

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

**KOLOREKTAL KANSER HASTALARININ  
KEMOTERAPİYE YANITININ İZLEMİNDE  
SERUM SİTOKERATİN 18'İN ÖNEMİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**DR. JANSEREY BATU**

**UZMANLIK TEZİ**

**İZMİR-2008**

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

**KOLOREKTAL KANSER HASTALARININ  
KEMOTERAPİYE YANITININ İZLEMİNDE  
SERUM SİTOKERATİN 18'İN ÖNEMİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. JANSEREY BATU**

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ  
PROF.DR.SEMRA KOÇTÜRK

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2006.KB.SAG.021 sayı ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TABLO LİSTESİ.....	I
ŞEKİL LİSTESİ.....	II
GRAFİK LİSTESİ.....	II
KISALTMALAR.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2

## BİRİNCİ BÖLÜM

1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
----------------------	---

## İKİNCİ BÖLÜM

2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. KOLOREKTAL KARSİNOM.....	5
2.1.1. Kolorektal Karsinomun Yayılma Yolları .....	6
2.1.2. Kolorektal Karsinom Sınıflandırması.....	6
2.1.3. Kolorektal Karsinom Tedavisi.....	7
2.1.3.1. Kanser Tedavisinde Kullanılan Kemoterapotik Ajanların Sınıflandırılması.....	7
2.1.3.2. Kolorektal Karsinom Tedavisinde 5-Fluorouracil ve Kombine Kullanılan Kemoterapotikler.....	9
2.1.3.3. 5-Fluorourasil.....	9
2.1.3.4. Leucovorin (Folinik asit).....	9
2.1.3.5. Oksaliptatin (Eloksatin).....	10
2.1.3.6. Folfox.....	10
2.1.4. Kanser Hücrelerinde Apoptozun Önemi.....	10
2.1.5. Kolorektal Kanser Tedavisinin İzleminde Kullanılan Tümör Belirteçleri.....	11
2.1.5.1. Karsinoembriyonik Antijenin Yapı ve Fonksiyonu.....	11
2.1.5.2. Dokuda ve Plazmada Karsinoembriyonik Antijen.....	12

2.1.5.3. Kolorektal Kanserde Operasyon Öncesi Prognostik Belirteç Olarak Karsinoembriyonik Antijenin Önemi.....	13
2.1.5.4. Kolorektal Kanserde Operasyon Sonrası İzlemede Karsinoembriyonik Antijenin Önemi.....	13
2.1.5.5. İleri Evre Kolorektal Kanser Takibinde Karsinoembriyonik Antijen.....	14
2.1.6. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Onkoloji Kliniğinde Kemoterapiye Yanıtın İzlenmesi.....	15
2.2. HÜCRE ÖLÜMÜ.....	15
2.3. ARA FİLAMENLER VE SİTOKERATİN 18 (CK18).....	19
2.3.1. Sitokeratin 18 Genel Bilgi.....	19
2.3.2. Keratinlerin Sindirim Epitelindeki Fonksiyonları.....	22
2.3.3. Sitokeratinlerin Epitel Kaynaklı Olmasının Önemi.....	24
2.3.4. Apoptoz - Nekroz Ayırımında Sitokeratin 18'in Önemi.....	25

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. ARAÇ-GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	27
3.1. ARAÇ ve GEREÇLER.....	27
3.2. OLGU SEÇİMİ VE MATERYAL ELDESİ.....	28
3.2.1. Olgu Seçimi.....	28
3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması.....	28
3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	29
3.3.1. Sitokeratin 18 Düzeyinin Ölçümü.....	29
3.3.1.1. Enzim-Bağlı İmmunosorbent Ölçüm.....	29
3.3.1.2. Sitokeratin 18 Asp396-NE ( M30) Ölçüm Yöntemi.....	30
3.3.1.3. Toplam Sitokeratin 18 Düzeyi ( M65 ) Ölçüm Yöntemi.....	33
3.4. DİĞER BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN ÖLÇÜMLERİ.....	35
3.4.1. Karsinoembriyonik Antijen Ölçüm Yöntemi.....	35
3.4.2. Aspartat Aminotransferaz Ölçüm Yöntemi.....	36
3.4.3. Alanin Aminotransferaz Ölçüm Yöntemi.....	36
3.4.4. Laktat Dehidrogenaz Ölçüm Yöntemi.....	37
3.4.5. Total Bilirubin Ölçüm Yöntemi.....	38
3.4.6. Direk Bilirubin Ölçüm Yöntemi.....	38
3.4.7. Albumin Ölçüm Yöntemi.....	39

3.4.8. BUN Ölçüm Yöntemi.....	39
3.4.9. Kreatinin Ölçüm Yöntemi.....	40
3.5. RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	41
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	42

#### **DÖRDÜNCÜ BÖLÜM**

4. BULGULAR.....	43
4.1. TANIMLAYICI BULGULAR.....	43
4.2. KONTROL GRUBUNUN HASTA GRUBUYLA KARŞILAŞTIRILMASINA AİT BULGULAR.....	56
4.3. HASTA GRUBUNDA M30'A AİT BULGULAR.....	60
4.4. HASTA GRUBUNDA M65'E AİT BULGULAR.....	64
4.5. KARSİNOEMBRYONİK ANTİJEN İLE İLGİLİ BULGULAR.....	67
4.6. KORELASYON ANALİZLERİ.....	67

#### **BESİNCİ BÖLÜM**

5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	69
---------------------------	----

