağır displazi ve sonuçta karsinoma dönüşümle sonuçlanmaktadır (Alsgier 2015).

Normal kolon epitelinin adenoma, invaziv kansere ve metastatik kansere dönüşümünü içeren basamaklar Vogelstein ve Fearon tarafından tanımlanmıştır (Canbay 2011).



Şekil 2.3. Vogelstein ve Fearon tarafından tanımlanan kolorektal karsinogeneziste adenom-karsinom ardışıklığı (Canbay 2011)

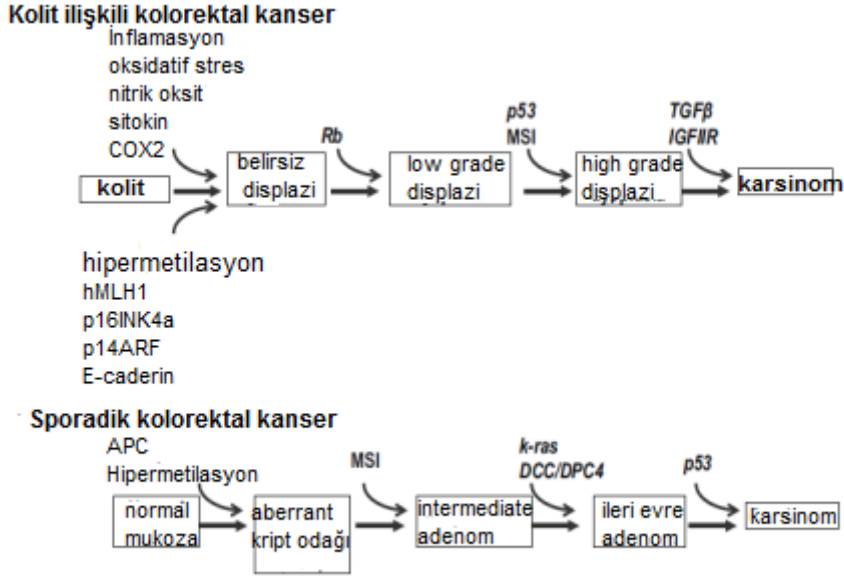
Sporadik kolorektal kanserlerin kolonik epitel hücrelerinin büyümesini düzenleyen genlerdeki değişikliklerin ardışık olarak birikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu değişiklikler özellikle kromozom 5q21 deki adenomatozis polipozis geni (APC) inaktivasyonu, K-ras nokta mutasyon aktivasyonu ve kromozom 17p13 deki P53 geni, kromozom 18q üzerindeki birkaç aday genden biri olan; DCC ile DPC4 genleri gibi spesifik tümör supresör genlerinin inaktivasyonunu içermektedir (Yashiro 2015).

KRK oluşumu ile ilgili çalışmalarda, 3 temel kategoride bulunan genlerdeki genetik değişikliklere odaklanılmıştır. Bunlar tümör süpresör genler ; APC, DCC, P53, SMAD2, SMAD4 ve p16INK4a, protoonkogenler; K-ras, N-ras ve DNA tamir genleri MMR ve MUTYH dır (Arvelo 2015).

Normal mukozodan adenoma, ondan karsinoma ilerleyiş, APC, K-RAS, P53, DCC genlerindeki kümülatif mutasyonlarla desteklenmektedir. Tüm bu mutasyonların hepsinin önemli olduğu düşünülmektedir ancak tüm kolorektal kanserlerden sorumlu olduğunu söylemek mümkün değildir.

APC mutasyonlarının KRK'ların %80'inden sorumlu olduğuna inanılmaktadır. APC'deki değişiklikler Wntless/Wnt sinyal yolağında overaktivasyonla sonuçlanır ve kolonda tümör oluşumunu başlatıcı gibi görünmektedir. Sonrasında diğer genlerde görülen değişiklikler tümör büyümesi ve doku invazyonu ve metastaz yapma kabiliyeti gibi diğer malignite özelliklerinin kazanılmasında rol oynamaktadır (Alsgier 2015).

Sporadik KRK'lardan sorumlu olan moleküler değişikliklerden bazıları ülseratif kolit ilişkili KRK gelişiminde de rol oynamaktadır. Sporadik KRK ve kolit ilişkili KRK arasında DNA metilasyonu, mikrosatellit instabilitesi, P53 mutasyonu ve nihayetinde p53 heterozigosite kaybını kapsayan genetik yollarda benzerlikler bulunmaktadır. Ancak bu değişikliklerin sıklığı ve ortaya çıkış zamanlarında farklılıklar vardır (Yashiro 2015).



Şekil 2.4. Kolit-ilişkili KRK ve sporadik KRK 'daki moleküler değişiklikler (Yashiro 2015)

Tablo 2.1. Kolorektal karsinogenezisde hücre içi moleküler lezyonlar (Canbey 2011)

Kolorektal Karsinogenezisde Hücre İçi Moleküller	Moleküler Lezyon	Sıklık
WNT/β-katenin24	aktive mutasyon	%1.4
TGFBR225	inaktive mutasyon	%30
SMAD429	artan ekspresyon	%50
18qLOH5,13	18.kromozomun uzun delesyonu	%50
TP535	inaktive mutasyon	%50
KRAS32	12. ve 13.kodonunda mutasyonu	%40
BRAF3	V600E mutasyonu	%10
PI3KCA37	mutasyonu	%32

2.3. Telomer

Telomerler lineer kromozomların uçlarında yer alan yapılardır ve ilk kez Herman Muller tarafından meyve sineği *Drosophila melanogaster* üzerindeki çalışmaları sırasında gösterilmiştir. Muller kromozomların ucundaki koruyucu yapıları yunanca telos (uç anlamında) ve meros (kısım anlamında) kelimelerini birleştirerek “telomer” ismini vermiştir. Sonraki yıllarda Herman Muller ve Barbara McClintock kırılan kromozomların

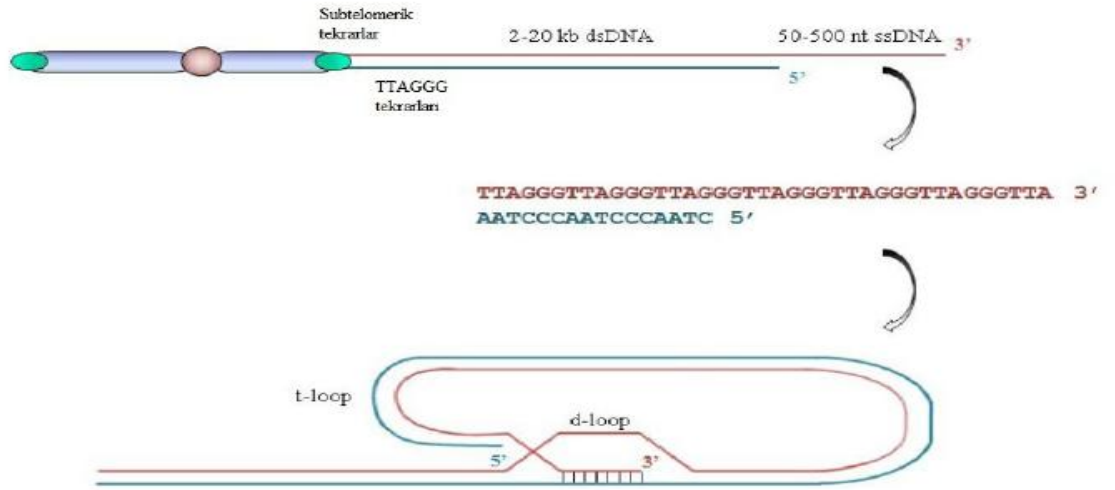
füzyon ve yeniden düzenlenmelere karşı eğilimliyen, uç kısımlarının bu gibi olaylara karşı korunmuş olduğunu belirtmişlerdir (Bailey 2006; The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009).

2.3.1. Telomerlerin Yapısı

Telomerler, telomere bağlı proteinler ve telomer DNA'sı olarak incelenebilir (Miroğlu 2001).

Telomerik DNA 5' → 3' yönünde ilerleyen, guanince zengin bir iplikçik ve komplementeri olan daha kısa bir iplikçikten oluşur. 3' uçtaki tek zincirli kısım guanin(G) kuyruğu olarak adlandırılır ve 30-200 nükleotid uzunluktadır.

Bu G zinciri telomer bağlayıcı proteinlerin de yardımıyla kendi üzerinde katlanır ve telomerik (T) loop şeklinde adlandırılan bir ilmek yapısı oluşturur. T loop yapısının oluşması sırasında aynı zamanda 3'G kuyruğu çift zincirli DNA'nın içine girerek displacement (D) loop olarak adlandırılan ikinci bir ilmek oluşumuna yol açar. T loop yapısının kromozom uçlarını yıkımdan, DNA tamiri ve telomeraz aktivasyonundan koruduğu düşünülmektedir (Chakparonian 2003; Martı'nez 2015).



Şekil 2.5. İnsan telomerlerinde T loop ve D loop yapısı (Wyatt 2009)

İnsanlarda telomerler shelterin kompleksi ya da telosom olarak bilinen özelleşmiş yapılarla bağlı halde bulunurlar. Shelterin kompleksi altı tane çekirdek proteininden oluşur. Bunlar telomeric repeat binding factor 1 ve 2 (TRF1 ve TRF2), TRF1-interacting protein 2 (TIN2), protection of telomeres protein 1 (POT1), POT1-interacting protein

(TPP1) ve repressor/ activator protein 1 (RAP1) dir. Bunların içerisinde direk DNA'ya bağlandığı bilinen 3 protein TRF1, TRF2 ve POT1 dir (Martínez 2015).

TRF1 çift zincirli telomerik DNA'ya bağlandığı bulunan ilk proteindir. 1992 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Myb ilişkili bölgelerden oluşan homodimer formdadır ve telomeraz aktivasyonu ya da ekspresyonunu etkilemeksizin telomer uzamasının kontrolünde telomeraz inhibitörü olarak görev yapmaktadır (Calle'n 2004).

TRF1, TRF2 ve TPP1 ile direk etkileşerek telozom kompleksinde merkezi bir rol alır (Lu 2013).

TRF1 telomerazın kendi substratına ulaşmasını engelleyerek veya bazı diğer proteinler üzerinden telomeraza negatif sinyaller yaymak yoluyla indirek olarak telomeraz aktivitesini engeller. Bu aracı proteinlerden birisi de tankirazdır (tankyrase)(Calle'n 2004).

Poly (ADP-riboz) polimerazlar (PARPs) olarak da bilinen tankiraz , telomeraz inhibisyonu için indirek yolla hedef sağlar. Tankiraz'ın overekspresyonu TRF 1' in ribozilasyonuna neden olur. Ribozillenmiş TRF1 daha fazla telomere bağlanamaz ve çift zincirli DNA telomerik tekrarlarını stabilize edemez. Böylelikle telomeraz için daha fazla tek zincirli telomerik yapı bulunur. Bu nedenle, tankiraz aktivitesinin baskılanması telomer uzamasını azaltabilmektedir (Philippi 2010).

1997 yılında diğer bir myb -ilişkili bölgesi olan telomere bağlanan protein TRF2 tanımlanmıştır. TRF2, telomer bütünlüğünün sağlanmasında görev alır. TRF2 inhibisyonu G-kuyruğun kaybıyla sonuçlanır ve kromozom uçlarının kovalent füzyonu artar. TRF2 aynı zamanda apoptotik cevabın aktivasyonunu ve ATM/p53 yolağını içeren hücre siklusunda duraksamayı sağlar (Calle'n 2004).

TRF1 ve TRF2 telomer uzunluğunun ve yapısının korunmasında ; diğer telosom proteinleri ,hücre siklusu, DNA tamiri ve rekombinasyonundaki farklı protein ve protein komplekslerle etkileşerek , telomer sinyalizasyon ağında protein-etkileşim merkezi gibi rol alırlar. TRF1 diğer telosom proteinleri TIN2, TPP1 , POT1 ve telomeraz inhibitörü olan PINX1 ile etkileşimi üzerinden telomer tekrarlarının uzunluğunun düzenlenmesinde yer almaktadır.

TRF2 t loop yapısının stabilizasyonunda önemlidir. Böylelikle telomerik uçların korunmasında görev alır. Bu koruyucu fonksiyonuna kısmen diğer bir shelterin kompleksi

üyesi olan RAP1 ile heterodimerizasyonu aracılık eder. İnsanlarda ,RAP1 inhibisyonu ya da RAP1 dominant negatif ifadesi telomerlerin uzamasına ve telomer heterojenitesinin kaybına yol açar (Xin 2008).

RAP1 ayrıca , özellikle obezite ve metabolik sendromlara karşı koruyucu metabolik yollarda gen ifadesinin düzenlendiği gösterilen, telomerik olmayan genomik bölgelerle de ilişkilidir (Martínez 2015).

TRF1 ve TRF2; herikisi de DNA hasar cevabı yollarıyla yakından bağlıdır. Telomerlerdeki çift zincirli ve tek zincirli DNA yapısı, hücre tarafından DNA hasarı olarak algılanabilir. TRF1 ve TRF2 oluşan bu hasar cevabını önleyen mekanizmaların bir parçasıdır. TRF2 , ATM (ataksi telenjiectazi mutated) protein kinaz' a ek olarak nükleazlar ERCC1/XPF , Apollo, DNA tamir MRN kompleksi, helikazlar BLM ve WRN ,Ku 70/80 ve poli-ADP riboz polimerazlar PARP1/2 gibi DNA hasar-algılayıcı ve tamir proteinlerinin telomerde bir araya gelmesini sağlar. Bu proteinlerin bir araya gelmesi, muhtemelen telomer uçlarının DNA kırığı şeklinde algılanmasını önleyerek fonksiyon görmektedirler.

TIN2, telosomdaki anahtar komponenttir. Telomer uzamasının negatif düzenleyicisidir ve telosom kompleksi içindeki DNA bağlayıcı proteinlerin bir araya gelmesi için gereklidir . TIN2'nin hem TRF1'e hem de TRF2 'ye bağlandığı gösterilmiştir (Xin 2008).

TIN2 bugüne kadar mutasyonunda insanlarda hastalığa yol açtığı saptanmış tek telozom elemanıdır. Diskeratozis konjenita hastalarında TIN2 de bulunan yanlış anlamlı mutasyonlar, hastalarda görülen telomer kısalması durumunu özetlemektedir ve TIN2 'yi tanı ve tedavi çalışmalarında olası hedef yapmaktadır (Lu 2013).

TPP1, TIN2 ve POT1 ile etkileşim içindedir ve çift zincirli DNA'ya bağlanan TRF1 ile tek zincirli DNA 'ya bağlanan POT1 aktivitelerini birbirine bağlar. TIN2; TRF1 ile TPP1 ise POT1 ile etkileşen major proteinlerdir. Bu TRF1- TIN2- TPP1- POT1 ilişkisi telomer boyunca iletilecek sinyaller için önemli bir yoldur (Xin 2008).

POT1 tek zincirli telomerik DNA dizisi için yüksek özgüllüğe sahiptir. Böylece G-kuyruğa bağlanabilmektedir. POT1 protein-protein etkileşimi üzerinden TRF1 kompleksi ile etkileşim içindedir ve bu etkileşimin POT1' in tek zincirli telomerik DNA' ya bağlanmasında etkili olduğu düşünülmektedir (Martínez 2011) .

İnsanlarda tek bir POT1 geni bulunurken, fareler POT1a ve POT1b ' ye sahiptir. Bu iki protein telomer üzerinde farklı görevlere sahiptir. POT1a telomer uçlarındaki DNA hasar cevabının baskılanmasında önemli iken POT1b 3' tek zincirli DNA kuyruğunu düzenler. Telomer bütünlüğünün sağlanmasında POT1 kompleksin efektörü gibi hizmet eder (Xin 2008).

Şekil 2.6. Telomer yapısı ve shelterin kompleksi (Denchi, 2009)

Şelterin kompleksinde yer alan proteinler dışında insanlarda telomerlere bağlanan başka proteinlerin de olduğu bilinmektedir. Bunlardan bazıları tablo 2.2' de özetlenmiştir.

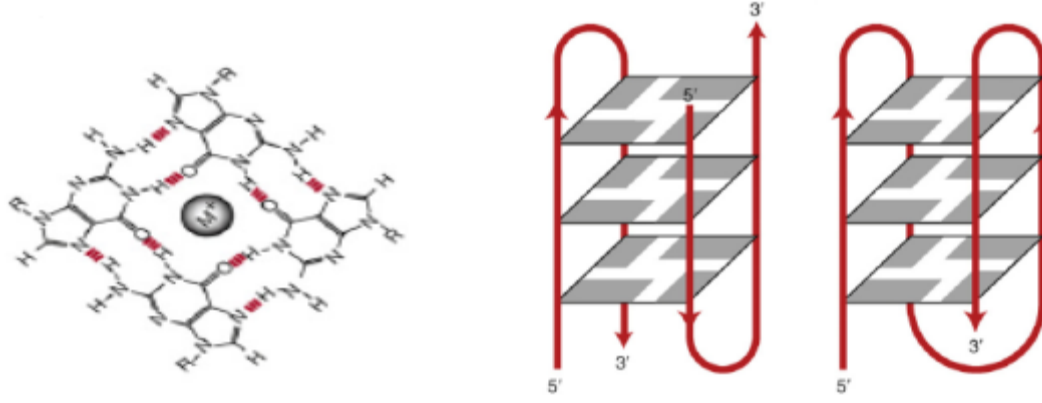
Tablo 2.2. Telomere bağlanan diğer proteinler (Campisi 2001, de Lange 2005 kaynaklarından alınarak yeniden düzenlenmiştir)

PROTEİN KOMPLEKSİ	ÖZELLİKLERİ
Mrc11/Rad50/Nbs1	Rekombinasyon tamiri, t loop oluşumu/ayrışması
ERCC1/XPF	NER, eksikliğinde TDM oluşumuna yol çar, TRF2 kaybı sonrası telomerik çıkıntıların işlenmesinde rol alır
WRN helikaz	G4 DNA rezolüsyonu, eksikliği kesintili zincir telomerlerinin kaybı
BLM helikaz	T loop oluşumu/ayrışması, crossover baskılanması
DNA -PK	NHEJ
PARP2	BER
Tankiraz	Mitozda rol oynar(tankiraz1), TRF inhibisyonu üzerinden telomer uzunluğunun pozitif düzenleyicisi
Rad51D	HR?
HRAP1	TRF2 ile etkileşim, telomer uzunluğunun pozitif düzenleyicisi
Ku	TRF1 ve TRF2 ile etkileşim, DSB tamiri için gerekli
HR:homolog rekombinasyon NHEJ:non homolog end joinig BER:baz eksizyon tamiri TDM:telomerik DNA içeriklidouble minute kromozom	

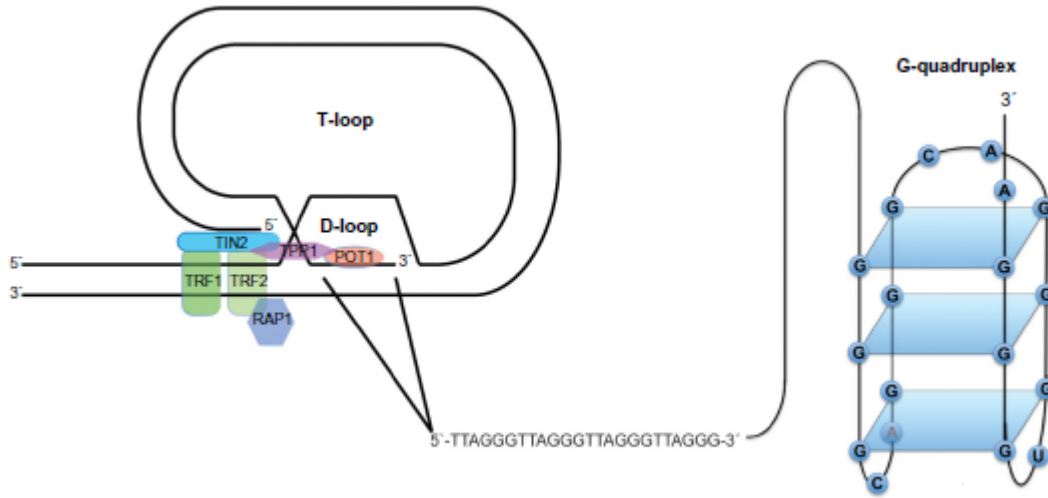
İnsan telomerlerinin korunması ve stabilizasyonunda önemli diğer bir yapı ise telomerik G dörtlüleridir (quadruplex). Guanince zengin içeriğinden dolayı tek zincirli telomer G kuyruğu G-dörtlülerini oluşturur (Lu 2013).