#### **ALTINCI BÖLÜM**

6. KAYNAKLAR.....	74
-------------------	----

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No:</u>
<b>Tablo 1</b> : TNM evrelendirmesi.....	7
<b>Tablo 2</b> : Apoptoz ve nekroz farkı.....	18
<b>Tablo 3</b> : Sitokeratinler ve dokulardaki dağılımı.....	23
<b>Tablo 4</b> : Keratinlerin sindirim epitelindeki fonksiyonları, bazı özellikleri ve hastalıklarla ilişkisi.....	24
<b>Tablo 5</b> : Çalışmada kullanılan cihazlar ve kitler.....	27
<b>Tablo 6</b> : Hastalardan kan alım günleri.....	29
<b>Tablo 7</b> : RECIST kriterlerine göre radyolojik değerlendirme.....	41
<b>Tablo 8</b> : Hasta ve kontrol gruplarının özellikleri ve rutin biyokimya değerleri.....	43
<b>Tablo 9</b> : Hastalarda tümör metastaz yerleri, TNM evresi, tümör tipi.....	44
<b>Tablo 10</b> : Kolon kanser hastalarında KT öncesi serum CEA, M30 ve M65 düzeyleri...	46
<b>Tablo 11</b> : Kolorektal kanser hastalarında serum M30 ve M65 düzeylerinin tedavi sırasındaki değişimi.....	55
<b>Tablo 12</b> : Hasta ve kontrol grubunda M30 düzeylerinin karşılaştırılması.....	58
<b>Tablo 13</b> : Hasta ve kontrol grubunda M65 düzeylerinin karşılaştırılması.....	59
<b>Tablo 14</b> : Hasta grubunda KT öncesi M30 düzeyi ile KT sonrası M30 düzeylerinin kürler-arası karşılaştırılması.....	62
<b>Tablo 15</b> : Hasta grubunda M30 düzeylerinin kür- içi karşılaştırılması.....	63
<b>Tablo 16</b> : Hasta grubunda KT öncesi ile KT sonrası M65 düzeylerinin kürler-arası karşılaştırılması.....	65
<b>Tablo 17</b> : Hasta grubunda M65 düzeylerinin kür- içi karşılaştırılması.....	66
<b>Tablo 18</b> : Hasta grubunda KT öncesi serum CEA düzeyleri ile üçüncü ve altıncı KT sonrası serum CEA düzeylerinin karşılaştırılması.....	67
<b>Tablo 19</b> : Hastalarda serum CEA düzeyleri ile M30 düzeyleri arasındaki korelasyon.....	68
<b>Tablo 20</b> : Hastalarda serum CEA düzeyleri ile M65 düzeyleri arasındaki korelasyon.....	68

## SEKİL LİSTESİ

### Sayfa No:

<b>Şekil 1</b>	: Ara filament proteinlerin genel yapısı içinde L1–2 bölgesindeki kaspaz kesim sekansları.....	20
<b>Şekil 2</b>	: CK8/18 dimerinin şematik görünümü.....	21
<b>Şekil 3</b>	: M30 standart eğrisi.....	32
<b>Şekil 4</b>	: M65 standart eğrisi.....	35
<b>Şekil 5</b>	: AST ölçüm yöntemi.....	36
<b>Şekil 6</b>	: ALT ölçüm yöntemi.....	37
<b>Şekil 7</b>	: LDH ölçüm yöntemi.....	37
<b>Şekil 8</b>	: Total bilirubin ölçüm yöntemi.....	38
<b>Şekil 9</b>	: Direk bilirubin ölçüm yöntemi.....	39
<b>Şekil 10</b>	: Albumin ölçüm yöntemi .....	39
<b>Şekil 11</b>	: BUN ölçüm yöntemi.....	40
<b>Şekil 12</b>	: Kreatinin ölçüm yöntemi.....	40

## GRAFİK LİSTESİ

### Sayfa No:

<b>Grafik 1</b>	: Hasta ve kontrol grubundaki bireylerde serum M65 düzeyleri.....	45
<b>Grafik 2</b>	: Hasta ve kontrol grubundaki bireylerde serum M30 düzeyleri.....	45
<b>Grafik 3</b>	: Kemoterapi kürleri sırasında M30 ve M65 değerleri birinci KT öncesi alınan kandaki düzeyinin üzerine çıkan hastaların sayısı.....	46
<b>Grafik 4</b>	: Hastalarda M30 ve M65 düzeylerinin tedavi boyunca değişimi.....	47
<b>Grafik 5</b>	: Hastalarda birinci KT'den iki gün sonra serum M30 ve M65 düzeylerinin tedavi öncesine göre % değişimi.....	53
<b>Grafik 6</b>	: Hastalarda üçüncü KT'den iki gün sonra serum M30 ve M65 düzeylerinin tedavi öncesine göre % değişimi.....	53
<b>Grafik 7</b>	: Hastalarda altıncı KT'den iki gün sonra serum M30 ve M65 düzeylerinin tedavi öncesine göre % değişimi.....	54
<b>Grafik 8</b>	: Hastalarda tedavi sırasında toplam hücre ölümünün en fazla olduğu günde apoptoz-nekroz yüzdesi.....	54
<b>Grafik 9</b>	: Kontrol ve hasta grubunda birinci KT'den önce serum M30 düzeyleri.....	56
<b>Grafik 10</b>	: Kontrol ve hasta grubunda birinci KT'den önce serum M65 düzeyleri.....	56
<b>Grafik 11</b>	: Birinci KT öncesi hasta ve kontrol grubu M30/M65 oranı.....	60

## **KISALTMALAR**

<b>ALT</b>	: Alanin aminotransferaz
<b>AST</b>	: Aspartat aminotransferaz
<b>CEA</b>	: Karsinoembriyonik antijen
<b>CK</b>	: Sitokeratin
<b>DEÜTF</b>	: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
<b>EIA</b>	: Enzim-immün ölçüm
<b>ELISA</b>	: Enzim-bağlı immunosorbent ölçüm
<b>HRP</b>	: Horseradish Peroxidase
<b>KT</b>	: Kemoterapi
<b>LDH</b>	: Laktat dehidrogenaz
<b>LN</b>	: Lenf nodu
<b>RECIST</b>	: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
<b>TMB</b>	: Tetrametilbenzidin
<b>TNM</b>	: Tümör, lenf nodu, metastaz



## TEŞEKKÜR

*Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel birikimini benimle paylaşan, gülüyüzünü ve manevi desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Banu ÖNÜR'AL'a ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ;*

*Tez çalışmalarında bilimsel olarak bana yol gösteren, kolaylık sağlayan ve gülüyüzünü esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK'e, çalışmamda hastaların seçimi ve çalışmaya dahil edilmesinde destek olan Hematoloji-Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Uğur Yılmaz'a, örneklerin toplanmasında bana yardımcı olan Kemoterapi Ünitesi Başhemşiresi Sayın Deniz Arslan'a ve tüm Kemoterapi Ünitesi hemşirelerine ;*

*Tez örneklerinin çalışılması sırasında yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Uzman Dr.Ali Rıza ŞİŞMAN ve Uzman Dr.Tuncay KÜME'ye, bazı örneklerin toplanmasında bana yardımcı olan Sayın Uzman Dr.Serpil TANRIVERDİ AKHİSAROĞLU, Uzman Dr.Zekiye SULTAN ALTUN, Araş.Gör.Dr.Özlem GÜRSOY ÇALAN, Araş.Gör.Dr.Birsen TUĞLU, Araş.Gör.Dr.Nur Hilal YUSUFOĞLU'na, arkadaşlıklarını ve sevgilerini esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma ;*

*Tüm yazışmalarımızı titizlikle yapan anabilim dalımızın gülüyüzüylü sekreteri Sayın Eda OLUM'a ;*

*Desteğini ve sevgisini esirgemeyen sevgili aileme en içten dileklerle teşekkür ederim.*

*Dr.Janserey BATU*

## ÖZET

### KOLOREKTAL KANSER HASTALARININ KEMOTERAPİYE YANITININ İZLEMİNDE SERUM SİTOKERATİN 18'İN ÖNEMİ

Bu çalışmada; Folfox kemoterapi protokolü uygulanan kolorektal kanser hastalarının tedavisi sırasında, serum sitokeratin 18 M30 ve M65 protein düzeylerinin tedavinin etkinliğini izleme gücü araştırılmıştır. Sitokeratin 18 'in kemoterapotik ajana hasta yanıtının izlenmesindeki yararlılığı, karsinoembriyonik antijen ve radyolojik değerlendirme ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

Çalışmaya 37-75 yaşları arasında 7 kadın ve 10 erkek hasta dahil edildi. Hastaların tümünde tümör tipi adenokarsinomdur. Serum sitokeratin 18 düzeyleri birinci, üçüncü, altıncı KT kürlerinin 0.,2.,14. günlerinde ölçüldü. Kontrol grubu herhangi bir ilaç kullanmayan ve bilinen bir hastalığı olmayan, 30-56 yaşları arasında 9 kadın ve 11 erkek bireyden oluşturuldu. Serum sitokeratin 18 düzeyleri, toplam hücre ölümüne spesifik olan M65-ELISA ve apoptotik hücre ölümüne spesifik olan M30-ELISA kitleri kullanılarak ölçülmüştür. Karsinoembriyonik antijen ölçümünde kemilüminesans immunometrik yöntem kullanılmıştır. Tedaviye klinik cevap *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (RECIST)'e göre değerlendirildi. Sonuçlar  $p<0,05$  anlamlılık düzeyinde değerlendirildi.

Sitokeratin 18 düzeylerinin, bir kısım hastada tedavi boyunca yükseldiği bir kısım hastada düştüğü saptanmıştır. Toplam hücre ölümünün en fazla olduğu günde hastalarda baskın hücre ölüm tipinin apoptoz olmadığı belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubunda M30/M65 oranı bireyler arasında farklılık göstermektedir. Progresyonsuz hastalarda M30 ve M65 düzeylerinin yükselmesi kemoterapinin yan etkisi olarak değerlendirilebilir.

Sonuç olarak; çalışmamızda kısmi yanıt veren hastalarda, M30 değerlerinde üçüncü kürde istatistiksel olarak artış görülmesi, ilerleyici hastalıkta artış görülmemesi; M30'un neoadjuvan tedavi alan kolorektal kanserli hastalarda erken yanıt izleminde karsinoembriyonik antijenden daha duyarlı bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir ancak kısıtlı sayıda hasta ile gerçekleştirilen bu çalışma ile serum sitokeratin 18 'in klinik kullanımı ile ilgili bir yargıya varılamayacağını ve daha büyük hasta grupları ile yapılacak çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Sitokeratin 18, M30, M65, kolorektal kanser, kemoterapi, karsinoembriyonik antijen, apoptoz, nekroz.

## **SUMMARY**

### **EFFICIENCY OF SERUM CYTOKERATIN 18 LEVELS FOR MONITORING OF COLORECTAL CANCER PATIENTS UNDER CHEMOTHERAPY**

In this study, we investigated the efficiency of serum cytokeratin 18 M30 and M65 protein levels for monitoring of colorectal cancer patients under Folfox chemotherapy. Usefulness of cytokeratin 18 to monitor the response to chemotherapy treatment was compared with carcinoembryonic antigen and radiological tumor size.

Serum cytokeratin 18 levels were measured with M65-ELISA and M30-ELISA methods which are specific for total cell death and apoptotic cell death, respectively. Carcinoembryonic antigen level was measured by chemiluminescence immunometric assay. Clinical responses to treatments were evaluated according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST).

Cytokeratin 18 levels showed an increasing or decreasing pattern during chemotherapy treatment of the patients. It has been determined that dominant cell death type wasn't apoptosis when total cell death was at maximum. Individual differences in the M30/M65 ratio of patients and healthy subjects have been determined. Although patients who were considered as "partial response" according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors showed an increase in serum M30 levels at the third chemotherapy cure, patients who had progressive disease showed no change in serum M30 levels. Increase in serum M30 and M65 levels of the patients who showed no progression may be considered as a side effect of chemotherapy.

As a result, M30 is more effective than carcinoembryonic antigen for monitoring of colorectal cancer patients under neoadjuvant chemotherapy but. the present study did not include sufficient number of patients to warrant any statement with regard to the clinical utility of cytokeratin 18 serum measurements, thus larger studies should be conducted.

**Key Words:** Cytokeratin 18, M30, M65, colorectal cancer, chemotherapy, carcinoembryonic antigen, apoptosis, necrosis.

---

---

## BİRİNCİ BÖLÜM

---

---

### 1. GİRİŞ ve AMAC

Kolorektal kanser dünyada her yıl bir milyondan fazla insanı etkilemektedir. Kurumumuzda kolon kanserli hastaların kemoterapi tedavisi sırasında tedavi izlemi, serum karsinoembriyonik antijen (CEA) değerleri ile yapılmakta ve Avrupa protokolüne göre üç ayın sonunda tümör RECIST kriterleri ile değerlendirilmektedir. Bu aşamadan sonra gerek görülürse kemoterapi (KT) protokolünde değişikliğe gidilmektedir.