G-tetrad (G dörtlüleri) olarak da adlandırılan G-quadruplex yapılar üç ya da dört guanin içeren dizilerden oluşurlar. Bu gibi diziler RNA genomu boyunca ve özellikle telomerlerde bulunurlar. İnsanlarda telomerik DNA ardışık TTAGGG dizilerine sahiptir.

G-quadruplex yapısının temel yapıtaşları G-tetradlardır. Düzlemsel G dörtlüleri üst üste gelerek sarmal quadruplex yapısını oluşturmaktadır. Quadruplex yapılar özellikle potasyum, sodyum gibi alkali metal iyonlarının merkeze yerleşmesiyle daha kararlı hale gelirler.



Şekil 2.7. G-tetrad ve G4 DNA Yapısı (Lipps,2009)



Şekil 2.8. G-quadruplex yapısı (Heeg,2015)

2.3.2.Telomerlerin Özellikleri

Telomerler ökaryot organizmaların doğrusal kromozomlarının uç kısımlarında bulunan heterokromatik bölgelerdir ve Guanin ve Timin (T) bazlarınca zengin ardışık tekrarlardan oluşmaktadırlar. İncelenebilen çeşitli organizmalarda temelde bu yapının aynı olduğu fakat farklı tekrarlar içerdiği görülmüştür (Bozcuk 2002).

İnsanlarda ve farelerde TTAGGG, siliyatlarda TTTTGGGG ve Tetrahymena'da TTGGGG tekrar dizilerinden oluşmaktadır (Miroğlu 2011).

Telomer uzunluğu da türler arasında değişiklik göstermektedir. Bazı tek hücrelilerde 50 baz uzunluğundayken, farelerde yüzlerce kilobaz (kb) uzunlukta olabilmektedir. İnsanlarda ise 5-20 kb uzunluktadır (Paranjape 2010).

Telomerler çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Lineer kromozomal DNA'nın uç kısmında yer alan bu yapılar, replikasyon sırasında DNA molekülünün son kısmının tamamlanmasında rol almaktadır (Miroğlu 2011).

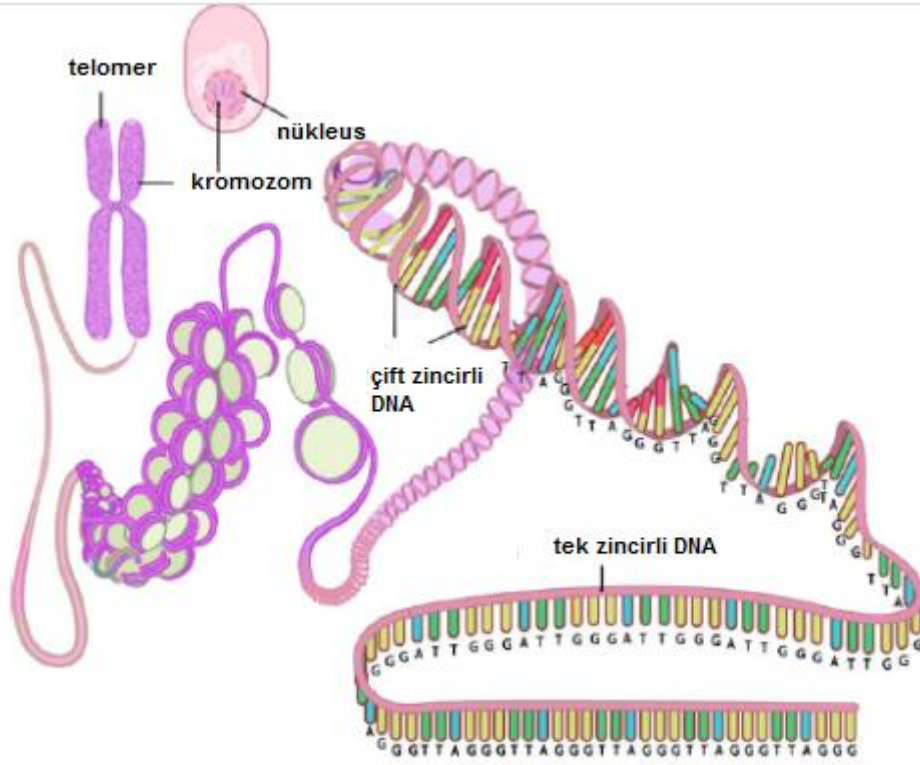
Telomerler bölünen hücrelerde, uç replikasyon probleminden dolayı giderek kısalırlar. Hücre bölünmesinin sürdürülebilmesi için kısalan kısımların yeniden uzatılması gerekmektedir. Bu uzatılma işlemi ters transkriptaz aktivitesine sahip bir enzim olan telomeraz tarafından gerçekleştirilmektedir. Telomer uzunluğu telomer kaybı ve yeniden uzatılması arasındaki dengeyle sağlanır. Telomer uzunluğu germ hücrelerinde korunurken, çoğu somatik hücre bölünme esnasındaki telomer kaybını önleyecek yeterli telomeraz aktivitesine sahip değildir (Bailey 2006).

Somatik hücrelerde her replikasyonda 50-200 baz çifti (bp) kadar telomerik DNA kaybı gözlenmektedir. Bunun sonucu olarak da, belirli sayıda bölünme sonrasında, replikatif yaşlanma olarak bilinen kalıcı büyüme duraksaması meydana gelir (Dikmen 2008).

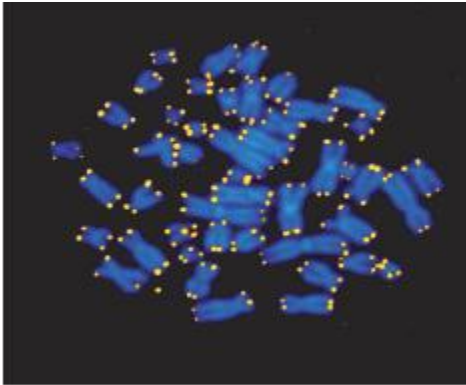
Bununla birlikte telomerler kromozomların uç kısımlarının bütünlüğünün korunmasında önemlidirler (Miroğlu 2011).

Telomer içermeyen kromozomlardaki kırık uçlar kararsız kromozom yapıları oluşturacak şekilde uç uca eklenebilir. Bu kararlı ve kararsız yapılar arasındaki farklılıklar, telomerlerin normal kromozomların uçlarında bulunduğunu ve bu yapılar olmadığında kromozomların dayanıksız olduğunu göstermiştir (Yıldız 2009).

Fonksiyonel telomerler olmadığında, serbest kalan DNA ucu korunamaz. DNA kırıklarının rastgele tamir edilmesi bozuk hücresel fonksiyonlar ortaya çıkarır. Kırılmış kromozomlar, nükleazlar tarafından kesilir ve bu uçlar rastgele kaynaşır. Telomerlerin diğer bir görevi de kromozomların nükleus zarına tutunarak belirli pozisyonda durmasına katkıda bulunmaktır (Miroğlu 2011).



Şekil 2.9. Telomer Yapısı (Oeseburg 2010)



Şekil 2.10. Kromozomlarda telomer bölgelerinin yeri (Aubert 2008)

2.3.3.Uç Replikasyon Problemi

DNA replikasyonu, herbir atasal ipliğin karşısına yeni tamamlayıcı bir zincir sentezlenmesiyle oluşan yarı korunumlu bir süreçtir. DNA ipliğine nükleotidlerin eklenmesi DNA polimeraz enzimi ile gerçekleştirilmektedir. DNA polimeraz uzayan zincirin 3' hidroksil (3'- OH) grubuna nükleotid ekleyerek DNA'yı 5'→3' yönünde sentezlemektedir. Ancak DNA polimeraz sentezi de nova olarak başlatamaz ve sentez için primere gereksinim duyar. DNA sentezinin aksine RNA sentezi de nova başlayabilir. Primaz enzimi replikasyon çatalında kalıp zincire uygun kısa RNA parçaları sentezleyebilmektedir. İnsan kromozomları, birlikte tek bir lineer çift sarmal DNA molekülü oluşturacak, birbirine anti-paralel iki zincirden oluşmaktadır (Cooper,2006).

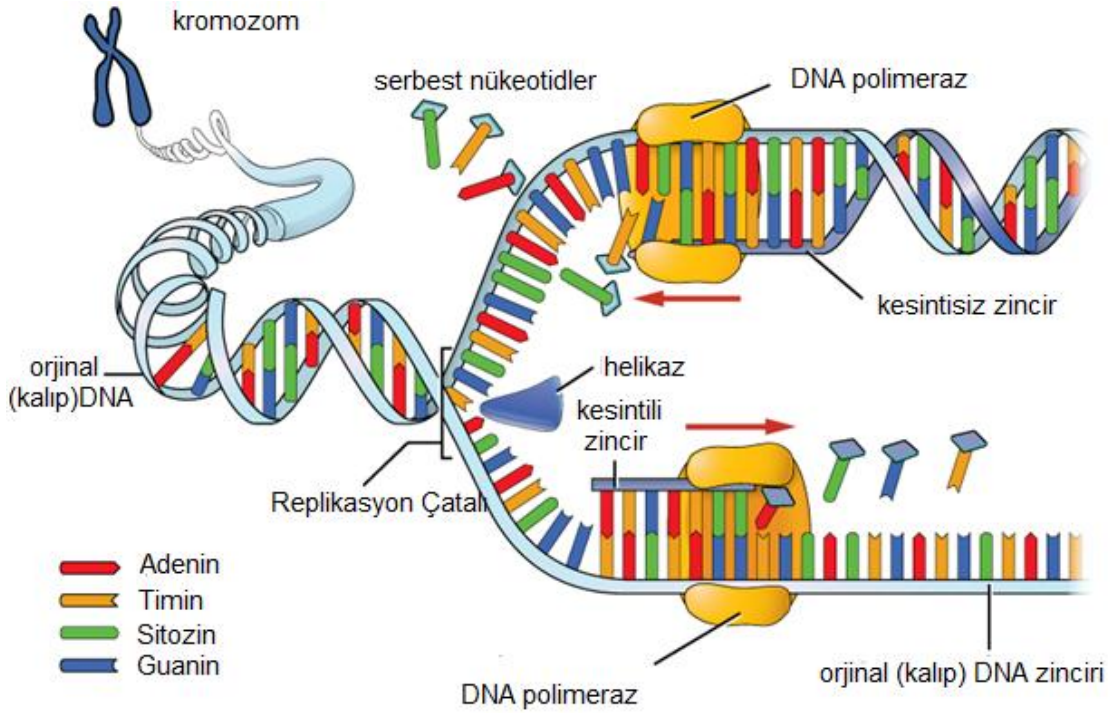
Yeni sentezlenen zincirlerden birisi kesintisiz sentezlenirken (leading zincir=lider zincir), diğer zincir (lagging zincir) 8-12 bazlık RNA primerlerinin kullanıldığı okazaki fragmentleri denilen kısa kesintili DNA dizileri şeklinde kesintili olarak sentezlenmektedir. RNA primerleri daha sonra ortamdan uzaklaştırılır ve oluşan boşluklar DNA polimeraz tarafından doldurulur, sonrasında da DNA ligaz ile birleştirilir (Paranjape 2010).

Prensipte eğer en distaldeki RNA primeri terminal kısımda yerleşmişse, kesintili zincirdeki kayıp minimum RNA primerinin uzunluğuna (7-10 nükleotid) eşit olacaktır. Ohki ve arkadaşlarının SV40 replikasyon sistemini kullanarak yaptıkları in vitro uç replikasyon problemi çalışmalarında; kesintisiz (lider) zincir tamamen sentezlenirken, kesintili zincirde tek iplikçikte ortalama 250 nükleotidlik bir kayıp olduğunu gözlemlemişlerdir. İn vitro koşullarda kurgulanan uç replikasyonu problemi çalışmalarına dayanarak insan hücrelerinde her hücre bölünmesinde 63 bp' lik telomer kaybının olduğu tahmin edilmektedir. Bu oranlar telomeraz negatif normal insan diploid fibroblastlarında gözlenen telomer kaybıyla uyumludur (Baird 2008).

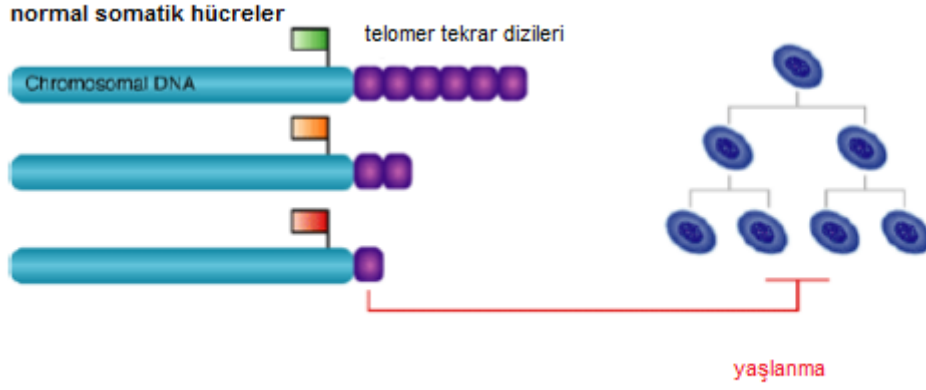
Kısa telomerler hücre içeriğine bağlı olarak hücre yaşlanma, hücre ölümü veya genomik düzensizliğe sebep olabilmektedir (Campisi 2001).

Normal memeli somatik hücreleri, in vitro koşullarda maksimum sayısı Hayflick limiti olarak ifade edilen, sınırlı sayıda çoğalabilme kapasitesine sahiptir. Normal hücrelerde telomerlerde görülen bu kısalma, hücrelerin çoğalabilme hikayesini kontrol eden moleküler bir saat gibi rol oynamaktadır. Hayflick limitinde, bir veya daha fazla

kritik derecede kısalmış olan telomer replikatif yaşlanma ya da ölüm aşaması 1 (M1=Mortalite Evresi 1) olarak bilinen kalıcı büyüme duraksamasını tetiklemektedir. p53 gibi kritik hücre kontrol noktası genlerinin inaktivasyonu ile replikatif yaşlanmadan kaçan hücreler bölünmeye devam eder ve ikinci bir çoğalma bloğu, kriz ya da ölüm aşaması 2 (M2=Mortalite Evresi 2) sürecine ulaşıncaya dek daha fazla telomer kaybetmeyi sürdürür. Bu kriz sürecinden kaçarak hayatta kalan nadir hücreler telomer uzunluğunu koruyabilir. Bu çoğu hücrede telomeraz aktivitesi ile gerçekleştirilir ve bu da sınırsız çoğalma kapasitesine yol açar (Cong 2002).



Şekil 2.11. DNA Replikasyonu (Web1)



Şekil 2.12. Telomer kısalması ve hücresel yaşlanma (Miroğlu 2001)

2.4.Telomeraz Enzimi

Telomeraz (terminal transferaz), ökaryotik kromozomların telomerlerine telomerik tekrarların eklenmesini sağlayan ribonükleoprotein yapıda bir ters transkriptazdır.

Telomer sentezindeki aktiviteyi bulan ilk kişi olan Barbara McClintock , özel mısır dokularında kromozom uçlarının iyileştirilme işlevini belirtmiştir. Greider ve Bluckburn, Bluckburn laboratuvarında Tetrahymena hücrelerinden bir özüt hazırlamış ve buna kısa telomerik DNA dizileri ve radyoaktif işaretli nükleotidlerin olduğu bir karışım eklemişler ve başlangıçta ekledikleri DNA fragmentlerinin uzunluklarında değişiklik olduğunu, radyoaktif işaretli nükleotidlerin bu dizilere eklendiğini görmüşlerdir. Böylelikle telomeraz , 1985 yılında bu iki araştırmacı tarafından keşfedilmiştir (The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009; Miroğlu, 2011).

İnsanlarda telomeraz aktivitesine ilk kez servikal kanser hücre hattı olan HeLa' da rastlanmıştır. Normal insan somatik hücrelerinin çoğunda telomeraz aktivitesi bulunmazken, kanser hücrelerinin %90' ından fazlasında, bunun yanı sıra fetal, yeni doğmuş ve yetişkin testis ve ovaryumlarında telomeraz aktivitesinin bulunduğu gösterilmiştir. Fakat yaşlıların spermatozoa ve testislerinde rastlanmamıştır.

Telomerazın; telomerik DNA sentezi için kalıp görevi gören fonksiyonel RNA ünitesi olan insan telomeraz RNA'sı (hTR veya hTER) ve ters transkriptaz aktivitesine sahip katalitik alt ünitesi telomeraz ters transkriptaz (hTERT) olmak üzere 2 ana komponenti bulunmaktadır. hTR; kanserli hücrelerde normal hücelere göre beş kat daha

fazla ifadeye sahiptir. Ancak telomeraz aktivitesi ne olursa olsun tüm dokularda yüksek oranda ifade edilmektedir.

Tersine katalitik bileşen hTERT (mRNA) ifadesi ; hücre başına en az 1 ila 5 kopya olarak tahmin edilmektedir ve hücrelerdeki telomeraz aktivitesi ile yakından ilişkilidir. hTERT normal hücrelerde genellikle baskılanmış iken, ölümsüz hücrelerde etkinliği artmıştır. Bu da enzim aktivitesi için hTERT'in ana belirleyici olduğunu göstermektedir (Bozcuk 2002; Cong 2002; Miroğlu 2011).

2.4.1.Telomerazın Yapısı ve Fonksiyonu

Telomerazın RNA bileşeni telomer tekrarlarına spesifik kısa şablon dizisi içerir ve bu telomerazın enzim aktivitesi için gereklidir (Chen 2000).

Blackburn laboratuvarlarında protozoa telomerazı kullanılarak yapılan çalışmalarda telomer tekrar dizilerinin (omurgalılarda TTAGGG, siliatlarda TTGGGG) TER içindeki RNA şablonu üzerinden sentezlendiği gösterilmiştir. TER, türler arasında boyut ve dizilim açısından farklılıklar göstermektedir. Siliatlarda yaklaşık 150 nükleotid (nt), mayalarda yaklaşık 930-1300 nt iken omurgalılarda yaklaşık 450 nt uzunluktadır (Theimer 2006).