Kemoterapi ve radyoterapiye hastanın duyarlılığını ölçmek için yıllardır yapılan çalışmalar, uygun belirtecin saptanması konusunda kesin bir sonuca ulaşamamıştır. Günümüzde kanser hastasının tedavisi sırasında ölen tümör hücrelerinden salınan makromoleküllerin serumda ölçülmesi, uygulanan tedavinin etkinliğinin izlenmesini sağlayan etkin ve ucuz bir yöntemdir. Bunun yanı sıra kanser hastalarının plazmalarında DNA düzeylerindeki artış oldukça iyi tanımlanmıştır<sup>1</sup>. Daha önceki çalışmalarda, hasta plazmasında saptanan DNA büyüklüğü, tümör ölüm tipini belirlemek için kullanılmıştır ancak plazmada saptanan DNA'nın bir kısmının apoptoza giren makrofajlardan salındığı öngörülmektedir. Makrofajlarda sitokeratin 18 (CK18) ekspresyonu bulunmamaktadır. Bu nedenle de CK18 ölçümünün, DNA büyüklüğünün ölçülmesine göre, hücre ölüm tipini belirlemek açısından daha doğru sonuç vermesi beklenmektedir. Kanser hasta serumlarında artan birçok hücre protein "serum tümör belirteçleri" olarak adlandırılmakta ve hastalığın takibinde kullanılmaktadır. Organ ve kanser spesifikliği çok yüksek olmayan bu belirteçlerin tedavi izleminde yeterli bilgiyi sağlama gücü düşüktür. Bir başka yaklaşım da, hasta kanında tümör kaynaklı peptidleri araştırmaktır. Ancak bu peptidlerin sayısı çok fazla (109'dan daha fazla) olduğu için bu yaklaşım da oldukça komplikedir. Tümör kaynaklı proteinler pg/mL düzeylerinde bulunduğundan diğer serum proteinleri arasında ölçümleri zordur.

Hücre iskeletinin yapısındaki filamentlerden olan Tip I ve Tip II sitokeratinler, hem normal hem de transforme epitel hücrelerinde bulunan ve çoğu kanser çeşidinde eksprese olan proteinlerdir. Sitokeratin 8, 18 ve 19 meme, prostat, akciğer, over ve kolonu da kapsayan birçok kanser hücresi tarafından eksprese edilmektedir. Tümör hücrelerinden salınan sitokeratinlerin epitelyal malignansı olan hastalarda klinik progresyonu değerlendirmek için faydalı serum tümör

belirteçleri olduğu düşünülmektedir. Araştırmacılar için hücre ölüm şeklini belirlemek; etkin ilaç geliştirmek, yan etkileri azaltmak ve ilaç etkilerini izlemek açısından önemlidir. Kaspazlar tarafından kesilmiş / total CK 18 oranı hücrenin apoptoza mı yoksa nekroza mı gideceğini belirler. Sitokeratin 18'in M30 ve M65 epitoplarına spesifik antikorların kullanılmasının apoptozu uyaran bileşiklerin epitelial hücrelerdeki etkilerini izlemek için kullanışlı bir araç olduğu savunulmaktadır. Sitokeratin 18'in epitelial kaynaklı olması, serum CK18 değerinin diğer organlardan ( KT'den en çok etkilenen organ olan kemik iliği gibi) etkilenme olasılığını ortadan kaldırmaktadır.

Bu bilgiler göz önüne alındığında CK 18 ölçümü, değerlendirilmesi zor olan klinik durumlar için kurtarıcı olabilir. Özellikle ilerlemiş hastalığı olan birçok hasta tedaviye, tümör kütlelerinde radyolojik olarak ölçülebilir bir azalmayla cevap vermez. Tedavinin etkilerini birebir takip etmek , ilaç çeşidi ve dozunu ayarlama imkanı verebilir.

Bu çalışmada; Folfox kemoterapi protokolü uygulanan kolorektal kanserli hastalardan alınan kan örneklerinde tedavi etkinliğini ve hücre ölümünü yansıtacağı öngörülen CK18 M30 (apoptotik hücre ölüm belirteci) ve M65 (toplam hücre ölümünü gösteren belirteç) protein düzeyleri serumda ölçülerek kullanılan kemoterapötik ajanın etkinliği erken dönemde izlenmeye çalışılmıştır. Kemoterapötik ajana yanıtın izlenmesinde bu belirteçlerin, şu anda izlem için kullanılmakta olan CEA'ya ve üç ayın sonundaki radyolojik değerlendirmeye göre yararlılığı araştırılmıştır.

Son yıllarda CK18 kemoterapötik ajanların izleminde kullanılabilecek önemli bir belirteç olarak görülmektedir. Epitelial karsinomlar arasında yapılan çalışmalar daha çok meme karsinomu üzerinde yoğunlaşmıştır ve kolon karsinomu ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmayla, kolon karsinomunda CK18'in tedavi etkinliğini değerlendirmedeki yararlılığının araştırılarak literatüre katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

---

---

## İKİNCİ BÖLÜM

---

---

### 2. GENEL BİLGİLER

#### 2.1. KOLOREKTAL KARSİNOM

Jemal A. ve arkadaşlarının yaptığı kapsamlı araştırmaya göre, 2007’de ABD’de en sık görülmesi beklenen kanserler erkeklerde prostat, akciğer, kolon, rektum kanserleri iken, kadınlarda meme, akciğer, kolon ve rektum kanserleridir<sup>2</sup>. Kolorektal karsinomlar gastrointestinal sistemin en sık rastlanan tümörleridir. İleri yaş grubu hastalığı olarak bilinen kolorektal karsinomun görülme sıklığı 50 yaşından sonra giderek artmakta ve 80 yaşından sonra en yüksek değerine ulaşmaktadır<sup>3</sup>.

Kolorektal kanserlerin mukozayı etkileyen genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak geliştiği öngörülmektedir<sup>4</sup>. Kolon kanserine yakalanma açısından yüksek risk altında olan kişilerde kolon kript alanlarının proliferatif artışı söz konusudur. Kolon kanser gelişiminde kript hücrelerinin proliferatif artışının hücrelerin büyüme regülasyonundaki bozukluğa bağlı olduğu düşünülmektedir<sup>5</sup>. Kript hücrelerinin hiperproliferasyonunun yağdan zengin diyet ile beslenenlerde, ailesel polipozis /ailesel adenomu olanlarda geliştiği ancak polipozis olmadan da kalıtsal kolorektal karsinom (Lynch sendromu) gelişebildiği bilinmektedir<sup>6</sup>. Moleküler çalışmalar adenomdan karsinoma dönüşümde erken dönemde ras gen mutasyonu olduğunu göstermiştir<sup>4</sup>. Bir protoonkogen olan ‘ras’ mutasyonunun kolon karsinomlarının %40-50’sinde var olduğu bildirilmektedir. İlerlemiş tümörlerde ise 17a ve 18a kromozomlarındaki tümör supresör genlerin kaybı saptanmıştır<sup>7</sup>. Epidemiyolojik çalışmalar diyetteki et, yağ ve kolesterolün kolon karsinogenezinde önemli rol oynadığını göstermiştir<sup>8</sup>. Bu etkenlerin yanı sıra safra asitlerinin barsakta artması, üreterosigmoidostomi, ülseratif kolit’in de önemli etkenler oldukları belirtilmektedir<sup>9</sup>.

### **2.1.1. Kolorektal Karsinomun Yayılma Yolları**

Kolorektal karsinom direkt invazyonla, implantasyonla, lenfatik ve hematojen yolla yayılmaktadır. Genellikle kolorektal karsinomlar duvar derinliğine doğru yayılım göstermektedir ve barsak duvarına doğru olan yayılımın distale doğru gerçekleşme olasılığı çok düşüktür. Barsağın tam kat tutulumundan sonra komşu organlara direkt invazyon görülebilir. Tümörün intraperitoneal implantasyonu, peritoneal karsinomatozise yol açar. Kolorektal karsinomların en sık yayılma yolu %25-40 oranıyla lenfatik yayılımdır. Barsak duvarında invazyonu tam kata ulaşmış olan hastaların yaklaşık yarısında lenf bezi metastazı saptanmaktadır. Rektal lezyonlarda retrograd lenfatik yayılım da söz konusudur. Hematojen yayılım ise karsinom hücrelerinin kan dolaşımına geçmesi sonucu oluşmakta ve en sık karaciğere, ikinci sıklıkta akciğere metastaz yapmaktadır<sup>10</sup>.

### **2.1.2. Kolorektal Karsinom Sınıflandırması**

American Joint Committee'nin tümör, lenf nodu, metastaz (TNM) sınıflandırmasına göre kolorektal karsinomda 5 evre tanımlanmaktadır<sup>3</sup>.

#### **Primer Tümör (T):**

T<sub>x</sub> Primer tümörü bilinmeyen

T0 Primer tümörü olmayan

T1s İn-situ karsinom

T1 Submukozaya kadar tutulum

T2 Muscularis propriaya kadar tutulum

T3 Subserozaya kadar tutulum

T4 Tüm duvar veya komşu organ

tutulumu

#### **Uzak Metastaz (M):**

M<sub>x</sub> Uzak metastazı değerlendirilemeyen

M0 Uzak metastazı olmayan

M1 Uzak metastazı olan

#### **Bölgesel Lenf Nodu (LN):**

N<sub>x</sub> Değerlendirilemeyen LN

N0 LN metastazı yok

N1 1-3 perikolik LN tutulumu

N2 2-4 perikolik veya perirektal LN metastazı

N3 Damarlar boyunca LN metastazı

EVRE		TNM
0	İn-situ karsinom	T <sub>is</sub> , N <sub>0</sub> , M <sub>0</sub>
I	Muscularis propria'ya kadar yayılım	T <sub>1</sub> , N <sub>0</sub> , M <sub>0</sub> veya T <sub>2</sub> , N <sub>0</sub> , M <sub>0</sub>
II	Tüm barsak duvarı tutulumu	II A: T <sub>3</sub> ,N <sub>0</sub> ,M <sub>0</sub>
		II B: T <sub>4</sub> ,N <sub>0</sub> ,M <sub>0</sub>
III	Lenf nodu metastazı varlığı	IIIA: T <sub>1-2</sub> ,N <sub>1</sub> ,M <sub>0</sub>
		IIIB: T <sub>3-4</sub> , N <sub>1</sub> ,M <sub>0</sub>
		IIIC: T, N <sub>2</sub> ,M <sub>0</sub>
IV	Uzak metastaz varlığı	T, N, M <sub>1</sub>

**Tablo 1.** TNM evrelendirmesi

### 2.1.3. Kolorektal Karsinom Tedavisi

Kolorektal karsinom tedavisinde hastanın evresine göre cerrahi rezeksiyon, KT ve radyoterapi uygulanabilmektedir. Cerrahi tedavi prensipleri lezyonun evresine ve lokalizasyonuna göre değişir. Sistemik KT adjuvan olarak rezeksiyon sonrasında, metastaz veya yerel rekürrens durumlarında endikedir. Hastanemizde kolon kanseri tedavisinde uygulanan KT 14 günde bir olmak üzere üç ay boyunca altı kür olarak uygulanmaktadır. Serozayı aşmış evre II B veya LN metastazı yapmış evre III, IV olgularına KT verilmelidir. Radyoterapi özellikle ağır olguların palyasyonu açısından yararlı görülmektedir<sup>3</sup>.

#### 2.1.3.1. Kanser Tedavisinde Kullanılan Kemoterapötik Ajanların Sınıflandırılması

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar başlıca altı gruba ayrılabilir: Alkile edici ajanlar, antimetabolitler, alkaloidler, antibiotikler, hormonal ajanlar, diğer antikanser ilaçlar.