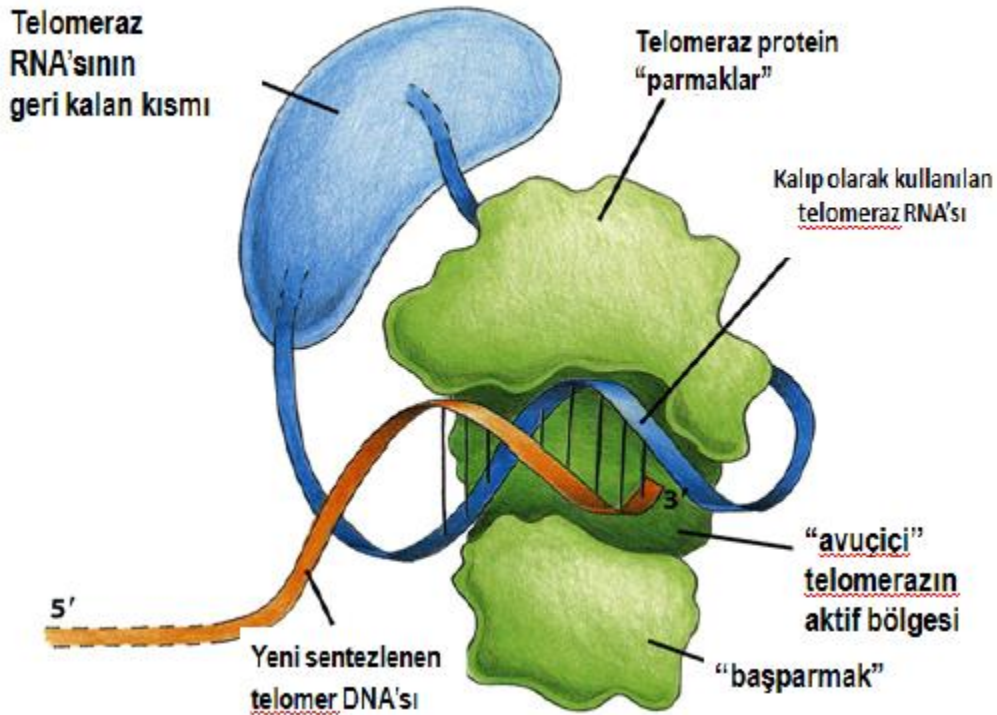
Telomeraz enziminin katalitik alt ünitesi olan hTERT, ilk olarak protozoalardan Euplotes 'de Thomas R. Cech'in grubu tarafından saflaştırılmıştır. Dizi analizleri katalitik alt birimin ters transkriptaz (RT) içerdiğini göstermiştir. Sonrasında, RT -bölgesindeki korunmuş dizilere dayanarak, hemen hemen eş zamanlı olarak Thomas R Cech ve Robert A Weinberg grupları tarafından insanlardaki hTERT analogunu kodlayan cDNA tanımlanmıştır (Paranjape 2010).

hTERT , 127 kDa'luk büyük bir proteindir. hTERT geni yaklaşık 40 kb'dır ve insan diploid hücrelerinde tek kopya olarak 5p15.33' te bulunmaktadır (Dikmen 2006).

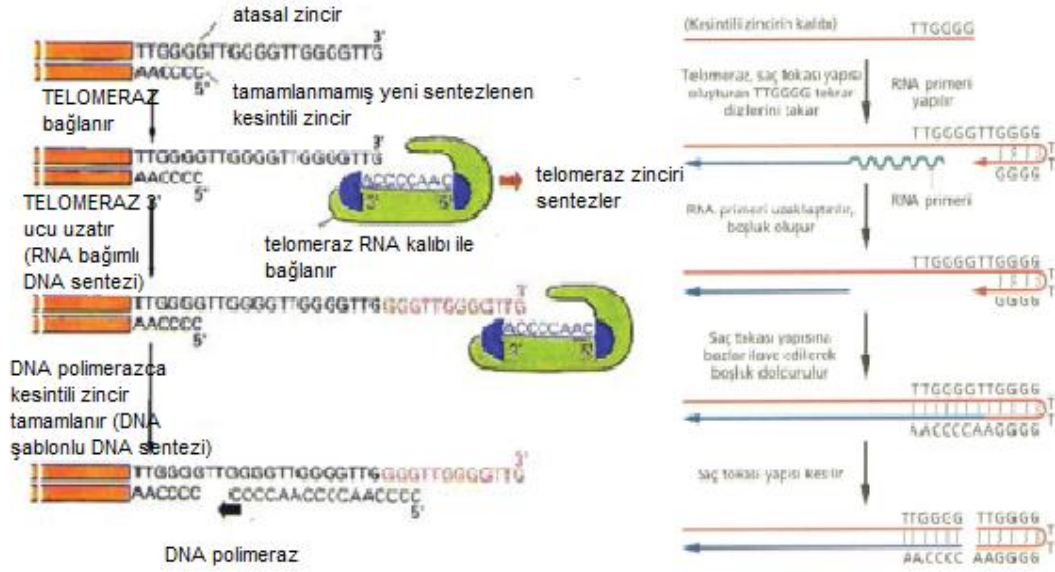
İnsan dokularından ve hücre hatlarında yapılan çeşitli çalışmalardan elde edilen kanıtlar hTERT mRNA ifadesi ve telomeraz aktivitesi arasında ilişki olduğunu göstermiştir (Urquidi 1998).

Tetrahymena telomerazı 3'-AACCCCAAC-5' dizisini çeren 159 nükleotid uzunlukta bir RNA'ya sahiptir. Bu dizi Tetrahymena uç tekrarlarının (5'-TTGGGG-3') tamamlayıcısıdır. Telomeraz bu RNA'nın avuç içi kısmında yer alan , 1.5 telomer tekrarına

(9 baz uzunlukta) karşılık gelen kısmını kalıp olarak kullanarak DNA'nın 3' çıkıntısını uzatır. Telomeraz, DNA'daki 3' çıkıntıda kendine uygun yere bağlanır ve 3'ucu kendi RNA'sına uygun olarak uzatır, sonrasında da oradan ayrılır. Eklenen diziler saç tokası gibi kıvrılır ve karşı karşıya gelen G 'ler arasında hidrojen bağları kurularak yapının dayanıklılığı sağlanır. Sonra tamamlayıcı iplik , polimeraz α - primaz kompleksi tarafından , primazca üretilen RNA primerleri kullanılarak sentezlenir. RNA primerleri uzaklaştırıldığında artık DNA polimeraz'ın boşluğu doldurması için iş görecektir 3' OH ucu oluşturulmuştur. Klasik DNA replikasyonunda olduğu gibi, primaz önce bir primer ekler ve sonrasında da DNA polimeraz primer ile 5' uç arasındaki boşluğu doldurur. Sonrasında saç tokası yapısı kırılır ve atılır. Son olarak, 5' uçtaki primer bu kısımdaki bir 5'-3' ekzonükleaz ile uzaklaştırılarak tekrar yeni bir 3' kuyruk oluşturulur ki bu ökaryot kromozomların ucunda halkalar oluşturur. Böylelikle replikasyon döngüsü sonucu DNA kaybı engellenmiş olur (Cooper 2006 ; Miroğlu 2011).



Şekil 2.13. Telomeraz proteinin yapısı (Güzelgül 2011)



Şekil 2.14. Tetrahymena’da telomerin uzama mekanizması (Miroğlu 2011)

2.4.2. Telomeraz İlişkili Proteinler

Telomeraz ilişkili proteinler ilk olarak *Tetrahymena thermophila*’da tanımlanmıştır. İki protein p80 ve p90 telomeraz aktivitesinin kopürifikasyonu ve telomeraz RNA ile ilişkisiyle tanımlanmıştır. Yeni bir çalışmada *Tetrahymena* içinde telomeraz aktivitesi ve telomeraz RNA düzeyleri tamamen normal olan , p80 ve p90 dan yoksun suşlar olduğu gösterilmiştir. Bu da bu proteinlerin çekirdek telomeraz bileşenlerinden olmadığını, farklı bir ribonükleoprotein olabileceğini ileri sürmektedir. Memelilerde p80 analogu telomeraz ilişkili protein 1 (TEP 1) dir. Telomeraz aktivitesi ile ilişkilidir ve insan, fare ve ratlarda tanımlanmıştır. TEP1 , p80 den daha büyüktür. TEP1’in amino ucundaki 900 aminoasit p80 ile homoloji gösterir ve telomeraz RNA ile etkileşmektedir. Telomeraz aktivitesi ne olursa olsun çoğu dokuda TEP1’in ifade edildiği saptanmıştır. TEP1 'in telomeraz ve diğer ribonükleoproteindeki rolü halen tam olarak bilinmemektedir.

p23, hTERT ile ilişkili tanımlanmış ilk moleküler şaperondur. Sonrasında, p23 ve p90 'ın hem in vitro hem de memeli hücrelerinde hTERT ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

hTR bölgesindeki korunmuş alanın hTR'ye bağlanan proteinler için tanıma bölgesi olduğu tahmin edilmektedir. Çeşitli RNA'ya bağlanan proteinlerin hTR ile ilişkili olduğu

gösterilmiştir. Bu proteinler, RNA stabilitesi, matürasyonu , pre-RNA işlenmesi ve lokalizasyonunda yer alan küçük ribonükleoprotein kompleksi (snoRNP) ve heterojen nükleer protein kompleksinin bileşenleridir. 4 ortak H/ACA snoRNA bağlayıcı proteinlerin (hGAR1, dyskerin/NAP57, hNOP10 ve hNHP2) hTR ve telomeraz aktivitesi ile ilişkili olabileceği bulunmuştur (Cong 2002).

Tablo 2.3. İnsanlarda telomerazla ilişkili proteinler (Cong 2002)

protein	Etkileşim bölgesi	fonksiyon
hTERT ilişkili		
TEP1	aa 1–350, 601–927	bilinmiyor
P23/p90	aa 1–195	montaj/konformasyon
14-3-3	aa 1004–1132	nükleer lokalizasyon
hTR ilişkili		
TEP1	nt 1–871	bilinmiyor
hGAR1	hTR H/ACA domain	stabilite, matürasyon, lokalizasyon
Dyskerin/NAP57	hTR H/ACA domain	stabilite, matürasyon, lokalizasyon
hNOP10	hTR H/ACA domain	bilinmiyor
hNHP2	hTR H/ACA domain	stabilite, matürasyon, lokalizasyon
C1/C2	nt 33–147	stabilite, matürasyon, lokalizasyon
La	nt 1–205, 250–451	telomerlere ulaşılabilirlik?
A1/UP1	nt 1–208	bilinmiyor
hStau	nt 64–222	telomerlere ulaşılabilirlik?
L22	nt 64–222	hTR işlenmesi, lokalizasyon?

* aa, amino asit; nt, nükleotid

2.5.Kanser ve Telomeraz

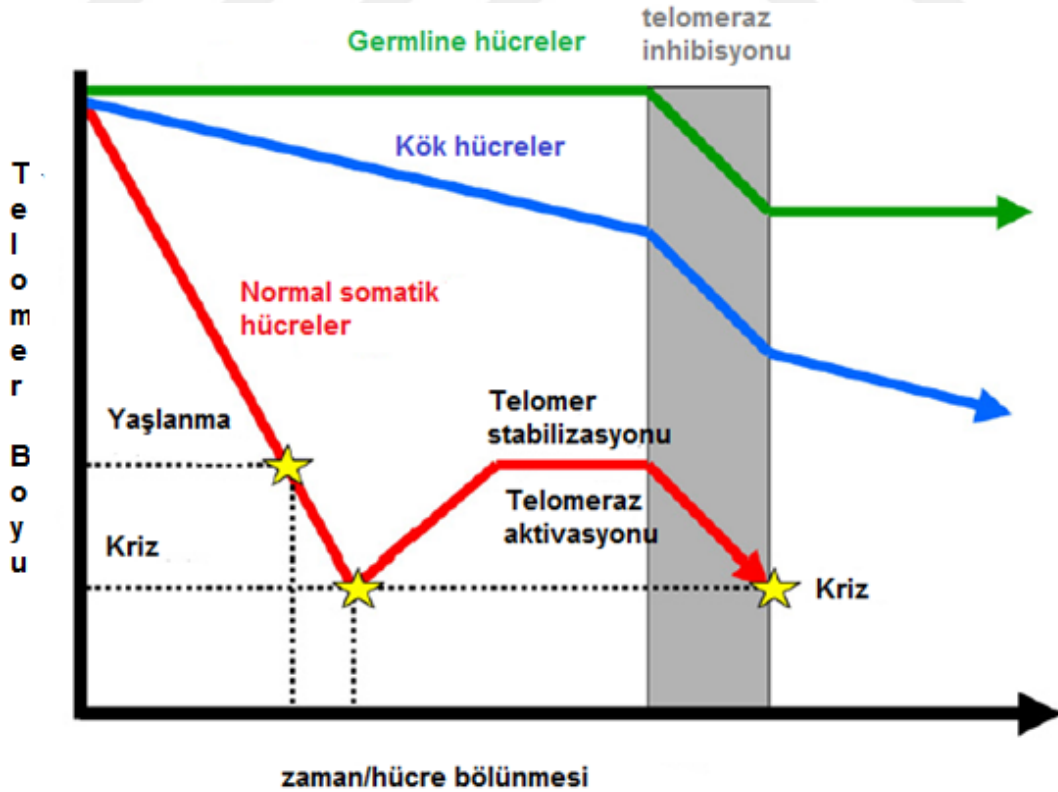
Tümör oluşumu, dinamik, çok aşamalı bir süreçtir. Bu aşamalar, normal hücrelerin ilerleyici şekilde malign türevlerine dönüşümünü destekleyen genomik değişiklikleri içermektedir. Kanserle ilgili hücresel deneylerde bu hücrelerde çeşitli farklılıkların olduğu gözlenmektedir. Bunlardan birisi de kanserli hücrelerin sınırsız çoğalabilme kapasitesidir (Hanahan 2000).

Normal hücrelerde, telomerler kritik bir kısalığa ulaştığında hücre buna replikatif yaşlanma ile cevap verir. En azından memelilerde, yaşlanma cevabı tümörögenезisi baskılayan mekanizmalardandır (Campisi 2001).

Normal memeli somatik hücreleri, in vitro koşullarda belli sayıda bölünebilirler. Bu maksimum bölünme sayısına "Hayflick Limiti" denir. Proliferasyon limiti mitotik saat olarak da adlandırılabilir. İnsan hücrelerinde yaşlanma ve ölüm iki evrede gerçekleşir.

M1 evresi; telomerin belirli kritik bir kısalığa ulaşması sonucu hücre bölünmesi durur ve yaşlanma başlar. Bu noktada telomer boyu korunabilirse hücre yaşlı olarak

hayatını sürdürebilir. Bu evre p53 ve pRb gibi tümör baskılayıcı proteinlerle kontrol edilir. Bu proteinleri inaktive edebilen E6 gibi viral onkoproteinler, telomerik erozyonların tanınmamasına ve bu tip hücrelerin M2 evresine geçmesine neden olur. p53 ve pRb her ikisi de inaktif olduğunda, telomerler çok fazla kısalıncaya kadar çoğu hücrenin bölünmeyi sürdürebildikleri kriz olarak adlandırılan kararsız bir sürece girmiş olurlar. Kriz aşamasındaki hücreler çoğalmayı sürdürme eğilimindedir ancak telomer erozyonu ve kromozomal kararsızlığın çok ağır olması nedeniyle sıklıkla ölürlür. Kriz periyodu hücre büyümesi ve hücre ölümü arasında bir dengenin olduğu evredir. Kriz sürecinden kaçarak hayatta kalan nadir hücre telomer uzunluğunu koruyabilir. Hücre M2 noktasını aşarak ölümsüzleşir ve bölünmeye devam eder. Bu durumda maligniteye dönüşüm açısından oldukça artmış bir risk söz konusudur. Kriz aşamasından kaçan hücreler telomer stabilitesi (telomerlerin boyu oldukça kısadır) ve telomerase aktivasyonu gibi bazı özelliklere sahiptirler. Ayrıca başlangıçta çok kısa telomerlere sahip ancak hala preneoplastik aşamada olan hücreler genomik kararsızlığa neden olabilirler. Bu da ilerleyici hastalığa yol açabilmektedir. Genomik kararsızlığın malign dönüşüm sürecine götürdüğü büyük ölçüde kabul edilmiştir ve çoğu insan kanser hücresi değişmiş kromozomal yeniden düzenlemeye sahiptir (Campisi 2001; Dikmen 2003; Chen 2011; Miroğlu 2011).



Şekil 2.15. Hücresel yaşlanma ve ölümsüzlük (Sekaran 2010)

Telomerik uzunluğun korunması, tümör hücrelerinin yaşlanmadan kaçışı için kabul gören önemli mekanizmalardandır. Çoğu hücrede bu telomeraz ifadesinin arttırılması ya da yeniden aktive edilmesi yoluyla sağlanmaktadır. Telomeraz aktivitesinin saptanmasına yönelik yöntemler kullanılarak çeşitli insan kanserleri analiz edilmiş, hem in vivo hem in vitro olarak telomeraz aktivitesi ile tümör malignitesi arasında ciddi bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Chen 2011).

Kim ve arkadaşları 1994' de hücre ve dokulardaki telomeraz aktivitesini saptamak için telomerik tekrar amplifikasyon protokolü (TRAP) yöntemini geliştirmişler ve 24 farklı dokuda çalışarak kanser ve telomeraz aktivitesi arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Bugüne kadar incelenen farklı tipte tümörlerin %85' inden fazlasında telomeraz aktivitesinin gözlenmesi, telomerazın tümör hücrelerinde reaktif olduğu göstermektedir (Dikmen 2003).

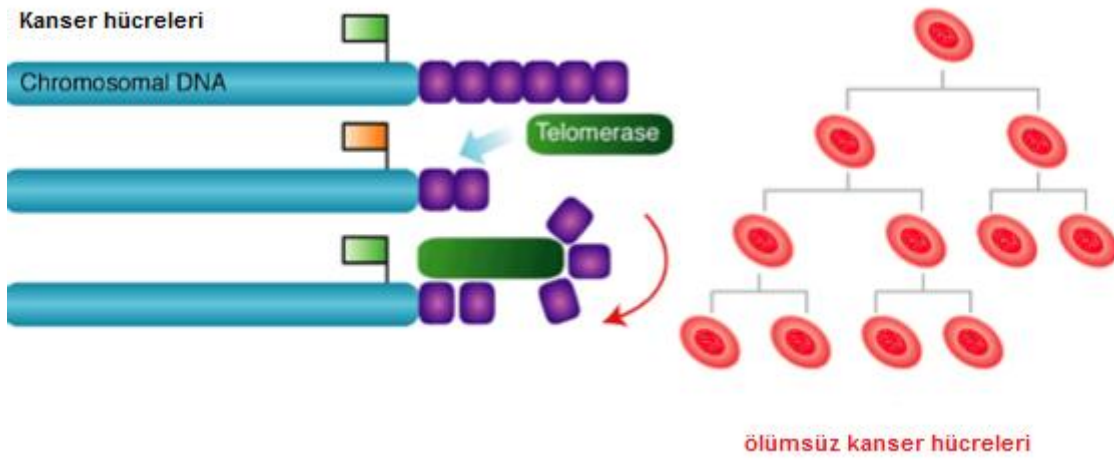
Buna ek olarak telomeraz bazı premalign dokularda da aktive edilir. Bu nedenle yüksek riskli hastaların taramalarında telomeraz aktivite testleri kullanılması umulmaktadır. Bu nedenle, malignitenin en ileri aşamasında olsa dahi hangi kanserler erken dönemde güçlü telomeraz aktivitesine sahip, hangilerinde telomeraz aktivitesi hiç yok ya da çok az miktardadır, bunları saptamak önemlidir (Chen 2011).

Telomerazın tüm tümörlerin %90' ından fazlasında tespit edilmesi ve prognozla ilgili bilgi verebilmesi , telomerazı kanser tanısı, tedavisi ve prognoz tayini için çekici bir hedef ve işaretleyici yapmaktadır.

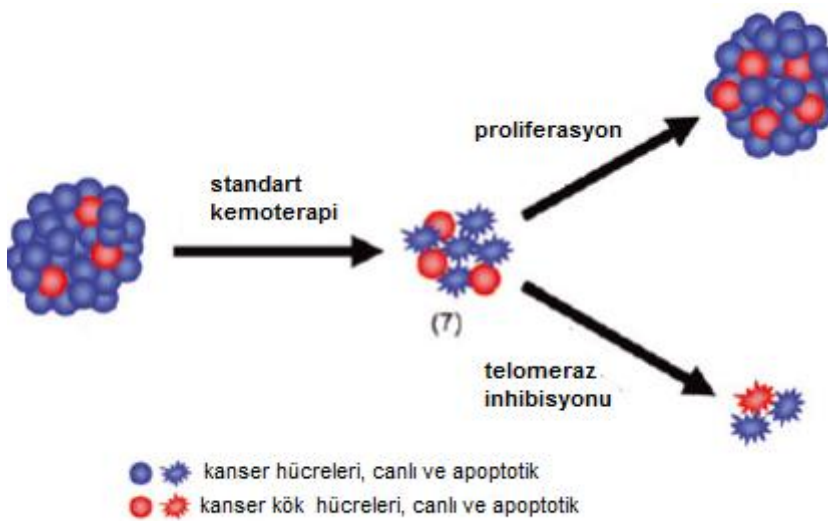
İdeal kanser tedavisi spesifik olarak kanserli hücreleri hedeflemelidir. Normal hücreler üzerinde etkisi minimal düzeyde olmalı ya da hiç olmamalıdır. Hemen hemen tüm kanserlerde telomeraz aktivitesi gözlenirken, çoğu normal insan hücresinde telomerazın sessiz olması telomerazı kanser tedavisi için neredeyse evrensel bir hedef olarak ortaya çıkarmaktadır. Çoğu somatik hücrede telomeraz aktivitesinin bulunmamasından dolayı , geleneksel kemoterapotik yaklaşımlarla karşılaştırıldıklarında, telomeraz temelli tedaviler daha spesifik, yan etkileri daha az ve daha az toksik olmalıdır. Bu da telomerazın hedeflenmesini yeni kanser tedavi yaklaşımlardan birisi haline getirmektedir (Shay 2011).