##### *Alkile Edici Ajanlar*

Bu gruptaki ilaçlar, sitotoksik etkilerini alkil gruplarını hücresel bileşenlere aktararak göstermektedir. DNA alkilasyonu hücre ölümünün esas nedenidir ancak bu ilaçlar hücresel



nükleofillerin sülfhidril, amino, hidroksil, karboksil ve fosfat grupları ile de kimyasal etkileşime girmektedir. Alkile edici ajanlar; biskloretilamin, nitrozoüre, aziridin veya alkilsulfonat yapısındadır.

Busulfan, siklofosamid, mekloretilamin, klorambusil, melphalan, thiotepa, karmustin, lomustin, semustin, trietilenemelamin, prokarbazin, dakarbazin, altretamin, sisplatin, karboplatin, oksaliplatin alkile edici ajanlardır<sup>11</sup>.

### ***Antimetabolitler***

Antimetabolitler farklı yollardan nükleotid ve nükleik asit sentezini etkiler. Folik asit antimetabolitleri, pürin antimetabolitleri ve pirimidin antimetabolitleri olmak üzere üç gruba ayrılır. Metotrexat, folik asit antimetabolitidir. Merkaptopürin, tioguanin, fludarabin pürin antimetabolitleridir. Florourasil (5-FU), floksuridin, sitarabin, gemtisabin, kapesitabin, raltitrekset, kladribin pirimidin antimetabolitleridir<sup>11</sup>.

### ***Alkaloidler***

Alkaloid sınıfındaki kemoterapötik ilaçlar bitkilerden elde edilir veya bitkilerden elde edilen alkaloidlerin sentetik türevleridir. Bleomisin, daktinomisin, daunorubisin, doksorubisin, etoposid, teniposid, idarubisin, plikamisin, mitomisin, vinblastin, vinkristin alkaloid ilaçlardır<sup>11</sup>.

### ***Antibiotikler***

Büyümeyi inhibe eden antibiotikler, kanser KT'sinde de kullanılmaya başlanmıştır. Bu antibiotikler; antrasiklinler, aktinomisin, bleomisin, mitomisin ve plikamisindir<sup>10</sup>.

### ***Hormonal Ajanlar***

Kanser tedavisinde kullanılan hormonal ajanlar; steroid hormonlar ve antisteroid ilaçlar, östrojen ve androjen inhibitörleri, gonadotropin salgılatıcı hormon agonistleri ve aromataz inhibitörleridir<sup>11</sup>.

### ***Diğer Antikanser İlaçlar***

Kanser tedavisinde kullanılan diğer ilaçlar; Amsakrin, asparajinaz, hidroksiüre, mitotan, mitoksantron ve quinakrindir.

### **2.1.3.2. Kolorektal Karsinom Tedavisinde 5-Fluorouracil ve Kombine Kullanılan Kemoterapotikler**

10 yıl öncesine kadar, 5-fluorouracil (5-FU) metastatik kolorektal kanserde leucovorin (LV) ile kombine edilerek en çok kullanılan kemoterapötikti . Yapılan çalışmalar sonucunda 5-FU'in 12 aydan daha kısa hayatta kalım sağladığının belirlenmesi ile yeni KT kombinasyonlarına yönelik araştırmalar hız kazanmıştır<sup>12</sup>. Yeni KT kombinasyonları ortalama hayatta kalım süresinin 20 aya kadar uzamasını sağlamıştır<sup>13</sup>. Birinci jenerasyon 5-FU/LV kürleri hayatta kalımda ılımlı düzelme sağladığı için 5-FU'le kombine edilerek kullanılacak yeni ajanlar araştırılmaya başlanmıştır. Bu ajanlar arasında irinotecan, capecitabine ve oxaliplatin sayılabilir.

### **2.1.3.3. 5-Fluorourasil**

İleri evre kolon kanserinde bugün için temel ilaç bir pürin analogu olan 5-FU' dir<sup>13</sup>. 5-FU, bir antimetabolittir. Pirimidin nükleotid sentezinde hız sınırlayıcı basamak olan timidilat sentaz enzimini inhibe ederek etki göstermektedir<sup>15</sup>. 5-FU, nükleotid sentezi sırasında ribozil ve deoksiribozil nükleotid metabolitlerine dönüşmektedir. Bu metabolitlerden biri olan 5-floro-2-deoksiüridin 5-fosfat (FdUMP); timidilat sentetaz enzimi ve kofaktörü N<sup>5,10</sup>-metilentetra hidrofolat ile kovalent bağ kurarak bir kompleks oluşturmakta ve DNA sentezini inhibe etmektedir. Bunun yanı sıra 5-FU; 5-floroüridintrifosfata dönüşerek RNA yapısına da girmekte ve RNA'nın fonksiyonunu bozmaktadır. Etki mekanizmasına bağlı olarak 5-FU birçok adenokarsinomun tedavisinde kullanılmaktadır<sup>16</sup>.

### **2.1.3.4. Leucovorin (Folinik asit)**

Leucovorin, tetrahidrofolik asitin 5-formil türevidir. Kolayca diğer indirgenmiş folik asid türevlerine dönüşür ve vitamin etkisine sahiptir. Folik asid türevlerine dönüşürken dihidrofolat redüktaza ihtiyaç duymaz. Bu yüzden de vitamin fonksiyonu, metotreksat gibi birçok ilacın inhibisyonuna karşı duyarsızdır. Böylece leucovorin, dihidrofolat redüktaz inhibisyonu varlığında

bir miktar pürin ve pirimidin oluşumu sağlayarak normal DNA replikasyonunun devam etmesine izin vermektedir<sup>11</sup>. Kolon kanserinde tek başına 5-FU'in kullanılması ile elde edilen yanıt oranları %10-15 düzeyinde kalmıştır<sup>11</sup>. Bu nedenle 5-FU'in etkinliğini arttıracak maddeler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, Leucovorinin, 5-FU'in timidilat sentaz ile bağıını daha istikrarlı kıldığı saptanmıştır. Günümüzde kolon kanseri tedavisinde 5-FU'in leucovorin ile kombine edilerek kullanılmasıyla yanıt oranı %33'e yükselmiştir<sup>17</sup>.