Telomeraz eksprese eden kanser hücrelerinin anti-telomeraz ajanlarla inhibe edilmesi, telomer boylarını kısaltır. Etkin telomeraz kısalması gerçekleştiğinde, hücreler yaşlanma ya da kriz sürecine girerler.

Kanser tedavisinde kullanılan standart tedaviler, ille de kanser kök hücrelerini yok etmeye yönelik değil, kümelenmiş tümör hücrelerini öldürmek için optimize edilmiştir. Standart kemoterapi sonrası, hayatta kalan kanser hücreleri kanser kök hücre bakımından zenginleşmiş hale gelebilir. Böylelikle çoklu bölünmeler sonrası bu hücrelerden yeni tümör oluşumu meydana gelebilmektedir. Hastalar kemoterapiyi takiben telomeraz inhibitörleri ile tedavi edilirse , bu kalan kanser kök hücrelerinin bölündüklerinde telomerik DNA' larının kısalması , böylelikle de belirli sayıdaki bölünme sonrasında kriz sürecine girmesi beklenmektedir. Telomeraz inhibitörü kullanımından beklenti, daha kalıcı yanıtlara yol açabilmesidir (Quellette 2011).



Şekil 2.16. Kanserli hücrelerde telomeraz aktivitesi ve ölümsüzlük (Miroğlu 2011)



Şekil 2.17. Kanser tedavisinde telomeraz inhibitörleri (Quellette 2011).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda ,yapacağımız çalışmada normal kolon mukozası, ÜK hastalarındaki inflame kolon dokusu ile KRK olgularından alınan tümörlü doku örneklerinin telomeraz aktivitesi yönünden karşılaştırılması amaçlanmıştır. KRK ve ÜK'li dokularda benzer şekilde artmış telomeraz aktivitesi bulunması durumunda, telomeraz aktivitesinin değerlendirilmesi ,ÜK hastalarında KRK gelişimi açısından marker olarak kullanılabilir. Ayrıca telomeraz inhibitörü ajanlar kullanılarak sürecin ilerlemesinin durdurulabileceği, yine KRK hastalarında bu ajanların tedaviye eklenmesi ile daha kalıcı yanıtlar elde edilebileceği umulmaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Araştırmanın Tipi

Araştırma prospektif vaka-kontrol klinik çalışmadır.

3.2.Araştırma Bölgesi ve Zamanı

Hasta grubu, 2015-2016 yıllarında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ve Gastroenteroloji Kliniklerine başvuran , kolorektal tümör ya da ülseratif kolit tanısı alan hastalardan oluşmaktadır ve kontrol grubu olarak da aynı hastaların normal kolon dokuları hedeflenmiştir.

3.3.Araştırma Evreni ve Yeri

Bu araştırmada, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ve Gastroenteroloji Kliniklerine başvuran , kolorektal tümör ya da ülseratif kolit tanısı alan hastalar araştırma evrenini oluşturmaktadır. Araştırma uygulaması Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı bünyesindeki Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi Moleküler laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.4. Örneklem Seçme Kriterleri

Hasta grubunda;

- Klinik muayene ve patolojik inceleme sonucunda kolorektal kanser ya da ülseratif kolit tanısı almış olmak
- Kolorektal kanser açısından radyoterapi ya da kemoterapi tedavisi almamış olmak
- Araştırmaya katılmaya gönüllü olmak

Kontrol grubunda;

- Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireyler aynı kişilerdir

3.5. Çalışma Gruplarının Randomizasyonu

Araştırmanın yapıldığı bölgede örneklem seçme kriterlerine uygun belirlenen 28 kolorektal kanser hastası ,27 ülseratif kolit tanılı hastadan alınan tümörlü doku ve inflame kolon dokusu örnekleri ile bu bireylerin normal kolon dokuları araştırma kapsamına alınmıştır. Aynı işlem esnasında alınan kolorektal kanser ve inflame doku örnekleri patolojik olarak teyit edilmiş, nonspesifik kolit şeklinde değerlendirilen olgular çalışmaya dahil edilmemiştir. Araştırmaya ilk dahil edilen bireylerin uygulama aşaması başlatılmış ve yeni dahil edilenlerle sürdürülmüştür. Bu aşama toplam 6 ay sürmüştür.

3.6. Araştırma Öncesi Bilgilendirme

Hasta ve kontrol gruplarına öncelikle araştırmaya dahil olma kriterleri anlatılmıştır. Kriterlere uygun bireylere, ameliyat esnasında kanserli doku ve normal kolon dokusundan ya da kolorektal kanser tanılı hastalardan yapılan biyopsi esnasında ve önceden tanı almış ülseratif kolitli hastaların rutin takipleri esnasında uygulanan kolonoskopik biyopsi örnekleri alınırken birer adet biyopsi örneğinin de tez çalışmasında kullanılmak üzere alınacağı ve bu dokulardaki telomeraz aktivitesinin araştırılmasının amaçlandığı anlatılmıştır. Çalışmanın tamamen gönüllülük esasına dayandığı ve doku verseler dahi istedikleri zaman çalışmadan çıkabilecekleri özellikle ifade edilmiştir. Gerekli bilgiler verildikten sonra çalışmaya katılmak isteyen ve kriterlere uyan bireylere gönüllü onam formları okutulup imzalatılmıştır (Ek-1).

3.7.Araştırmanın İzni ve Etik Durum

Araştırmaya başlamadan önce Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'ne bağlı Etik Kurul komisyonuna yapılacak tüm işlemleri bildiren detaylı bir çalışma protokolü sunulmuştur. Etik kurul onayı 19.06.2015 tarih ve 2015/269 sayılı kararı ile alınmıştır (Ek-2, Ek 3)

3.8.Telomeraz Aktivitesini Belirlemede Kullanılan Yöntemler

Telomeraz aktivitesi saptamak amacıyla birçok yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen ilk yöntem telomerik tekrarların polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması esasına dayanan TRAP yöntemiştir. Daha sonra geliştirilen birçok modifikasyon ile TRAP yönteminin klinik uygulamalarda daha hassas ve güvenilir olması amaçlanmıştır.

3.8.1. Telomerik Tekrar Amplifikasyon Yöntemi (TRAP)

Bu yöntem 1994 yılında Kim ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Eğer hücre ve dokulardan elde edilen içerik telomeraz içeriyorsa, ortama konan özel primerler telomeraz ile uzatılır. Sonrasında telomerazca sentezlenen uzatılmış DNA 'lar PCR ile çoğaltılır. Ürünler spektroforetik olarak ayrılır. Radyoaktif işaretli primerler kullanılarak ya da radyoaktif işaretli dCTP' ler PCR ortamına eklenerek telomeraz ürünlerinin görüntülenmesi sağlanır. Miktar saptaması çok hassas değildir, sonuçlar telomeraz negatif veya pozitif olarak değerlendirilir. Yöntemin uygulanışı şekil 3.1.' de gösterilmiştir.

1. Telomerazlı ortamda non-telomerik oligonükleotid primerin (TS) uzatılması

TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3')

2. "Hot start" PCR amplifikasyonu ile homojenat içindeki telomeraz tarafından uzatılan primerlerin çoğaltılması sağlanır ve 6 bazlık DNA ladder'ları elde edilir. "Reverse" primer (CX) sadece telomeraz tarafından eklenen TTAGGG tekrarlarıyla hibrid yapar.

CX (5'-(CCCTTA)₃CCCTAA-3')

Hot start tüplerin hazırlanması.

↓ (mum) ile

Hücre ya da doku homojenatı

↓

TRAP karışımının hazırlanması

↓

3 evreli PCR amplifikasyonu

(31 döngü)

↓ 94-50-72 °C

Mumun dökülmesi ve yeni tüplere aktarma

↓

Boyanın eklenmesi (loading)

↓

% 10 PAGE

↓

Fiksasyon

↓

Phosphorimaging

(Toplam 20-24 saat alır.)

Şekil 3.1.TRAP yönteminin uygulanışı

TRAP'da karşılaşılan zorlukları aşabilmek ve uygulamaları kolaylaştırmak için zamanla modifiye yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar TRAP-eze ve TRAP-eze ELISA yöntemleridir (Durusoy 2003).

3.8.2.TRAP-eze ELISA Yöntemi

Amplifikasyon sonrası DNA kolorometrik olarak belirlenir. Telomeraz enzimi biotin işaretli 'forward' primerinin 3' ucuna telomerik tekrar dizilerini ekler. Uzayan primerler PCR ile çoğaltılır. PCR ürünleri denatüre edilir ve telomerik tekrar dizileri ile hibridize olan digoksinin ile hibridize edilir. Bu ürünler streptavidin kaplı mikropatlara biotin işaretli primerler aracılığıyla bağlanır. Plaklara bağlı ürünler anti-digoksinin -peroksidaz ile kompleks oluşturur. Peroksidaz substratı renkli oksidasyon ürünlerine dönüştürülür ve örneklerin absorpsanları 450 nanometre(nm) ve 620 nm'de plak okuyucuda okunur (Durusoy 2003).

3.8.3.Floresan-TRAP Yöntemi

Aldouys ve Grabill telomeraz aktivitesini saptamak için radyoizotopların elimine edilmesini amaçlayarak floresans işaretli problemler kullanmışlardır (Durusoy 2003).

3.8.4.Stretch-PCR Yöntemi

Bu yöntemde PCR'a dayanan yöntemlerde her zaman karşılaşılabilecek olan forward ve revers primerlerin birbiriyle hibridize olabilmesi ve revers primerlerin telomerazla uzatılmış tekrar dizilerle hibridizasyonu sonucu kısa PCR ürünlerinin oluşabilmesi sorununu ortadan kaldırabilmek için özel dizayn edilmiş primerler kullanılmıştır. Forward ve revers primerler 3' uçlarında eşleşmeyen bir baz çifti içerirler. Böylelikle primer dimerleri oluşsa bile uzamayı engeller. Telomeraz enzimi yalnızca dimer oluşturmayan forward primeri uzatır (Durusoy 2003).

3.8.5. PicoGreen Yöntemi

PCR ürünlerine zaman alıcı jel elektroforezi gibi işlemler uygulanmaz. PCR ürünleri PicoGreen ile muamele edilir. Yöntem floresan bir boya olan PicoGreen'in seçici olarak çift zincirli DNA'ya bağlanması esasına dayanır. Spektrofotometre ile floresans okunur. Telomeraz aktivitesini belirleyen DNA miktarı ; saptanan DNA miktarından negatif kontrolde saptanan DNA miktarının çıkarılması ile hesaplanır (Durusoy 2003).

3.8.6. Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Yöntemi

Telomeraz bileşenleri hTR ve hTERT mRNA düzeylerinin saptanabilmesi enzim aktivite çalışmalarında yeni bir yaklaşım olmuştur. Yajima ve arkadaşları hTR' nin ifade edilme düzeyini saptamak için RT-PCR yöntemini geliştirmişlerdir Bu sistemde spesifik PCR ürününün değerlendirilmesinde DNA polimerazın 5'→3' ekzonükleaz aktivitesinden yararlanılır. Bu işlem için birleştirilmiş PCR ve floresans dedektör kullanılır. Floresansdaki artış sürekli olarak optik monitörden izlenir. Bu yöntemde PCR sonrası hiçbir işlem yapılmaz. Sonuçların hesaplanmasında standart eğriden yararlanılır (Durusoy 2003).

3.8.7. Transkripsiyon Aracılı Amplifikasyon ve Hibridizasyon Koruma Yöntemi (TMA/HPA Yöntemi)

Bu yöntem RNA'larla hibridize olmuş ve olmamış problemlerin farklı hidroliz olmaları ve telomeraz tarafından uzatılacak primere promotor eklenmiş olması esasına dayanır. Promotor primerle telomerik tekrarların birleşme noktasına komplementer olan akridinyl ester-işaretli problemler hazırlanır ve kullanılır. Luminometre ile kemiluminesans ölçülür (Durusoy 2003).

3.8.8. TRAP-eze Yöntemi

Bu yöntemde enerji transfer primerleri (Amplifluor™ primer) kullanılmaktadır. Bu primerler yalnızca TRAP PCR ürünleri ile bir araya geldiklerinde ışımaya yayarlar. Ticari

kitler mevcuttur. Bu kitlerde; sırasıyla floresan ve sülforodamin ile etiketlenmiş amplifiye telomeraz ürünleri ve internal PCR kontrolünün her ikisini de saptamak için amplifluor primerleri uygulanır. Amplifluor primerleri , 3' uçta hedef diziye komplementer bir dizi ve 5' uçlarında saç tokası yapısı içerirler. Florofor (enerji verici) ve söndürücü dabsyl (dimetilaminobenzenesulfonyl, 4-dimetil-aminobenzene-4'sulfonyl) 5' saç tokası yapısı içinde birbirine oldukça yakın bulunmaktadır. Primerler çift zincirli PCR ürünleri içerisine dahil olduğunda saç tokası yapısı polimeraz tarafından açılır. Bu durumda florofor ile söndürücü arasındaki mesafe artar ve floresan sinyal oluşur. İkinci bir floroforla işaretlenmiş internal kontrollerin varlığı , PCR amplifikasyonunun izlemi için kaynak sağlar ve telomeraz aktivitesinin miktar tayinine yardımcı olur. Tüm aşamalar kapalı PCR sistemlerinde gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem kontaminasyon riskini oldukça azaltmaktadır. PCR sonrası işlemlere (jel elektroforez gibi) olan gereksinimi ortadan kaldırarak analizlerin daha kısa sürede gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır (Fajkus 2006).

Biz de çalışmamızda telomeraz aktivitesinin miktar tayininde kullanılabilmesi ve PCR sonrası işlemlere gereksinim duyulmaması sebebiyle bu yöntemi kullandık.

3.9.Doku Özütlerinin Hazırlanması

- İçerisinde 100-200 ünite(Ü)/ ml konsantrasyonda RNAase inhibitörü olacak şekilde RNAase inhibitörü + CHAPS Liziz tamponu hazırlandı.

- Özüt hazırlamak için -80 C °'den çıkarılan örnekler hazırlanan 200 µl' lik RNAase inhibitörü +CHAPS liziz tamponu karışımının içerisine konuldu.

- Mekanik etki ile homojenizasyona yardımcı olması için RocheMagna Lyser Green Bead (şekil 3.2) kullanıldı.

- Eritilen yaklaşık 50 mg doku örneği soğuk ortamda mekanik homojenizatör ile homojenize edilerek 200 µl xLiziz tamponu ile muamele yoluyla süspansiyon haline getirildi.

- Süspansiyon 30 dakika buz üzerinde bekletildi.

- Sonrasında +4 C koşullarında 12.000 devirde 20 dakika santrifüjlendi.

- Süpernatant kısmı alınıp protein konsantrasyonları ölçüldü.

- Özütlerdeki protein miktarı Bradford yöntemi ile saptandı.



Şekil 3.2. Roche Magna Lyser Green Bead

3.10. DNA Standardının Hazırlanması

- Merck Millipore TRAPeze Kit RT Telomeraz saptama kiti (S7710) içerisinde bulunan TSK' nın seri dilüsyonları kullanılarak standart eğri oluşturuldu.

- Kit içerisinde bulunan stok konsantrasyonu 0,2 amol/ μ l olan TSK çözeltisinden CHAPS liziz tamponu kullanılarak sırasıyla 0.02, 0.002 ve 0.0002 amol/ μ l konsantrasyonlarda olacak şekilde standart DNA serisi hazırlandı.

Tablo 3.1. DNA standart eğrisinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarı

TSK Konsantrasyonu	TSK stok solüsyonu miktarı	CHAPS liziz tampon miktarı
1-0.2 amol/ μ l	Dilüsyon yok	-
2- 0.02 amol/ μ l	2 μ l # 1.	18 μ l
3- 0.002 amol/ μ l	2 μ l # 2.	18 μ l
4- 0.0002 amol/ μ l	2 μ l # 3.	18 μ l

3.11. Pozitif Kontrol Örneğinin Hazırlanması

- Kit içerisinde sağlanan telomeraz pozitif hücre özütüne 200 µl CHAPS liziz tamponu eklenerek 10^6 hücre / µl olacak şekilde dilüe edildi.

- Hazırlanan solüsyon kullanılmadan önce CHAPS liziz tamponu ile 1:10 şeklinde dilüe edildi ve her TRAPeZe® RT deneyi için 2 µl kullanıldı (2 µl=1000 hücre).

3.12. RealTime PCR yönteminin uygulanması

- Telomeraz aktivitesi tayini için; telomeraz aktivitesinin eş zamanlı kantitasyonu ve florometrik ölçümü için oldukça duyarlı bir in vitro yöntem olan Merck Millipore TRAPeZe® Kit RT Telomerase Detection Kiti (S7710) kullanıldı.

-Öncelikle aşağıda belirtilen reaktifler belirtilen oranlarda karıştırılarak 2 ayrı Master Mix hazırlandı (tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Master mixlerin hazırlanışı

5X TRAPEZE® RT Reaction Mix*	5.0 µl
Taq Polimeraz (5 units/µL)	0.4 µL (2 Units)
Nuclease Free Water	17.6 µL
Örnekler: (TSK dilüsyonları, Pozitif kontrol, Minus Telomeraz kontrol, NTC, deneysel örnekler)	2.0 µL
TOTAL VOLUME 25.0 µL	

5X TRAPEZE® RT Control Reaction Mix*	5.0 µL
Taq Polimeraz (5 ünite/µL)	0.4 µL (2 ünite)
TSK	2.0 µL
Nuclease Free Water	15.6 µL
Örnekler	2.0
TOTAL VOLUME 25.0 µL	

- Hazırlanan mixler vortekslendi.

- Plate üzerindeki ilk sütundaki herbir kuyucuğa 5X TRAPEZE® RT Reaction Mix kullanarak hazırladığımız Master Mixten 23 µL ve örneklerden (doku örnekleri, TSK dilüsyonları, telomeraz pozitif kontrol, Minus telomeraz kontrol= CHAPS liziz tamponu, NTC=çekirdeksiz su) 2'şer µL konuldu.

- İç kontrol amacıyla diğer sütunda yer alan kuyucuklara 23 µL 5X TRAPEZE® RT Kontrol Reaction Mix kullanarak hazırladığımız mix ile 2'şer µL örneklerden konuldu.

-Tüm aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi.

(Çalışma dizaynı tablo 3.3.de gösterilmiştir).

Tablo 3.3. Çalışma dizaynı

	1	2	3
A	TSK 0.2 amol/ µl	örnek1	örnek1
B	TSK 0.02 amol/ µl	örnek2	örnek2
C	TSK 0,002 amol/ µl	örnek3	örnek3
D	TSK 0,0002 amol/ µl	örnek4	örnek4
E	Pozitif kontrol	örnek5	örnek5
F	Minus Telomeraz Kontrol	örnek6	örnek6
G	NoTemplate Control (NTC)	örnek7	örnek7
H		örnek8	örnek8
	5X TRAPEZE® RT Reaction Mix	5X TRAPEZE® RT Reaction Mix	5X TRAPEZE® RT Kontrol Reaction Mix

- Reaksiyon karışımının konulduğu plate 1000 rpm’ de 1 dk santrifüj edildi (şekil 3.4.).

- PCR tüpleri ısı-döngü cihazı (Thermal cycler)(Primus 96 plus , MWG AG Biotech, Almanya)’ nda (şekil 3.3.) 30°C ‘ de 30 dakika bekletildi.

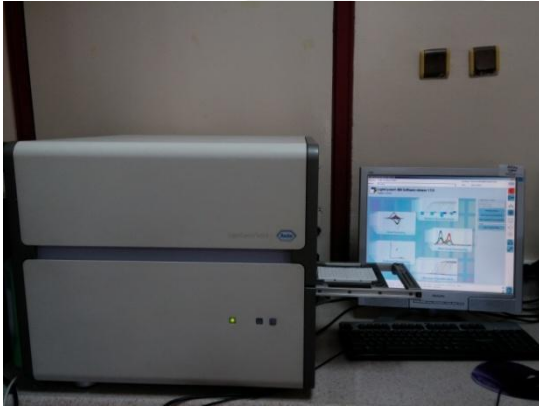
- Sonrasında LightCycler ® 480 (Roche) (şekil 3.5.) cihazına konarak protokole uygun program oluşturuldu.(Tablo 3.3)



Şekil 3.3. Isı döngü cihazı (Primus 96 plus, MWG AG Biotech, Almanya)



Şekil 3.4. Biosan LMC 3000 santrifüj cihazı.



Şekil 3.5. LightCycler® 480 (Roche)



Şekil 3.6. Plate'in cihaza yüklenmesi

Tablo 3.4.PCR programı

30°C	30 dakika	1 siklus
95°C	2 dakika	1siklus
45 siklus		
94°C	15 saniye	
59°C	60 saniye	
*45°C	10 saniye	

3.13. İstatistiksel Analiz

Araştırmadan elde edilen tüm veriler, bilgisayar ortamında SPSS 21.0 paket programı kullanılarak analiz edildi.

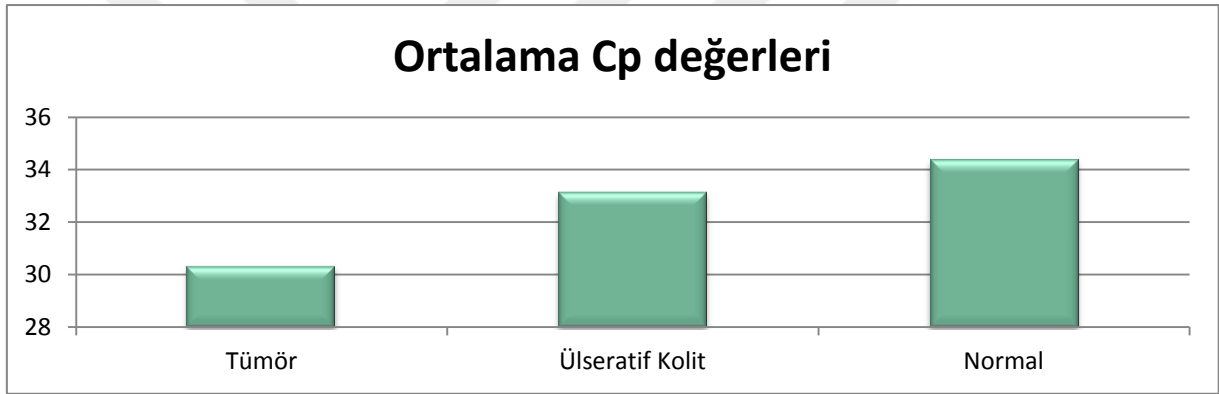
Çalışmamızda kolorektal kanserli doku, ülseratif kolitli hastalardan alınan inflame doku ve normal kolorektal mukoza olmak üzere 3 grup arasındaki telomeraz aktivitesi Kruskal wallis testi ile karşılaştırıldı. Kolorektal kanser ile komşu normal mukoza ve ülseratif kolitli inflame doku ile komşu normal mukoza arasındaki telomeraz aktivitesinin karşılaştırılmasında ise student t testi kullanıldı. Bütün test sonuçlarında, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Doku Örneklerinde Telomeraz Aktivitesinin Saptanması

28 kolorektal kanser, 27 ülseratif kolit, 44 normal doku olmak üzere toplam 99 örnekte Merck Millipore TRAPeze® Kit RT Telomerase Detection Kit (S7710) kullanılarak telomeraz aktivitesi değerlendirilmiştir.

Kruskal wallis testi ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda , bu 3 grup arasında anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir ($p=0,026$). Daha sonra yapılan ikili analizlerde aşağıda da görüleceği üzere bu farkın tümörlü doku ve normal doku arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu 3 dokunun ortalama Cp değerleri şekil 4.1. de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. 3 dokunun ortalama Cp değerleri

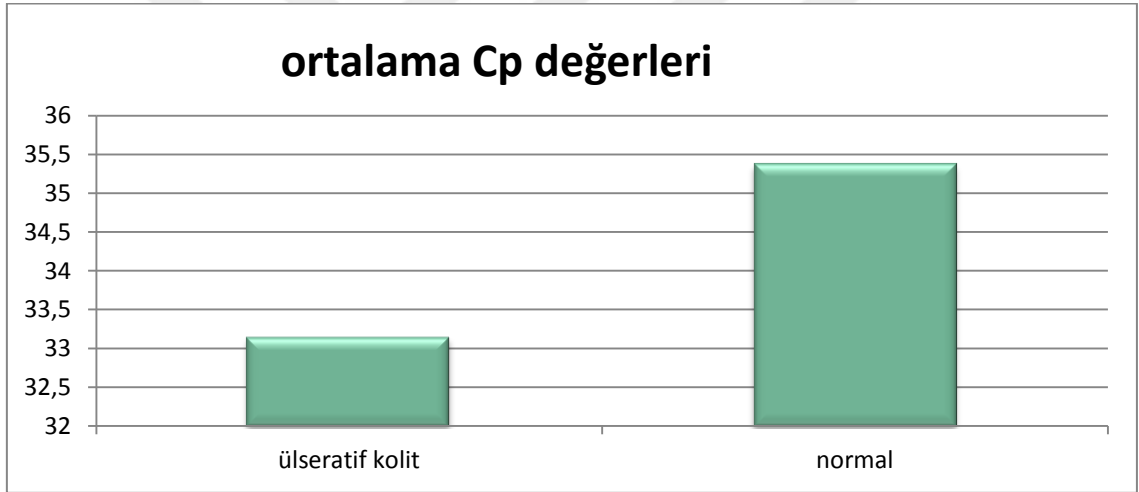
4.2. Ülseratif Kolit Olgularında Telomeraz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Çalışmaya yaş ortalaması $44,26 \pm 16,8$ (22-76) olan toplam 27 ülseratif kolit olgusu dahil edilmiştir. Bu bireylerden 10 tanesi (%37) kadın ve 17 tanesi (%63) erkek idi. 17 hastadan, bir adet ülsera mukoza dokusu ve bir adet de normal görünümlü komşu mukoza olmak üzere ikişer adet örnek alınmıştır. Kalan 10 hastadan ise pankolit olmaları nedeniyle normal doku alınamamıştır. Tüm dokularda telomeraz ölçümü gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3. ve 4.4. te görüldüğü üzere ülseratif kolit olgularının inflame dokularının Cp değerleri 26,4-42,3, komşu normal görünümlü mukozanın Cp değerleri ise 26,6-40,3 arasında idi. Ülseratif kolit dokusunun ortalama Cp değeri $33,15 \pm 4,46$ komşu normal dokunun ortalama Cp değeri ise $35,37 \pm 4,37$ idi (şekil 4.2.). Ülseratif kolit dokusundaki telomeraz aktivitesi

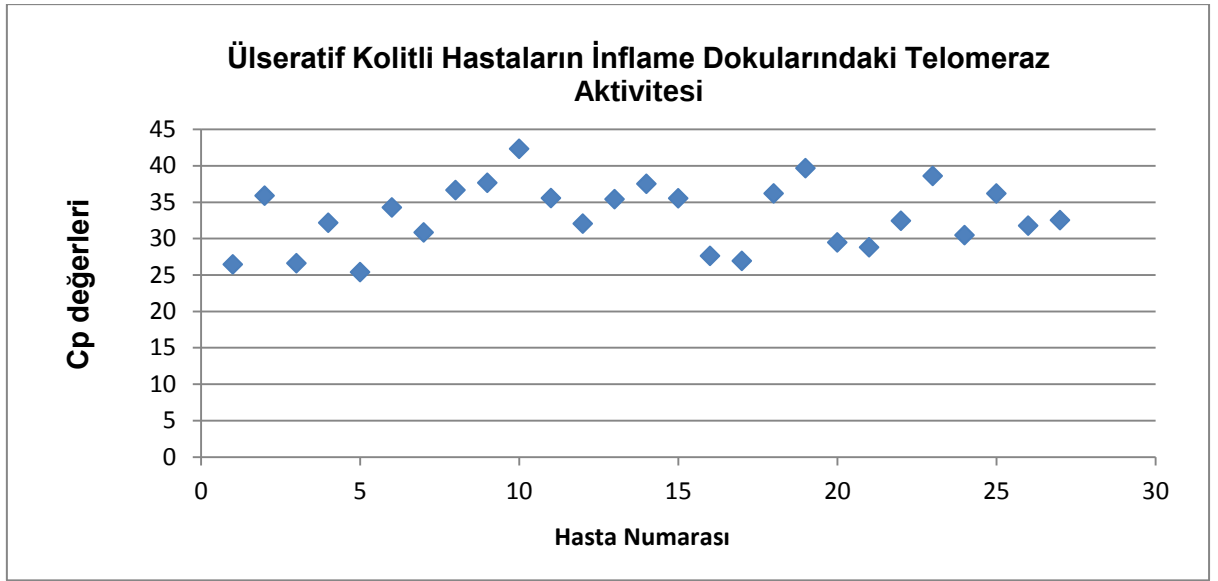
komşu normal mukozaya göre daha fazla olmakla birlikte student t testi ile bakılan ülser doku ve komşu normal doku arasındaki incelemede istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,113$) (Tablo 4.1)

Tablo 4.1. Ülser doku ile komşu normal dokuların ortalama Cp değerleri

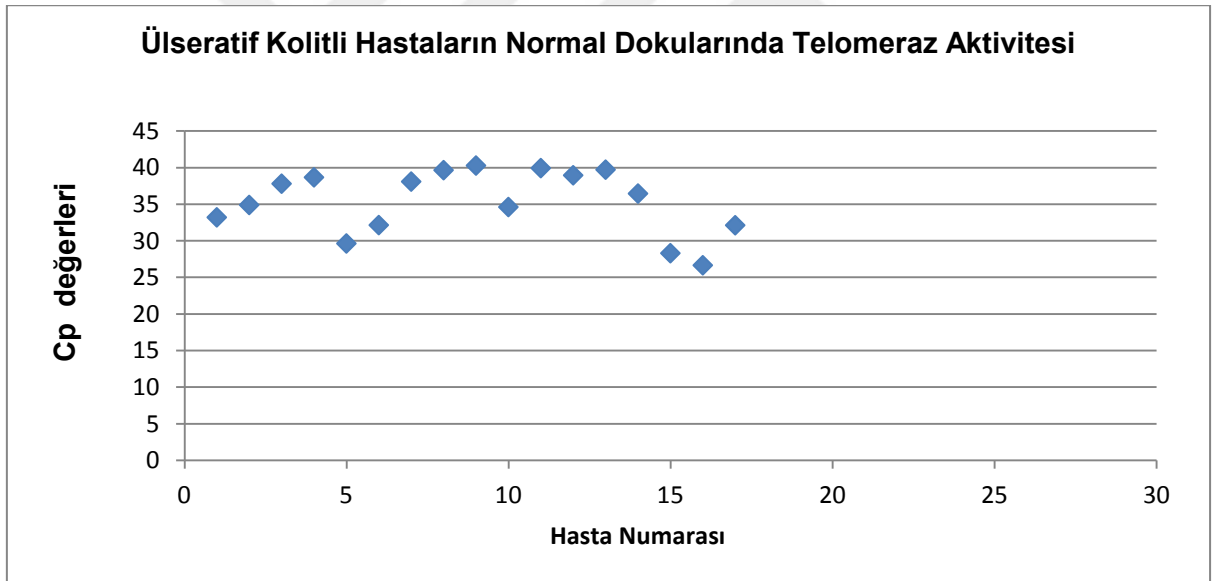
	Sayı	Yüzde (%)	Ortalama Cp Değeri	P
Ülseratif Kolit dokusu	27	61	33,15±4,46	0,113
Normal doku	17	39	35,37±4,37	



Şekil 4.2. ÜK ve komşu normal dokunun ortalama Cp değerleri



Şekil 4.3. ÜK olgularında inflame doku örneklerinin Cp değerleri



Şekil 4.4. ÜK olgularında normal mukoza örneklerinin Cp değerleri

Ülseratif kolit olguları içerisindeki 10 pankolit olgusu ile normal doku karşılaştırıldığında 10 pankolit olgusunun ortalama Cp değeri $33,62 \pm 3,81$ normal dokununki ise $35,37 \pm 4,37$ idi. Pankolit dokusundaki telomeraz aktivitesi normal dokuya göre yüksek bulunmakla birlikte bu fark istatistiksel açıdan anlamsız olarak değerlendirilmiştir ($p=0,191$).

Tablo 4.2. Pankolit ve normal dokuların ortalama Cp değerleri

	Sayı	Yüzde (%)	Ortalama Cp Değeri	P
Pankolit dokusu	10	27	33,62 ±3,81	0,191
Normal doku	17	73	35,37±4,37	

Ülseratif kolit hastaları kendi içerisinde pankolit olanlar ve olmayanlar şeklinde sınıflandırıldığında ise pankolit olmayan ülseratif kolitli dokulardaki telomeraz aktivitesi pankolitli dokulara göre daha fazla bulunmakla birlikte bu fark anlamlı olarak değerlendirilmemiştir($p=0,687$).

Tablo 4.3. Pankolit ve diğer ülseratif kolitli dokuların ortalama Cp değerleri

	Sayı	Yüzde (%)	Ortalama Cp Değeri	P
Pankolit dokusu	10	27	33,62±3,81	0,687
Diğer ülseratif kolit dokusu	17	73	32,88±4,90	

4.3. Kolorektal Kanser Olgularında Telomeraz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmaya yaş ortalaması $60.7 \pm 12,9$ olan (34-86), kolorektal kanser tanısı konmuş 28 birey dahil edilmiştir. Bu bireylerin 11 tanesi (%39,3) kadın, 17 tanesi (%60,7) ise erkek cinsiyet idi. 27 hastadan; biri kanserli doku diğeri ise komşu normal kolon mukozasından olmak üzere ikişer örnek alınmıştır. Kalan 1 hastadan ise sadece kanserli dokudan örnek alınmıştır. Tümörün histolojik tipine bakıldığında; 27'si (%96) kolorektal kanserlerde gözlenen majör histolojik tip olan adenokanser iken yalnızca 1 olgu (%4) müsinöz adenokanser idi. Hastaların genel özellikleri, tümörün histolojik tipleri ve yerleşim yerleri tablo 4.4 de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Kolorektal kanserli hastalara ait cinsiyet, yaş, tümör yerleşim yeri ve tümörün histolojik tipi

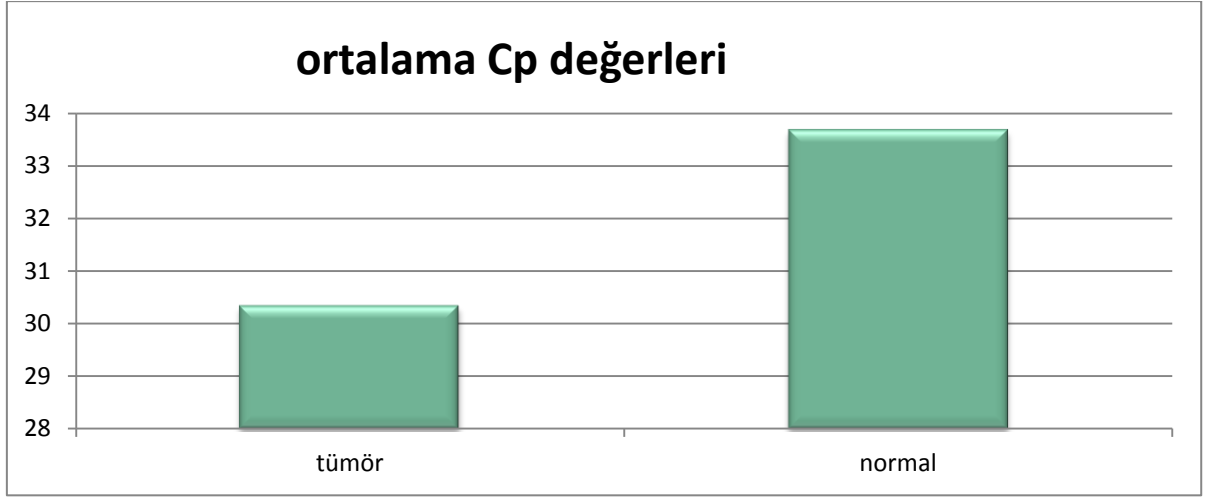
	Cinsiyet	Yaş	Yerleşim yeri	Histolojik tip
1	Kadın	53	Rektum	Adenoca
2	Kadın	61	Sigmoid	Adenoca
3	Erkek	77	Sigmoid	adenoca
4	Erkek	57	Sigmoid	Müsinöz adenoca
5	Erkek	61	Rektum	Adenoca
6	Kadın	66	Sigmoid	Adenoca
7	Erkek	68	Rektum	Adenoca
8	Kadın	80	Sigmoid	Adenoca
9	Erkek	72	Sağ hepatik fleksura	Adenoca
10	Erkek	34	Rektum	Adenoca
11	Erkek	50	Rektum	Adenoca
12	Erkek	66	Rektum	Adenoca
13	Erkek	49	Sol kolon tm	Adenoca
14	Erkek	53	Çekum	Adenoca
15	Kadın	52	Rektum	Adenoca
16	Kadın	51	Sigmoid	Adenoca
17	Erkek	60	Rektum	Adenoca
18	Erkek	52	Sigmoid	Adenoca
19	Kadın	55	Çekum	Adenoca
20	Erkek	78	Rektum	Adenoca
21	Kadın	62	Rektum	Adenoca
22	Erkek	82	Çekum	Adenoca

23	Kadın	74	Rektum	Adenoca
24	Erkek	86	Rektum	Adenoca
25	Kadın	44	Çıkan kolon	Adenoca
26	Erkek	66	Rektum	Adenoca
27	Erkek	44	Transvers kolon	Adenoca
28	Kadın	49	Sigmoid kolon	Adenoca

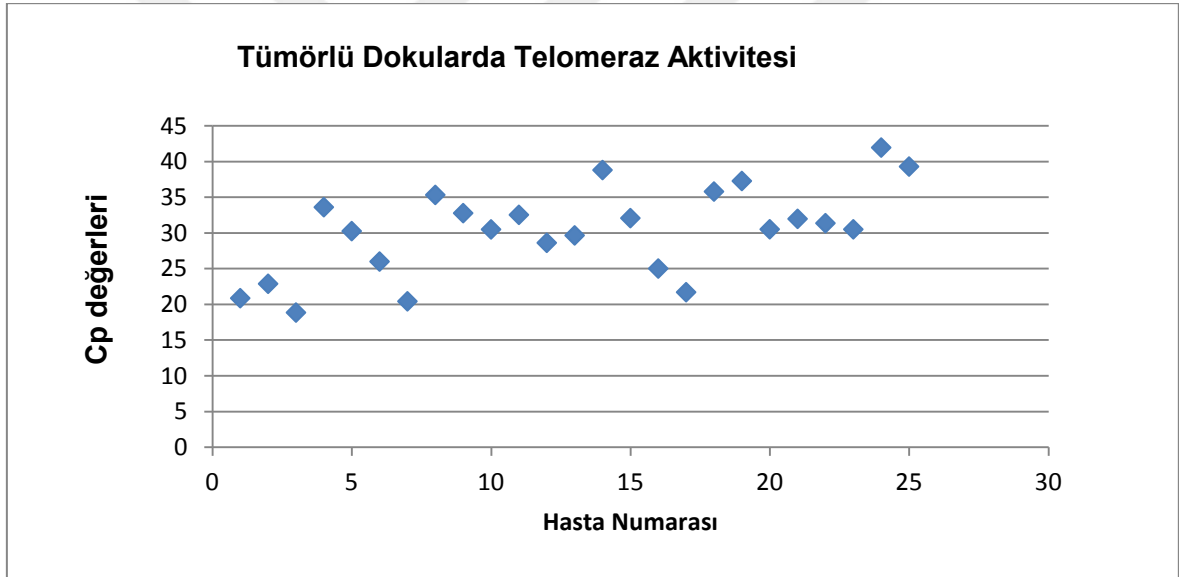
28 kanserli dokunun 3'ünde telomeraz ölçümü gerçekleştirilemezken 27 normal dokunun hepsinde ölçüm gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.6. ve 4.7' de gösterildiği gibi tümörlü dokulardaki Cp değerleri 18.8- 41.9, komşu normal dokuların Cp değerleri 24.46- 44.6 arasında olup tümörlü dokunun ortalama Cp değeri $30,34 \pm 6,18$, normal dokununki ise $33,76 \pm 5,7$ idi (şekil 4.5.). Student t testi ile bakılan kolorektal kanserli doku ile normal doku arasındaki incelemede, kanserli dokudaki telomeraz aktivitesi komşu normal mukozaya göre istatistiksel yönden anlamlı şekilde yüksek olarak bulunmuştur ($p=0,044$) (tablo 4.5.).