#### **2.1.3.5. Oksaliplatin (Eloksatin)**

Oksaliplatin, alkile edici ajanlar sınıfına giren üçüncü jenerasyon platin türevidir. Timidilat sentaz enzimini inhibe eder. Tek başına kullanıldığında sınırlı etkisi vardır. 5-Fluorourasil ile kombine edilerek kullanıldığında %45'e varan yanıt oranları sağlanmış, böylece kolon kanserinde kullanılan ilaçlar arasında yer almıştır<sup>18</sup>.

#### **2.1.3.6. Folfox (Oksaliplatin + 5-Fluorourasil + Leucovorin Kombinasyonu)**

Yapılan çalışmalarla kolorektal kanser hastalarında 5-FU + leucovorin ile folfox kombinasyonları hasta yanıtı açısından karşılaştırılmış, folfox ile %53 oranında yanıt elde edilmiş ve folfox'un birinci sıra tedavide 5-FU + leucovorin kombinasyonundan daha üstün olduğu saptanmıştır<sup>19</sup>.

#### **2.1.4. Kanser Hücrelerinde Apoptozun Önemi**

Kanserin hücre proliferasyonunda artış ve apoptozda azalmaya bağlı olarak geliştiği bilinmektedir<sup>20</sup>. Hücre ölümü inhibe olduğunda hasarlı hücreler birikmekte ve dokuda hasara neden olmaktadır. Kemoterapi ile etkin tedavinin sonucunda hücrelerde apoptoz meydana gelmektedir<sup>21</sup>. Birçok antikanser ilaç, tümör hücre DNA sentezine ve hücre bölünmesine etki ederek apoptoz indüksiyonuna neden olmaktadır<sup>22</sup>. Kemoterapinin apoptoz dışındaki sonuçları nekroz, geçici hücre olarak hücre siklusunda duraksama, hücre yaşlanması ve otofaji olabilmektedir<sup>23</sup>. Kanser eradikasyonu için, apoptozda olduğu gibi, neoplastik hücrelerin kalıcı olarak eliminasyonuna ihtiyaç vardır<sup>20</sup>. İlaç tedavisinden sonra hücrenin apoptoza duyarlılığının değişmesinin, edinilmiş ilaç direncinde önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında, kanserde ilaç tedavisinin en önemli hedeflerinden birinin, neoplastik hücrelerde apoptozu hızlandırmak olduğu

düşünülmektedir<sup>22</sup>. Hücre ölümünün izlenmesi antikanser tedavinin etkinliğinin takip edilmesini sağlar. Hücre ölümünün izlenmesinde ölü hücreler tarafından üretilen ve salınan maddelerin kandaki miktarını ölçmek basit bir yoldur. Kanda ölçülen bu belirteçlerden biri olan sitokeratinlerin, apoptoz-nekroz ayırımını da sağlamasından dolayı diğer belirteçlerden daha avantajlı oldukları öngörülmektedir<sup>24</sup>.

### **2.1.5. Kolorektal Kanser Tedavisinin İzleminde Kullanılan Tümör Belirteçleri**

Günümüzde sık rastlanılan kanserlere uygun en az bir tümör belirteci veya belirteçler kombinasyonu mevcuttur. Kolorektal karsinomlar için ortak görüş; CEA'nın iyi bir belirteç olduğu yönündedir. Karsinoembriyonik antijen tarama testi olarak kullanılmamakta, tedavinin takibinde kullanılmaktadır<sup>25</sup>. Erken evre kolon kanserinin takibinde duyarlılığı en yüksek belirteç olarak CEA, duyarlılığı daha düşük bir belirteç olarak karbonhidrat antijen 19/9 (CA 19/9) önerilmektedir<sup>26</sup>. Karsinoembriyonik antijenin duyarlılığının kolon kanseri için % 40, rektum kanseri için % 47 olduğu saptanmıştır<sup>27</sup>. Karsinoembriyonik antijen, karbonhidrat antijen 242 (CA 242) ile birlikte kullanıldığında; kolon kanseri için duyarlılık % 57'ye, rektum kanseri için % 62'ye yükselmiştir. Kolorektal karsinomlar için en iyi belirteç olduğu düşünülen CEA'nın düzeyi, tümörün evresine ve derecesine bağlıdır. Karsinoembriyonik antijen düzeyinin yükselmesi karaciğer metastazı göstergesidir<sup>27</sup>.

#### **2.1.5.1. Karsinoembriyonik Antijenin Yapı ve Fonksiyonu**

Karsinoembriyonik antijen immunoglobulin gen ailesinin yaklaşık 20 molekülünden biri olan kompleks bir glikoproteinler sınıfını tanımlamaktadır<sup>28</sup>. Karsinoembriyonik antijen, onkofetal antijen sınıfının bir üyesidir. İlk kez 1965'de Gold ve Freedman tarafından tanımlanan CEA, günümüzde gastrointestinal sistem tümörlerinde en bilinen belirteç haline gelmiştir<sup>29</sup>. Karsinoembriyonik antijen normal erişkin insan hücrelerinde, normal gelişen fetüste ve bazı kanser hücrelerinde üretilmektedir<sup>30</sup>. Tek bir polipeptid zincirden oluşan CEA'nın antijenik özelliğini yapısının % 60'ını oluşturan karbonhidrat içeriği sağlamaktadır<sup>31</sup>. Ondokuzuncu kromozom üzerinde bulunan yaklaşık 10 adet gen CEA proteinlerini kodlamaktadır<sup>32</sup>. Moleküler ağırlığı 210 kilodalton (kD)'dur<sup>31</sup>. Karsinoembriyonik antijenin aminoasid dizilimi, karbonhidrat içeriği, karbonhidrat/protein oranı kaynağa ve hastaya göre değişkenlik göstermektedir<sup>33</sup>. Bir yüzey

immunoglobulini olan CEA, metastaz bölgelerindeki CEA reseptörlerine bağlanarak hücrelerarası tanınma ve yapışmada rol oynamaktadır<sup>34</sup>. Hücrelerarası yapışmayı düzenleyerek hücresel agregasyon için tetikleyici görevi görür<sup>35</sup>. Kolon kanser hücrelerinin bazolateral yüzeyinde CEA ekspresyonunun artması, normal hücrelerarası bağlar ve hücre kollajen bağlarının bozulmasına katkıda bulunur. Bunun sonucunda hücresel göç hızlanır<sup>30</sup>.