Tablo 4.5. Kolorektal kanser dokusu ile komşu normal mukozanın ortalama Cp değerleri

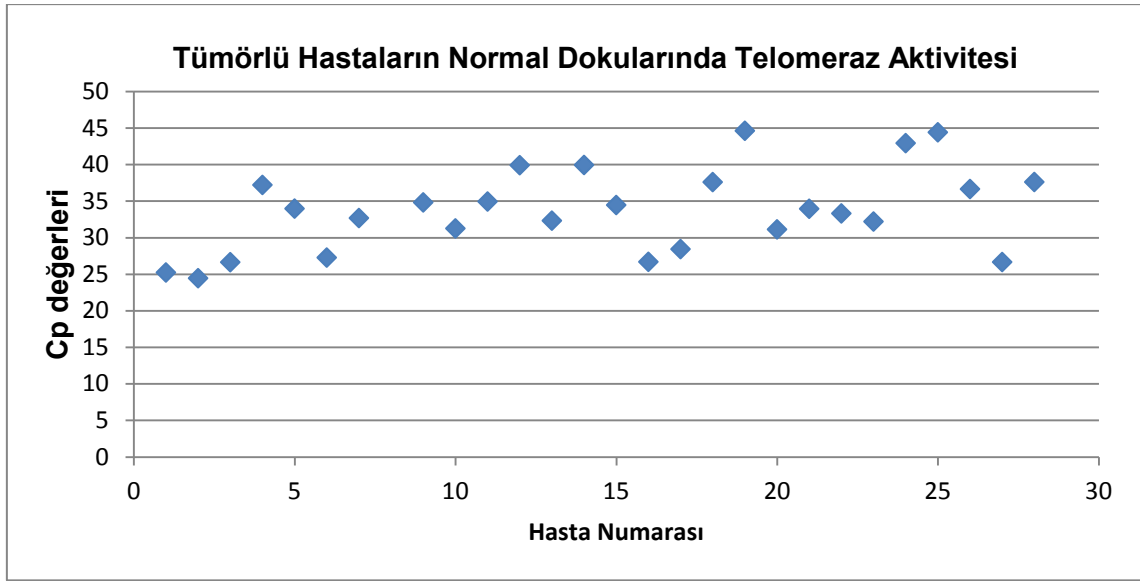
	Sayı (%)	Ortalama Cp Değeri	P
Tümörlü Doku	25 (%48)	$30,34 \pm 6,18$	0,44
Normal Doku	27 (%52)	$33,76 \pm 5,7$	



Şekil 4.5. KRK ve komşu normal mukozanın ortalama Cp değerleri



Şekil 4.6. KRK olgularında tümörlü doku örneklerinin Cp değerleri



Şekil 4.7. KRK olgularında komşu normal mukoza örneklerinin Cp değerleri

Rektum tümörleri ile kolon tümörleri karşılaştırıldığında; kolon tümörlerinin Cp değerlerinin ortalaması $31,28 \pm 6,42$ rektum tümörlerinin ise $29,33 \pm 6,02$ olarak saptanmıştır. Rektal tümörlerin telomeraz aktivitesi kolon tümörlerine göre yüksek bulunmakla birlikte bu fark istatistiksel yönden anlamlı olarak değerlendirilmemiştir ($p=0,44$)(tablo 4.6).

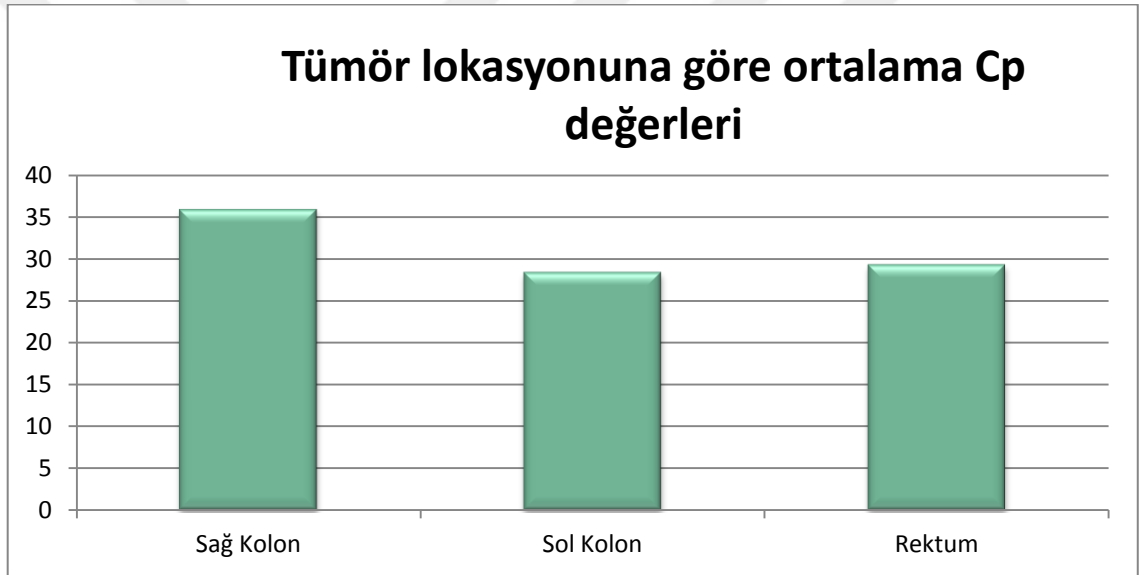
Tablo 4.6. Tümör yerleşim bölgesi ve ortalama Cp değerleri arasındaki ilişki

Tümör Yeri		Sayı	Yüzde (%)	Ortalama Cp Değeri	P
	Kolon	13	52	$31,3 \pm 6,4$	0,44
	Rektum	12	58	$29,3 \pm 6,0$	

Kolon tümörleri yerleşim yerlerine göre kendi içinde değerlendirildiğinde sağ kolon tümörlerinin Cp değerlerinin ortalaması $35,9 \pm 3,6$; sol kolon tümörlerinin ise $28,4 \pm 6,2$ olarak saptanmıştır. Telomeraz aktivitesi sol kolon tümörlerinde sağ kolon tümörlerine göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0,03$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Kolon tümörlerinin yerleşim yerleri ile Cp değerleri arasındaki ilişki

Tümör Yeri		Sayı	Yüzde (%)	Ortalama Cp Değeri	P
	Sağ Kolon	5	38	35,9±3,6	0,03
	Sol Kolon	8	62	28,4±6,2	

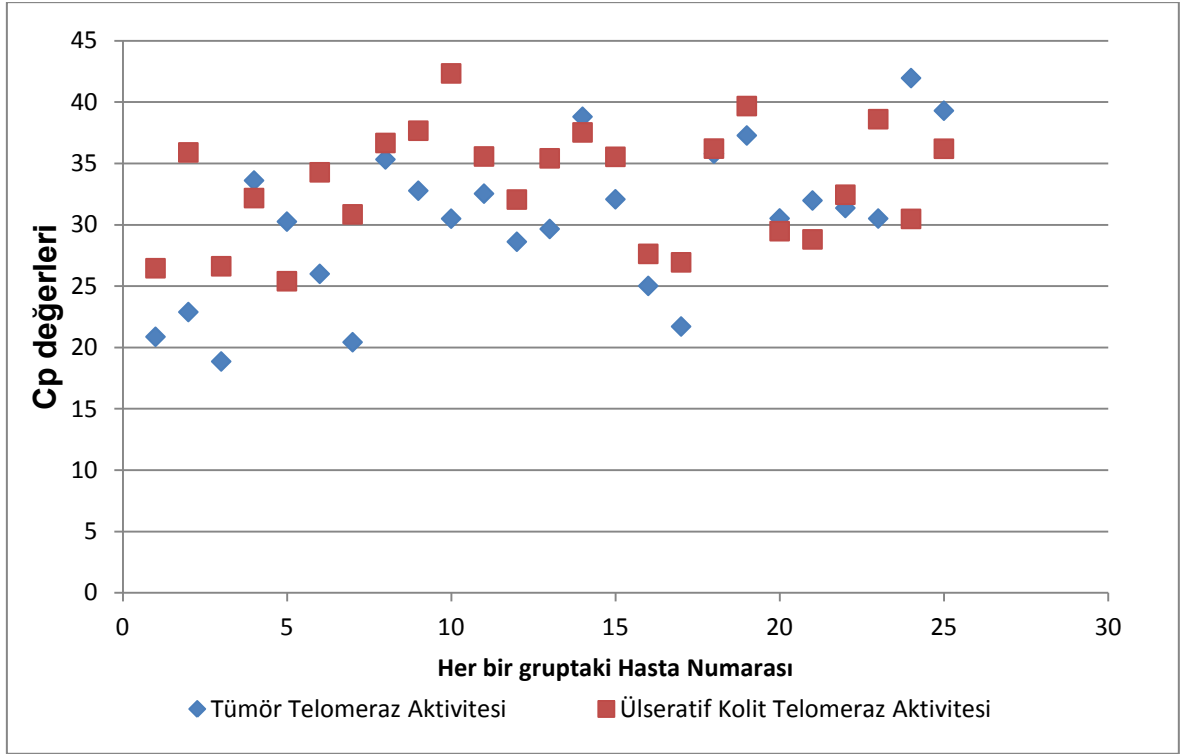


Şekil 4.8. Tümör yerleşim yeri ile telomeraz aktivitesi arasındaki ilişki

Çalışmaya dahil edilen kolorektal tümör ve ülseratif kolit inflame dokusunun herbiri için bulunan Cp değerleri şekil 4.9. da gösterilmiştir. Kolorektal kanser dokusu ile ülseratif kolitli olguların inflame dokuları arasındaki telomeraz aktivitesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p 0.065)(tablo 4.8.)

Tablo 4.8. KRK ile ÜK dokusunun ortalama Cp değerleri

	Sayı (%)	Ortalama Cp Değeri	P
Tümörlü Doku	25	30,34±6,18	0,065
Ülseratif Kolit dokusu	27	33,15±4,46	



Şekil 4.9. Tümörlü doku ve ÜK inflame dokuların Cp değerleri

TARTIŞMA

Kronik inflamatuvar bağırsak hastalıklardan birisi olan ülseratif kolit, kolon mukozası ve submukoza dokusunu tutan , rektumu da içine alacak şekilde proksimale doğru ilerleyen relaps ve remisyonlarla seyreden kolonun iltihabi hastalığıdır (Oktay 2001; Üzerk 2009; Kaya 2012).

İBH dünya genelinde yaygın görülen bir hastalık olmakla birlikte hem insidans hem de prevalans açısından coğrafi bölgeler arasında hatta aynı coğrafi bölge içinde dahi değişiklikler gözlenebilmektedir (Burisch 2015)

Son birkaç yıldır dünya çapında ÜK varlığı artma eğilimindedir. Kuzey Amerika, Batı Avrupa gibi ÜK'nin plato çizdiği hatta azaldığı gelişmiş ülkelerin aksine yayınlar göstermektedir ki Latin Amerika, Asya, Doğu Avrupa gibi gelişmekte olan ülkelerde insidansı yükselmektedir. İncelenen popülasyona bağlı olarak ÜK insidans oranları 0.5 - 31.5 / 100000 arasında değişebilmektedir.

Ülkemizde ise ÜK insidansı 2,6/100000 ve prevalansı 79 /1000 olarak bildirilmiştir (Göktürk 2012; Kalkan 2013).

ÜK hastaları çoğu toplumda özellikle 30-40'lı yaşlarda tanı alırlar. Hastalık ayrıca 6.-7. dekadlarda ikinci bir pik yapmaktadır . Bazı toplumlarda hafif erkek baskınlığı görülse de cinsiyetler arasında önemli bir farklılık yoktur. (Burisch 2015). Çalışmamızda yer alan hastaların %37' sini kadın, %63' ünü ise erkekler oluşturmaktaydı. Yaş aralığı 22-76 olup, yaş ortalaması 44,26±16,8 idi.

İBH; KRK gelişimi için Familyal Adenomatöz Polipozis ve Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser Sendromu' ndan sonra 3. en yüksek risk koşuludur (Kim 2014).

Ülseratif kolitin KRK gelişimi için bir risk faktörü olduğu ilk kez 1925 yılında Crohn ve Rosenberg tarafından bulunmuş, sonrasında farklı araştırmalarda bu risk doğrulanmıştır (Eaden 2001).

ÜK hastalarında genel KRK gelişim riski 2,4 kat artmış durumdadır. Yeni bir meta-analize göre, ÜK hastalarında kümülatif KRK geliştirme olasılığı 10 yılda %2, 20 yılda %8 ve 30 yılda %18 'dir (Sameshima 2015).

Kronik ülseratif kolitteki neoplaziye gidiş genetik değişiklikler eşliğindeki epitelyal displazi gelişimiyle karakterizedir (Holzmann 2000).

Karsinogenez mekanizmaları ile ilgili olarak, sporadik kolorektal kanserden sorumlu moleküler değişikliklerin, yani kromozomal instabilite, mikrosatellit instabilitesi ve hipermetilasyonun kolitle ilişkili kolon karsinogenezinde de rol oynadığı iyi bilinmektedir (Triantafillidis 2009).

Sınırsız çoğalma kabiliyeti şüphesiz kanser hücrelerinin olmazsa olmaz özelliklerindendir. Kanserli hücelere bu özelliği kazandıran normal somatik hücrelerde görülmeyen telomerazın aktivasyonudur. Diğer genetik yollardaki benzerlikler de göz önüne alındığında, KRK için predispozan bir durum olan ÜK'de de benzer şekilde telomeraz aktivasyonu olabileceği akla gelmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda bazı premalign dokularda telomerazın aktive olduğunun gösterilmesi bu fikri güçlendirmektedir.

Telomerler kromozomların uçlarında bulunan tekrarlayıcı (TTAGGG) DNA dizileridir. Telomerlerin ana fonksiyonlarından birisi kromozomları uç uca füzyondan ve DNA bozunmasından korumaktır. DNA polimerazın kromozomların 3' ucunu çoğaltmadaki yetersizliğinden kaynaklanan uç replikasyon problemi, hücre bölünmesine bağlı ilerleyici telomer kısalmasına neden olmaktadır. Telomerdeki kısalma kritik bir noktaya ulaştığında genetik olarak kararsız hale gelmiş hücrelerin çoğalmasını önlemek için apoptozis ve yaşlanma gibi bir takım koruyucu mekanizmalar aktive olurlar. Eğer bu mekanizmalar başarısız olursa, hücreler bölünmeye devam ederek hücre ölümü ve masif genomik instabiliteyle karakterize kriz sürecine girerler. Bu noktada, internal RNA komponenti ve telomer-spesifik ters transkriptaz aktivitesine sahip katalitik proteinden oluşan bir ribonükleoprotein kompleksi olan telomerazın aktivasyonu telomer kısalmasını kompanze eder ve hücrelerin bu kriz sürecinden başarılı şekilde çıkmasına izin verir. Telomeraz, özellikle kanser hücresi, kök hücre ve germ hücreleri gibi ölümsüz hücrelerde ifade bulmaktadır. Hücelere sınırsız çoğalma potansiyeli sunarak ölümsüzleştirmede ve böylelikle de kanser oluşumunda rol oynar (Fernández-Marcelo 2016).

Literatürde pekçok malign tümör tipinde farklı yöntemler kullanılarak telomeraz aktivitesi araştırılmıştır. Telomeraz aktivitesini saptamak için geliştirilen ilk yöntem tekrarların PCR ile çoğaltılması esasına dayanan TRAP yöntemidir. 1994 yılında Kim ve

arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra geliştirilen çeşitli modifikasyonlarla yöntemin klinik uygulamalarda daha hassas ve güvenilir olması amaçlanmıştır.

Kanserin yanısıra telomerazın bazı premalign dokularda da aktiveleştirildiği bilinmektedir. Bu nedenle premalign hastalığı olduğu bilinen yüksek riskli hastaların taramalarında telomeraz aktivite testleri kullanılması umulmaktadır (Chen 2011).

Literatüre bakıldığında farklı premalign dokularda telomeraz aktivitesinin değerlendirildiği çeşitli çalışmalara rastlanmaktadır. 1997 yılında Kannan ve arkadaşları, oral mukozada en sık görülen premalign lezyon olan oral lökoplaki dokusunda telomeraz aktivitesini değerlendirmişlerdir. Telomeraz aktivitesini saptamak için TRAP yöntemini kullandıkları çalışmalarında, 36 oral lökoplaki dokusunun 27'sinde (%75) telomeraz aktivitesi saptamışlardır. Benzer şekilde 1999 'da Chang ve arkadaşları modifiye TRAP yöntemi kullanarak agresif, premalign bir lezyon olan oral verrüköz lökoplakideki telomeraz aktivitesinin şaşırtıcı şekilde oral yassı hücreli karsinomdaki seviyelerine yaklaştığını görmüşlerdir. 42 oral yassı hücreli karsinom olgusunun 36' sında (%86) ve 12 oral premalign lezyonun 8' inde (%67) telomerazın aktive olduğu gösterilmiştir.

Tahara ve ark.1995 yılında TRAP yöntemini kullanarak 8 sirotik karaciğer dokusundan 6' sında düşük telomeraz aktivitesi saptamışlardır. Aynı yıl Tahara ve arkadaşları yine TRAP yöntemini kullanarak bu kez prekanseröz olan 10 kolorektal tübüler adenom olgusunun tamamının (%100) telomeraz pozitif olduğunu göstermişlerdir.

Bunların yanısıra literatürde kolit olgularında telomeraz aktivasyonunun araştırıldığı çeşitli çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalarda ÜK' li hastalarla ilgili kolon mukozasında telomeraz aktivasyonunun olup olmadığına ilişkin farklı sonuçlara ulaşılmıştır.

1997 yılında Engelhardt ve arkadaşlarının 50 kolorektal kanser , 20 polip ve 10 kolit dokusunda donmuş numunelerde modifiye TRAP yöntemi kullanarak kantitatif olarak telomeraz aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında, kolorektal tümörlerin %90' ında , poliplerin %60' ı (20 olgudan 12'si) ve kolitlerin %40' ında (10 olgudan 4'ünde) telomeraz aktivitesi saptamışlardır. Ancak tümör dokusuyla karşılaştırıldığında telomeraz aktivitesinin poliplerde 25.5 kat ve kolitte 54 kat daha az olduğu gösterilmiştir. Normal dokuda ise telomeraz aktivitesi saptamamışlardır. Aynı yıl Yoshida ve arkadaşlarının TRAP yöntemi kullanarak 7' si ÜK, 5' i Crohn olmak üzere 12 İBH dokusunda telomeraz

aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında; tümör dokularına kıyasla hayli zayıf olmakla birlikte 7 K dokusundan 3' nde ve 5 Crohn örneğinin 3' nde telomeraz aktivitesi saptamışlardır. 35 tümöre komşu mukozanın 30' unda ise telomeraz aktivitesi gözlenmemiştir.

Yine 2005 yılında Myung ve arkadaşları 21 K olgusunda TRAP yöntemi ile telomeraz aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında, 21 K hastasının 14' nde (%67) ve 11 normal mukozanın 3'nde (%27) telomeraz aktivitesi saptamışlardır.

Mevcut çalışmaların çoğunda az sayıda ülseratif kolit olgusu yer almaktadır ve telomeraz aktivitesi pozitif ya da negatif şeklinde değerlendirilmiştir. Biz alışmamızda farklı olarak; telomeraz aktivitesinin eş zamanlı kantitasyonu ve florometrik ölçümü in oldukça duyarlı bir in vitro yöntem olan, TRAPeze yöntemini kullanarak premalign bir lezyon olduğu bilinen K hastalarında telomeraz aktivitesini kantitatif olarak değerlendirdik ve KKK olguları ile karşılaştırdık. Bizim çalışmamıza 27 ülseratif kolit hastasının inflame kolon mukozasından ve kontrol grubu olarak da 17 hastanın normal görünümlü mukozadan alınan örnekler dahil edildi. 10 hasta pankolit olması dolayısıyla normal mukozadan elde edilemedi. Tüm dokularda telomeraz ölçümü gerçekleştirildi. Normal mukozada telomeraz aktivitesinin bulunmadığı önceki çalışmaların (Engelhardt 1997; Usselman 2001) aksine biz kantitatif olarak normal dokularda da telomeraz aktivitesi saptadık. Tablo 4.1. de gösterildiği üzere ülseratif kolit dokusundaki telomeraz aktivitesi komşu normal mukozaya göre daha fazla bulunmakla birlikte bu fark istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilmedi. Bu sonuç Kleideiter ve arkadaşlarının çalışması ile uyumluydu. Kleideiter ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada telomeraz aktivitesini modifiye TRAP yöntemi kullanarak 0(aktivite yok)-4 (yüksek aktivite) arasında skorlamışlardır. K, Crohn ve normal kolonik mukozadan 3 dokuyu karşılaştırdıklarında , telomeraz aktivitesi bakımından 3 grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca K hastalığı ile hastalığın süresinin, telomeraz aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi olmadığını bildirilmişlerdir.

Literatürde kolit dokusunda telomeraz aktivitesinin normal dokulara göre daha fazla bulunduğu çalışmaların yanısıra telomeraz aktivitesinin normal dokudan daha düşük olduğu çalışmalar da mevcuttur. 2001 yılında Usselman ve arkadaşları TRAP yöntemi kullanarak 25 ülseratif kolit dokusunda telomeraz aktivitesini araştırdıklarında, kolit

dokusunda normal dokuya kıyasla telomeraz aktivitesinin belirgin şekilde azaldığını göstermişlerdir.

ÜK anatomik tutulum yerine göre sınıflandırıldığında %80 olguda sadece rektum ya da rektosigmoid tutulum görülmektedir. Sadece rektum tutulursa proktit, rektum ve sigmoid kolon tutulumunda distal tutulumlu ÜK ,çekuma kadar tüm kolonun tutulması durumu ise pankolit olarak adlandırılmaktadır. Olguların %40-50'sinde distal, %20'sinde ise pankolit görülür (Kalkan 2013).

Pankolit kolorektal kanser gelişimi açısından en yüksek riske sahip hasta grubu olarak bilinmektedir (Sapmaz 2016). Çalışmamızda yer alan 27 ÜK dokusunun 10 tanesi (%37) pankolit idi. KRK gelişimi açısından en riskli olduğu bilinen bu hasta grubunda telomeraz aktivitesini değerlendirdiğimizde tablo 4.3'te gösterildiği gibi istatistiksel yönden fark anlamlı olmamakla birlikte şaşırtıcı şekilde telomeraz aktivitesi pankolit olan ÜK olgularında pankolit olmayan ülseratif kolit olgularından daha düşük idi. Bu durum bize ÜK'de inflamasyonun yaygınlığının telomeraz aktivitesini değiştirmediğini düşündürmektedir. Bu sonuç Kleideiter ve arkadaşlarının 2003'te yaptıkları çalışmaları ile uyumluydu. Yine pankolit dokusu ile normal mukoza karşılaştırıldığında tablo 4.2.'de gösterildiği üzere istatistiksel yönden anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışmamızda KRK gelişimi için predispozan olan ÜK örneklerinin yanısıra KRK tümör örnekleri ile komşu normal görünümlü mukoza örneklerinde de telomeraz aktivitesini değerlendirdik.

Literatüre bakıldığında KRK'ların da içinde olduğu birçok farklı kanser türünde telomeraz aktivitesi araştırılmış ve incelenen kanserli hücrelerin %90'ında telomerazın aktif olduğu bulunmuştur. Bu nedenle telomeraz aktivitesinin saptanması ,kanserin erken teşhisinde fayda sağlayabilir ve tedavi için de yeni bir hedef olabilir (Tatsumoto 2000).

Telomeraz temelli kanser tedavisi için farklı terapötik yaklaşımlar geliştirilmiştir ve bunlar araştırma aşamasındadır. Kısa telomerlerin uzatılmasına yönelik tedavilerden bazıları başarılı şekilde faz 1 klinik araştırma seviyesine ulaşmıştır. Bir diğer yaklaşım ise tümör hücrelerinde artmış olan telomeraz fonksiyonunun yok edilmesini amaçlamaktadır. Bunun için doğal ve küçük telomeraz inhibitörü ilaçlar, immünoterapötik yaklaşımlar, oligonükleotid inhibitörleri ve telomeraz gen terapisi yararlı tedavi stratejilerindendir (Jäger 2016)

Kanser, dünya genelinde önemli bir halk sağlığı problemi olmayı sürdürmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ölümlerin önde gelen ikinci nedenidir (Siegel 2016).

2013 yılı kanser istatistiklerine göre ülkemizde 103.070 erkek ve 71.233 kadının kansere yakalandığı tahmin edilmektedir. Türkiye'de 2013 yılında yaşa standardize kanser hızı erkeklerde yüzbinde 267,9, kadınlarda ise yüzbinde 186,5'dir. Toplamda kanser insidansı ise yüzbinde 227,2'dir. Türkiye kanser insidansı dünya insidansının üzerinde seyrederken, Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere göre kanser açısından hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük bir hızda olduğu görülmektedir. Ülkemizde görülen ilk 5 kanser türü dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkelerdekine benzerdir. Uluslararası Kanser Ajansı tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre hem dünyada hem de ülkemizde erkeklerde en sık görülen 3 kanser akciğer, prostat ve kolorektal kanserdir. Kadınlarda en sık gözlenen 3 kanser türüne bakıldığında ise dünyada sıralama meme, kolorektal, uterus-serviks kanseri iken Türkiye'de meme, tiroit ve kolorektal kanser şeklindedir. Ülkemizde kolorektal kanserler hem kadınlarda hem de erkeklerde 3. sırada yer almaktadır. Erkeklerde yüzbinde 24,4 ve kadınlarda ise yüzbinde 15,3 sıklıkta görülmektedir (Türkiye Kanser İstatistikleri, Ankara 2016).

Dünya genelinde en sık 2. tanı konan kanser olan kolorektal kanserler uzak organ ya da lenf nodu metastazı durumunda kötü prognoza sahiptir. Akciğer kanserinden sonra, Avrupa'da kanser ölümlerinin en sık nedenidir. 2012 yılında Avrupa'da 241600 erkek kolorektal kanser tanısı almış ve 113200' ü bu hastalıktan ölmüştür. Yine Avrupalı kadınlara bakıldığında 205200 kolorektal kanser olgusunun 101500' ü bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmiştir (Ouakrim 2015).

Gelişen tedavi seçenekleri, artmış farkındalık ve erken tanıya rağmen hala kanserle ilişkili ölümlerin önde gelen nedenlerinden birisi olan KRK , çeşitli genetik ve epigenetik olayları kapsayan çok basamaklı bir süreçten kaynaklanan farklı moleküler yollara ve biyolojik süreçlere sahip bir hastalık kompleksidir (Bertorelle 2014).

Kolon kanser gelişimi sürecindeki malign dönüşüm; onkogen aktivasyonu, tümör supresör genlerin inaktivasyonu ve kolon epitel hücrelerini kolon adenokarsinom hücrelerine dönüştüren kontrolsüz mitojenik uyarıcıları kapsayan çok aşamalı birtakım genetik ve epigenetik olayların birikimi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyon süreci

boyunca telomeraz aktivasyonu tümör progresyon kaskadında önemli bir rol oynamaktadır (Ayiomamitis 2014).

Literatüre bakıldığında KRK'larda telomeraz aktivitesinin araştırıldığı çalışmaların birçoğunda (Kawanishi-Tabata 2002; Garcia-Aranda 2005 ; Sanz-Casla 2005 ;Vidaurreta 2007) dokudaki telomeraz aktivitesinin telomeraz pozitif ya da negatif şeklinde, nitel olarak değerlendirildiği yöntemler kullanılmıştır. Biz çalışmamızda ÜK'de olduğu gibi telomeraz aktivitesini kantitatif şekilde değerlendirme imkanı sunan TRAPeze yöntemini kullandık.

Çalışmamıza enzim aktivitesinde değişiklik yapabileceği düşünülerek neoadjuvan kemoterapi öyküsü olmayan , 28 KRK olgusu dahil edilmiş , bunların 25' inde kanserli doku örneğinden telomeraz ölçümü gerçekleştirilmiştir. Kolorektal kanserli doku ile normal doku arasındaki incelemede, telomeraz aktivasyonu ya da hTERT ifadesinin KRK' lı dokuda komşu normal mukozaya göre daha yüksek olduğunun gösterildiği önceki çalışmalarla (Engelhardt 1997; Tatsumoto 2000; Ghori 2002; Bautista2007; Terrin 2008; Ayiomamitis 2014) uyumlu şekilde tablo 4.5. de gösterildiği gibi kanserli dokudaki telomeraz aktivitesi komşu normal mukozaya göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Literatür incelendiğinde kanserli olmayan normal dokudaki telomeraz aktivitesine ilişkin bulgular tartışmalıdır. Birdizi çalışmada kanserli hücrelerde yüksek telomeraz aktivitesi ifade edilirken normal somatik hücrelerde telomeraz aktivasyonu neredeyse hiç gözlenmemektedir. Öte yandan diğer çalışmalarda normal insan hücrelerinde telomerazın her zaman mevcut olduğunu ve hücresel proliferasyonun bir belirteci olarak düşünülebileceği ifade edilmektedir. İnsan kolon dokusuyla ilgili durum da tartışmalıdır (Ayiomamitis 2014).

Telomerazın normal gastrointestinal sistem boyunca kesin rolü tam olarak açık olmasa da hızlı bölünmeye devam eden hücrelerde proliferasyon için şart olduğuna dair güçlü kanıtlar mevcuttur. Kript kök hücrelerinde kantitatif olarak daha yüksek miktarda ifade edilmesine karşın bu enzim gastrointestinal kanal boyunca hücrelerin çoğunda eksprese edilmektedir (Usselman 2001).

Çalışmamızda normal mukozada telomeraz aktivitesinin saptandığı diğer çalışmalarla (Usselman 2001; Nowak 2003; Ayiomamatis 2014) uyumlu şekilde komşu normal mukozada da telomeraz aktivitesi olduğunu saptadık. Normal dokudaki telomeraz

aktivitesine ilişkin farklı sonuçların nedeninin kullanılan yöntemlerin duyarlılıklarındaki farklılıklara bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Sağ ve sol kolon tümörleri farklı embriyolojik kökenlerinden ötürü farklı ama birbirleriyle ilişkili tümör gruplarıdır. Sağ kolon yerleşimli ve sol kolon yerleşimli sporadik kolon adenokarsinomları arasında epidemiyolojik, morfolojik ve moleküler özellikler bakımından farklılıklar olması, sporadik kolorektal kanser mekanizmasının yerleşim alanlarına göre değişiklik gösterebileceğini düşündürmektedir (Birkenkamp-Demtroder 2005).

Bu farklı özellikler karsinogenez sürecindeki farklı genetik yolları işaret edebilmektedir. Sonuç olarak KRK'ların proksimal, distal kolon ve rektum kanserleri şeklinde ayrılabilmesi ileri sürülmektedir (Ayiomamatis 2014).

Kolon tümörleri sağ ve sol kolon şeklinde kendi içinde sınıflandırılarak telomeraz aktivitesinin değerlendirildiği önceki çalışmalarda farklı sonuçlar ortaya konmuştur. 2014 yılında Ayiomamitis ve arkadaşlarının real-time PCR yöntemini kullanarak 49 KRK olgusunda telomeraz aktivitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, sağ kolon tümörlerinin sol kolon tümörlerine göre daha fazla telomeraz ifade ettiği gösterilmiştir.

İzgi ve arkadaşları ise 2013 yılında 20 KRK ve komşu normal mukozada TRAP - Gümüş Boyama yöntemini kullanarak telomeraz aktivitesini değerlendirdiklerinde, sol kolondaki tümörlerde sağ kolondaki tümörlere kıyasla belirgin olarak daha yüksek telomeraz aktivitesi saptamışlardır. Benzer şekilde Garcia-Aranda ve arkadaşlarının 2005 yılında TRAP ELISA ile 91 KRK olgusunda telomeraz aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında, sağ kolonda yerleşen tümörlerin %73.9'u, sol kolon tümörlerinin ise %92.3'ünde pozitif telomeraz aktivitesi bulunmuştur. Bu araştırmalarla uyumlu olarak biz de çalışmamızda kolon tümörlerini kendi içinde sağ kolon ve sol kolon tümörleri olarak sınıflandırdığımızda telomeraz aktivitesi yönünden farklılık olduğunu saptadık. Tablo 4.7.'de gösterildiği üzere telomeraz aktivitesi sol kolon tümörlerinde sağ kolon tümörlerine göre istatistiksel olarak daha yüksek bulundu.

Kolon ve rektum kanserlerini karşılaştırdığımızda ise tablo 4.6.'da gösterildiği üzere rektal tümörlerde telomeraz aktivitesi kolon tümörlerine göre daha fazla olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bizim çalışmamızla benzer şekilde Garcia-Aranda ve arkadaşları 2005 yılında gerçekleştirdikleri araştırmalarında rektum ve kolon

tümörlerinde telomeraz aktivitesini kıyasladıklarında, rektumda yerleşen tümörler ile kolonda yerleşen tümörler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır.

Buna zıt olarak Ayiomamitis ve arkadaşlarının real-time PCR yöntemini kullanarak 49 KRK olgusunda telomeraz aktivitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, kolon kanserlerinde telomeraz aktivitesinin rektal kanserlere göre anlamlı şekilde artmış olduğu gösterilmiştir. Yine Sanz-Casla ve ark. 2005' te 103 KRK dokusunda TRAP-ELISA ile telomeraz aktivitesini araştırdıklarında telomeraz pozitif hasta sayısının kolon kanserlilerde rektum kanserlilerden daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde Vidaurreta ve arkadaşları 2007' de TRAP ELISA kullanarak telomeraz aktivitesini araştırdıklarında kolondaki aktivitenin rektumdakinden fazla olduğunu bulmuşlardır.

Çalışmamızda kolorektal kanser örnekleri ile ülseratif kolit inflame lezyonlarını karşılaştırdığımızda, kolorektal kanser örneklerinde telomeraz aktivitesi daha fazla olmakla birlikte tablo 4.8.' de gösterildiği üzere bu fark istatistiksel yönden anlamlı olarak değerlendirilmedi. Bu da bize ülseratif kolit hastalarında kanser için telomerazın kullanılabilir bir marker olmadığını düşündürmektedir.

KRK gelişim sürecindeki malign dönüşümün; onkogen aktivasyonu, tümör supresör genlerin aktivasyonu gibi birçok farklı genetik ve epigenetik olayların birikimi sonucu olduğu bilinmektedir. Telomeraz aktivasyonunun da bu süreçte rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Biz çalışmamızda önceki çoğu çalışmadan farklı olarak telomeraz aktivasyonunu kantitatif olarak değerlendirdiğimizde önceki çalışmalarla uyumlu şekilde tümörlü dokuda telomeraz aktivasyonunun komşu normal dokuya göre artmış olduğunu gösterdik. Ayrıca normal dokuların tümünde telomeraz aktivitesi saptadık. Normal dokuda da telomeraz aktivitesinin saptanması kullandığımız yöntemin duyarlılığın normal dokuda telomeraz aktivitesinin bulunmadığı önceki çalışmaların çoğunda kullanılan yöntemlerden daha fazla olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Kansere yatkınlık oluşturan durumların kansere dönüşüm süreçlerinin aydınlatılması kansere gidişatın durdurulabilmesi ya da erken dönemde bu tip olguların tespit edilebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu amaç doğrultusunda tez çalışmamızda önceki diğer çalışmalardan farklı olarak KRK için predispozan olan ÜK olgularında da eş zamanlı olarak telomeraz aktivasyonunu araştırdığımızda, ÜK olgularından alınan inflame dokularda telomeraz aktivitesinin komşu normal mukozaya göre yüksek olmakla birlikte bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterdik. Bu sonuçlar doğrultusunda

telomراز aktivite tayini ülseratif kolit hastalarında KKK gelişimini değerlendirmek açısından kullanışlı bir marker gibi görünmemektedir. Çalışmamızda ayrıca şaşırtıcı şekilde KKK gelişimi için en büyük risk grubunu oluşturan pankolit olgularındaki telomراز aktivitesinin diğer ÜK dokularından daha az olduğunu saptadık. ÜK olgularında telomrazın komşu normal mukozaya göre artmamış bulunması bize kümülatif değişikliklerin birikimi sonrası ortaya çıkan KKK'larda telomraz aktivitesindeki artışın hastalığın erken aşamalarında değil daha ileriki süreçlerde meydana gelen bir değişiklik olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuda yapılacak ek çalışmaların sürecin aydınlatılmasında faydalı olacağı umulmaktadır.



SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda elde edilen veriler genel olarak değerlendirildiğinde şu sonuçlara varıldı:

- Bu çalışmada 28 kolorektal kanser, 27 ülseratif kolit, 44 normal doku olmak üzere toplam 99 örnekte TRAPeZe® Kit RT Telomerase Detection Kit kullanılarak telomeraz aktivitesi değerlendirildi.
- Kanserli dokudaki telomeraz aktivitesi komşu normal mukozaya göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu bize telomeraz aktivasyonunun KRK için tanısal bir belirteç olabileceğini, ayrıca telomeraz inhibitörü ilaçların da ileride kanser tedavisi içinde yer alabileceğini düşündürmektedir. Bunun için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Sağ kolon tümörleri ile sol kolon tümörleri kendi içinde telomeraz aktivitesi yönünden değerlendirildiğinde telomeraz aktivitesi sol kolon tümörlerinde sağ kolon tümörlerine göre istatistiksel olarak daha yüksek bulundu.
- Rektal tümörler ve kolon tümörleri şeklinde bir sınıflama yapıldığında ise; rektal tümörlerin telomeraz aktivitesi kolon tümörlerine göre daha fazla olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.
- 27 ülseratif kolitli hastanın inflame dokusu ile 17 komşu normal mukozadaki telomeraz aktivitesi değerlendirildiğinde; ülseratif kolit dokusundaki telomeraz aktivitesi komşu normal mukozaya göre daha fazla olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.
- 10 pankolitli olgunun inflame dokusu ile diğer 17 Ü.K olgusunun inflame dokuları karşılaştırıldığında şaşırtıcı şekilde telomeraz aktivitesinin pankolit olan ÜK olgularında pankolit olmayan ülseratif kolit olgularından daha düşük olduğu saptandı.

Sonuç olarak, telomerazın KRK dokusunda komşu normal mukozaya göre daha yüksek bulunması, telomeraz aktivitesinin KRK gelişiminde rolü olduğunu desteklemektedir. Bu çalışmada ÜK dokusunda komşu normal mukozaya kıyasla hafif yüksek telomeraz aktivitesi bulunmakla birlikte bu fark istatistiksel yönden anlamlı olarak değerlendirilmemiştir. Çalışmamızda ayrıca pankolitli olgularla diğer ÜK olgularını karşılaştırdığımızda; istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte pankolit olgularında

düşük telomeraz aktivitesi saptadık. Bu konuda yapılacak multidisipliner, daha geniş ölçekli çalışmaların bu konunun aydınlatılması açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Aiello M, Vella N, Cannavò C, Scalisi A, Spandidos DA, Toffoli G, et al. Role of genetic polymorphisms and mutations in colorectal cancer therapy (Review). *Mol Med Rep*. 2011 Mar-Apr;4(2):203-8.
- Alsgier M, Alqawi O. Genetic Basis of Colorectal Cancer. The Second Symposium on Theories and Applications of Basic and Biosciences 5 .September 2015.
- Annaházi A, Molnár T. Pathogenesis of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease: Similarities, Differences and a Lot of Things We Do Not Know Yet. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*.2014; 5: 253
- Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience*. 2015 Apr 9;9:520. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and Aging. *Physiol Rev*, 2008; 88: 557–579
- Ayiomamitis GD, Notas G, Zaravinos A, Zizi-Sermpetzoglou A, Georgiadou M, Sfakianaki O, et al. Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer. *Can J Surg*. 2014 Jun;57(3):199-208.
- Bailey SM, Murnane JP. Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res*. 2006 May 8;34(8):2408-17.
- Baird DM. Telomere dynamics in human cells. *Biochimie*. 2008 Jan;90(1):116-21.
- Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007 May 12;369(9573):1627-40.
- Bautista CV, Felis CP, Espinet JM, García JB, Salas JV. Telomerase activity is a prognostic factor for recurrence and survival in rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007 May;50(5):611-20.
- Bektaş M, Savaş B, Çetinkaya H, Törüner M, Ensarı A, Doğanay B, ve ark. Ülseratif kolitli hastalarda displazi varlığı ve displastik mukozada p53 ve Ki-67 ekspresyonu. *Akademik gastroenteroloji Dergisi*. 2014;13(2):41-46
- Bertorelle R, Rampazzo E, Pucciarelli S, Nitti D, De Rossi A. Telomeres, telomerase and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Feb 28;20(8):1940-50.

- Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sørensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA, et al. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut*. 2005 Mar;54(3):374-84.
- Bitton A, Sewitch MJ, Peppercorn MA, deB Edwardes MD, Shah S, Ransil B et al. Psychosocial determinants of relapse in ulcerative colitis: A longitudinal study. *Am J.Gastroenterol*. 2003; 98:2203-2208.
- Boirivant M, Cossu A. Inflammatory bowel disease. *Oral Dis*. 2012 Jan;18(1):1-15.
- Bouma G, Crusius JB, García-González MA, Meijer BU, Hellemans HP, Hakvoort RJ, et al. Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol*. 1999 Feb;115(2):294-300.
- Bozcuk AN. Telomer ve Hücrel Yaşlanma. *Turkish Journal of Geriatrics*. 2002;5 (3):111- 114.
- Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2015 Aug;50(8):942-51.
- Callén E, Surrallés J. Telomere dysfunction in genome instability syndromes. *Mutat Res*. 2004 Sep;567(1):85-104.
- Campisi J, Kim SH, Lim CS, Rubio M. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp Gerontol*. 2001 Nov;36(10):1619-37.
- Canbay A, Buğra D. Kolorektal kanser: Genetik ve moleküler biyoloji araştırmaları hasta tedavisine yeterince yansıyor mu? *Ulusal Cerrahi Dergisi*. 2011; 27(4): 198-205
- Chakhparonian M, Wellinger RJ. Telomere maintenance and DNA replication: how closely are these two connected? *Trends Genet*. 2003 Aug;19(8):439-46.
- Chang LY, Lin SC, Chang CS, Wong YK, Hu YC, Chang KW. Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*. 1999 Oct;28(9):389-96.
- Chen CH, Chen RJ. Prevalence of Telomerase Activity in Human Cancer. *J Formos Med Assoc*. 2011 May;110(5):275-89.

- Chen JL, Blasco MA, Greider CW. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*. 2000 Mar 3;100(5):503-14.
- Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002 Sep;66(3):407-25.
- Cooper GM, Hausman ER. Hücres moleküler yaklaşım. 3. baskı. Çeviri editörleri Meral Sakızlı, Neşe Atabey. İzmir : İzmirTıp Kitabevi; 2006. s.179-184.
- De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005 Sep 15;19(18):2100-10.
- Denchi EL. Give me a break: How telomeres suppress the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*. 2009 Sep 2; 8(9):1118-26.
- Diagnosis and management of colorectal cancer. A national clinical guideline. December 2011
- Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes Ketall. Second European Evidence based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2012 Dec; 6(10):965-90.
- Dikmen ZG, Dikmen E, Doğan P. Kanserde telomeraza yönelik tedavi stratejileri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2006; 37:49-55
- Dikmen ZG, Mender İ, Doğan P. Telomer disfonksiyonu sonucu görülen hastalıklar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2008; 39:163-167
- Dikmen G, Doğan P. Telomera ve Kanseri. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2003; 23
- Durusoy M. Telomera Aktivitesini Değerlendirmede Kullanılan Yöntemler ve Dayandıkları Esaslar. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem]* 2003; 28 (1); 25-29.
- Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001 Apr;48(4):526-35.

- Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J. The history of genetics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*. 2014;27(4):294-303.
- Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 1997 Nov;3(11):1931-41.
- Fajkus J. Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clin Chim Acta*. 2006 Sep;371(1-2):25-31.
- Fernández-Marcelo T, Sánchez-Pernaute A, Pascua I, De Juan C, Head J, Torres García AJ, et al. Clinical Relevance of Telomere Status and Telomerase Activity in Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2016 Feb 25;11(2):e0149626.
- Garcia-Aranda C, de Juan C, Diaz-Lopez A, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, et al. Correlations of telomere length, telomerase activity, and telomeric repeat binding factor 1 expression in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2006 Feb 1; 106(3):541-51.
- Gertig MD, Hunter DJ. Genes and environment in the etiology of colorectal cancer. *Seminars in Cancer Biology*, Vol 8, 1998: p. 285-298.
- Ghori A, Usselman B, Ferryman S, Morris A, Fraser I. Telomerase expression of malignant epithelial cells correlates with Dukes' stage in colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2002 Nov;4(6):441-6.
- Göktürk S, Karaca Ç. İnflamatuvar Barsak Hastalıkları Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri J Gastroenterohepatol-Special Topics* 2012;5(3):11-6
- Güzelgöl F, Aksoy K. Telomeraz Enziminin Tanı ve Tedavide Kullanım Alanı. *dergipark.ulakbim.gov.tr/arsiv/article/view/5000072620* . Arşiv, 2010; 16: 69
- Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009 Nov;22(4):191-7.
- Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
 Review Ouellette MM, Wright EW, Shay JW. Targeting telomerase-expressing cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Vol 15, No 7, 2011 pp. 1433-1442.

- Holzmann K, Klump B, Weis-Klemm M, Hsieh CJ, Borchard F, Gregor M, et al. Telomerase activity in long-standing ulcerative colitis. *Anticancer Res.* 2000 Sep-Oct;20(5C):3951-5.
- Jäger K, Walter M. Therapeutic Targeting of Telomerase. *Genes (Basel)*.2016 Jul 21;7(7).
- Kalkan Ç, Törüner M. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarında Striktürler. *Güncel Gastroenteroloji*. Aralık 2013; 17/4
- Kannan S, Tahara H, Yokozaki H, Mathew B, Nalinakumari KR, Nair MK,et al. Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997 Jun;6(6):413-20.
- Karahasanoğlu T. Kolorektal Kanserler: Tanı ve Cerrahi Tedavi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Surekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu. Ocak 2001; İstanbul, s. 271-279.
- Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE, et al . Functional annotation of a novel NFkB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet.* 2004 Jan 1;13(1):3545.
- Kaya M, Ekin N. Ülseratif Kolitte Güncel Tedavi. *Güncel Gastroenteroloji*. Haziran 2012; 16/2.
- Kim ER, Chang DK. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J Gastroenterol.* 2014 Aug 7;20(29):9872-81.
- Kleideiter E, Friedrich U, Möhring A, Walker S, Höring E, Maier K, et al. Telomerase activity in chronic inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2003 Dec;48(12):2328-32.
- Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzzi C et al: Stress and exacerbation in ulcerative colitis: A prospective study of patients enrolled in remission. *AmJGastroenterol.* 2000; 95:1213-1220.
- Lipps HJ, Rhodes D. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell Biol.* 2009 Aug;19(8):414-22.

Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res*. 2013 Jan 15;319(2):133-41.

Maintenance of chromosomes by telomeres and the enzyme telomerase. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009 • <http://nobelprize.org>

Martínez P, Blasco MA. Replicating through telomeres: a means to an end. *Trends Biochem Sci*. 2015 Sep;40(9):504-15.

Martínez P, Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer*. 2011 Mar;11(3):161-76.

Miroğlu YY, Diraman E, Eren Z. Telomer ve Telomerase. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2011; 4 (2):41-48.

Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2010 May; 6(5): 339–346.

Myung SJ, Yang SK, Chang HS, Byeon JS, Kim KJ, Hong SS, et al. Clinical usefulness of telomerase for the detection of colon cancer in ulcerative colitis patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Oct;20(10):1578-83.

Nowak J, Januszkiewicz D, Lewandowski K, et al. Activity and expression of human telomerase in normal and malignant cells in gastric and colon cancer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:75-80.

Oeseburg H, de Boer RA, van Gilst WH, van der Harst P. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch*. 2010 Jan;459(2):259-68.

Oktay E. İnflamatuvar Barsak Hastalıkları:Etyopatogenez, semptomatoloji, Tanı ve Komplikasyonlar. *Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu*. 11-12 Ocak 2001; İstanbul, s. 199-206.

Ouakrim AD, Pizot C, Boniol M, Malvezzi M, Boniol M, Negri E, et al. Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ*. 2015 Oct 6;351:h4970.

Özer B. İnflamatuvar Barsak Hastalıklarında Kolorektal Kanseri ve Displazi. *Güncel Gastroenteroloji*. Aralık 2011, 15/4.

- Paranjape AN, Rangarajan A. How to Protect the Chromosomal Ends? . Resonance, 2010 - Springer
- Philippi C, Loretz B, Schaefer UF, Lehr CM. Telomerase as an emerging target to fight cancer--opportunities and challenges for nanomedicine. J Control Release. 2010 Sep 1;146(2):228-40.
- Sameshima S, Koketsu S, Takeshita E, Kubota Y, Okuyama T, Saito K, et al. Surgical resections of ulcerative colitis associated with dysplasia or carcinoma. World J Surg Oncol. 2015 Feb 21;13:70.
- Sanz-Casla MT, Vidaurreta M, Sanchez-Rueda D, Maestro ML, Arroyo M, Cerdán FJ. Telomerase activity as a prognostic factor in colorectal cancer. Onkologie. 2005 Nov;28(11):553-7.
- Sapmaz F, Başığit S, Kalkan İH. İnflamatuvar Barsak Hastalıklarında Kolorektal Kanser Gözetimi ve Kemoprevensiyon. Güncel Gastroenteroloji . Mart 2016, 20/1.
- Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2006 Jul;3(7):390-407.
- Sekaran VG, Soares J, Jarstfer MB. Structures of telomerase subunits provide functional insights. Biochim Biophys Acta. 2010 May;1804(5):1190-201
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. CA Canver J Clin. 2016;66:7–30
- Shay JW, Wright WE. Role of telomeres and telomerase in cancer. Semin Cancer Biol. 2011 Dec;21 (6):349-53.
- Sunkara S, Swanson G, Forsyth CB, Keshavarzian A. Chronic Inflammation and Malignancy in Ulcerative Colitis. Hindawi Publishing Corporation Ulcers Volume 2011, Article ID 714046, 8 pages
- Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Yasui W, Shay JW, Ide T, et al. Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions.. Clin Cancer Res. 1995 Nov;1(11):1245-51.
- Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, Nakashio R, Shay JW, Tahara E, et al. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. Cancer Res. 1995 Jul 1;55(13):2734-6.

- Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Shay JW, Matsuura Y, et al. High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2000 Jul;6(7):2696-701.
- Terrin L, Rampazzo E, Pucciarelli S, Agostini M, Bertorelle R, Esposito G, et al. Relationship between tumor and plasma levels of hTERT mRNA in patients with colorectal cancer: implications for monitoring of neoplastic disease. *Clin Cancer Res*. 2008 Nov 15;14(22):7444-51.
- Theimer CA, Feigon J. Structure and function of telomerase RNA. *Current Opinion in Structural Biology* 2006, 16:307–318
- Triantafyllidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res*. 2009 Jul;29(7):2727-37.
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı. Türkiye Kanser İstatistikleri, Ankara 2016.
- Urquidí V, Tarín D, Goodison S. Telomerase in cancer: clinical applications. *Ann Med*. 1998 Oct;30(5):419-30.
- Usselman B, Newbold M, Morris AG, Nwokolo CU. Deficiency of colonic telomerase in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2001 Apr;96(4):1106-12.
- Üzerk M, Çetinkaya H. Ülseratif Kolitin Klasik Tedavisine Genel Bakış ve Anti-TNF Ajanların Rolü. *Güncel Gastroenteroloji*. Mart 2009;13/1.
- Vidaurreta M, Maestro ML, Rafael S, Veganzones S, Sanz-Casla MT, Cerdán J, et al. Telomerase activity in colorectal cancer, prognostic factor and implications in the microsatellite instability pathway. *World J Gastroenterol*. 2007 Jul 28;13(28):3868-72.
- Warren S, Sommers SC. Pathogenesis of ulcerative colitis. *Am J Pathol*. 1949 Jul;25(4):657-79.
- Wyatt, H.D.M, 2009, Structure-Function Analysis of the Human Telomerase Reverse Transcriptase. [phD Thesis]. University of Calgary, September 2009. 1-8.

Web 1 : <http://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46073.html>

Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease .World J Gastroenterol. 2008 Jan 21;14(3):378-89.

Xin H, Liu D, Songyang Z. The telosome/shelterin complex and its functions. Genome Biol. 2008;9(9):232.

Xu XR,Liu CQ,Feng BS,Liu ZJ. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2014 Mar 28;20(12):3255-64.

Yamaner S. Kolorektal Polipler. Kolon Rektum Hast Dergisi. Mart 2007;Vol. 17, No. 1.

Yang H, Rotter JJ, Toyoda H, Landers C, Tyrn D, McElree CK, et al. Ulcerative Colitis: A Genetically Heterogeneous Disorder Defined by Genetic(HLA Class II) and Subclinical (Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies) Markers. J Clin Invest. 1993 Aug;92(2):1080-4.

Yashiro M. Molecular Alterations of Colorectal Cancer with Inflammatory Bowel Disease. Dig Dis Sci. 2015 Aug;60(8):2251-63.

Yıldız MG, Aras S, Duman DC. Telomerlerin yaşlanma ve kanser ilişkisindeki rolü. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2009; 66 (4): 187-195

Yoshida K, Sugino T, Goodison S, Warren BF, D Nolan D, Wadsworth S, et al. Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells in colonic luminal washings and its related clinical implications. British Journal of Cancer (1997) 75(4), 548-553

Zhiqin W, Palaniappan S, Raja Ali RA. Inflammatory Bowel Disease-related Colorectal Cancer in the Asia-Pacific Region: Past, Present, and Future. Intest Res. 2014 Jul;12(3):194-204.

BİLİMSEL ARAŞTIRMA İÇİN AYDINLATILMIŞ HASTA ONAM FORMU
LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Klinik bir çalışmaya dahil edildiniz. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini tam olarak anlamanız ve kararınızı, araştırma hakkında tam olarak bilgilendirildikten sonra özgürce vermeniz gerekmektedir. Araştırma ile ilgili olarak belirtildiği halde anlayamadığınız ya da belirtilemediğini fark ettiğiniz noktalar olursa hekiminize sorunuz ve sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım **gönüllülük** esasına dayalıdır. Araştırma hakkında tam olarak bilgilendirildikten sonra, kararınızı özgürce verebilmeniz ve düşünmeniz için formu imzalamadan önce hekiminiz size zaman tanıyacaktır. Kararınız ne olursa olsun, hekimleriniz sizin tam sağlık halinizin sağlanmasına ve korunmasına yönelik görevlerini bundan sonra da eksiksiz yapacaklardır. Araştırmaya katılmayı kabul ettiğiniz takdirde formu imzalayınız.

ARAŞTIRMANIN ADI

Ülseratif kolitli ve kolon kanserli hastalarda telomeraz aktivasyonu ve klinik öneminin araştırılması

ARAŞTIRMANIN AMACI

Ülseratif kolitli ,kolon kanserli hastaların kolon dokusu ve normal kolon dokusu arasındaki telomeraz aktivitesinin değerlendirilmesi

KULLANILAN YÖNTEM

Kolon kanseri tanısı alarak cerrahi tedaviye karar verilen hastalardan operasyon sırasında rutinde alınan patolojik doku ve normal doku örnekleri ile ülseratif kolit nedeniyle takipli hastaların rutin izlemlerinde kolonoskopi esnasında kolon dokularından numuneler alınacak. Alınan numuneler sonrasında enzim aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla solüsyon içerisinde -80 derecede özel besiyerlerinde saklanacaktır.

KULLANILACAK OLAN MATERYAL

Ameliyet esnasında rutinde alınan patolojik doku ve normal doku örneği ile ülseratif kolitli hastalarda rutin takipte kolonoskopi sırasında alınan doku örneği

BİLGİLENDİRME

Hastayı etkileyeceği düşünülen bir sonuca ulaşırsa hasta bilgilendirilecektir.

Araştırma ile ilgili olarak yeterince bilgilendirildim. Çalışmaya gönüllü olarak katılacağım.

TARİH :

İMZALAR:

Gönüllü ad soyad:

Araştırmacı ad soyad: Arş.Gör.Dr.Tuğba AKIN DUMAN

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı: 16

Toplantı Tarihi: 19.06.2015

Karar Sayısı: 2015/269: Fakültemiz Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM' ın "ÜLSERATİF KOLİTLİ VE KOLON KANSERLİ HASTALARDA TELOMERAZ AKTİVASYONU VE KLİNİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı uzmanlık tez çalışması ile ilgili 12.06.2015 tarihli ve ekleri görüşüldü, Arş. Gör. Dr. Tuğba AKIN DUMAN' ın uzmanlık tez çalışmasının Fakültemiz Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM' ın sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM

Yardımcı Araştırmacılar: Arş. Gör. Dr. Tuğba AKIN DUMAN, Doç. Dr. Hüseyin ATASEVEN, Doç. Dr. Murat ÇAKIR

ASLI GİBİDİR
19.06.2015

Prof. Dr. Saim AÇIKGOZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:48

Toplantı Tarihi: 14.04.2017

Karar Sayısı:2017/888:Fakültemiz Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM' ın “**Ülseratif Kolitli Ve Kolon Kanserli Hastalarda Telomeraz Aktivasyonu Ve Klinik Öneminin Araştırılması**” başlıklı uzmanlık tez çalışması ile ilgili 14.04.2017 tarihli çalışma başlığı değişiklik dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Arş. Gör. Dr. Tuğba AKIN DUMAN' ın uzmanlık tez çalışma başlığının “**Ülseratif Kolitli Ve Kolorektal Kanserli Hastalarda Telomeraz Aktivasyonun Araştırılması**” olarak değiştirilmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM

Yardımcı Araştırmacılar: Arş. Gör. Dr. Tuğba AKIN DUMAN, Prof. Dr. Hüseyin ATASEVEN, Doç. Dr. Murat ÇAKIR

ASLI GİBİDİR
14.04.2017

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