Karsinoembriyonik antijenin yapısının immunoglobulinlere benzerliği, bazı immün düzenleyici fonksiyonları olduğunu düşündürmektedir. Yapılan in vitro çalışmalarda kolorektal kanser hücreleri tarafından üretilen CEA miktarının, tümörün aktif *killer* hücrelere olan direnciyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Karsinoembriyonik antijenin, aktif *killer* hücre infiltrasyonunu ve aktif *killer* hücrelerinin kolorektal kanser hücrelerine yapışmasını inhibe ettiği saptanmıştır<sup>36</sup>. Normal kolon dokusu ve kolon tümörleri yaklaşık olarak eşit miktarlarda CEA mRNA 'sına sahiptir. Antijen miktarları ise belirgin olarak farklıdır. Bu da dokularda CEA ekspresyonunun düzenlenmesinde posttranskripsiyonel kontrolün etkili olduğunu göstermektedir<sup>37</sup>.

#### **2.1.5.2. Dokuda ve Plazmada Karsinoembriyonik Antijen**

Karsinoembriyonik antijen; kolon, rektum, mide, akciğer ve memeyi içeren adenokarsinomlar tarafından yüksek miktarda üretilmektedir<sup>28</sup>. Primer kolorektal karsinomların % 90'ından fazlasında CEA üretimi saptanmaktadır<sup>38</sup>. Karsinoembriyonik antijen yüksekliği, cerrahi olarak çıkarılabilecek tümörü diğer tüm testlerden önce saptar . Kolorektal kanserde ameliyat öncesi ve sonrası CEA ölçümü önerilmektedir<sup>39</sup>.

Karsinoembriyonik antijen, normal kolon yüzey mukozasında ve karsinom çevresindeki mukozada benzer miktarlarda bulunmaktadır<sup>40</sup>. İyi diferansiye kanser hücrelerinde CEA daha çok hücre membranının apikal yüzeyinde eksprese olurken kötü diferansiye kanser hücrelerinde tüm hücre yüzeyine ve sitoplazmaya dağılmaktadır<sup>41</sup>. Hücre yüzeyinden dolaşıma geçen CEA, plazma ya da serumda ölçülebilir ancak anormal serum düzeyi kanser için spesifik değildir. Sağlıklı popülasyonda CEA'nın üst sınırı sigara içmeyenlerde 3,4 µg/L ve sigara içenlerde 6,2 µg/L'dir<sup>42</sup>. Sigara içenlerin % 19'unda ve sağlıklı popülasyonun % 3'ünde yükselmiş CEA düzeyine rastlanmaktadır<sup>43</sup>. Yaş, cinsiyet ve ırk serum değerlerini etkilememekte ancak karaciğerde metabolize olduğu için karaciğer yetmezliği olan hastalarda klirensi azalmaktadır<sup>44</sup>.

Karsinoembriyonik antijen düzeylerinin kanser dışında; karaciğer hastalıkları (kolelitiazis, alkolik siroz, kronik aktif hepatit, karaciğer absesi, tıkanma sarılığı), gastrointestinal hastalıklar (gastrit, peptik ülser, pankreatit, divertikülit, inflamatuvar barsak hastalığı, kalın barsak obstrüksiyonu), böbrek yetmezliği, fibrokistik meme hastalığı ve diğer kronik hastalıklarda 10 µg/L'ye kadar arttığı saptanmıştır<sup>28</sup>. Kolorektal kanserlerin % 85-90'ı CEA üretmesine rağmen, tanı anında genellikle serum düzeyi yüksek bulunmamaktadır çünkü CEA önce portal dolaşıma girerek karaciğerde metabolize olmaktadır<sup>44</sup>. Karaciğere uğramadan direk olarak sistemik dolaşıma geçtiği rektal kanserlerde CEA düzeyi daha yüksek olma eğilimindedir<sup>30</sup>. Primer kolorektal karsinomun tanı anında CEA yüksekliğine rastlanma oranının düşük olması, CEA 'yı tarama için duyarsız bir belirteç haline getirmiştir<sup>28</sup>.

#### **2.1.5.3. Kolorektal Kanserde Operasyon Öncesi Prognostik Belirteç Olarak Karsinoembriyonik Antijenin Önemi**

Karsinoembriyonik antijen tarama için duyarsız bir belirteç olmasına rağmen, operasyon öncesi düzeyi hayatta kalımı değerlendirmek açısından önemli bir prognostik faktördür<sup>30</sup>. Kolon kanserli hastada serum CEA konsantrasyonunu etkileyen faktörler; tümörün evresi, derecesi, kolondaki orijini<sup>31</sup>. Karaciğerdeki tümörün ameliyatla çıkartılmasından önce ölçülen serum CEA düzeyi, hayatta kalım ile ters orantılıdır<sup>45</sup>. Yapılan çok değişkenli analizler sonucunda, operasyon öncesi yüksek CEA düzeyi nüks açısından 3,74 relatif riskle ilişkilendirilmiştir<sup>30</sup>.

#### **2.1.5.4. Kolorektal Kanserde Operasyon Sonrası İzlemede Karsinoembriyonik Antijenin Önemi**

Kolorektal kanser evresi ile cerrahi öncesi CEA düzeyi arasında korelasyon vardır<sup>45</sup>. Serum CEA düzeyi, karaciğer metastazının sayısı ve hacmi ile ilişkilidir<sup>47</sup>. Tümörün cerrahi olarak çıkarılmasından sonra CEA yavaş yavaş düşer ve 4-6 haftada normal düzeyine döner<sup>28</sup>. Operasyondan sonra CEA'nın yükselmesi, tümörün nüks ettiğini ya da metastaz varlığını gösterir. Tekrar eden tümörlerin yaklaşık % 75'inde CEA artışı gözlenir<sup>48</sup>.

Düzenli klinik takip, karaciğer fonksiyon testleri, diğer serum belirteçleri , bilgisayarlı tomografi gibi testlerle kıyaslandığında , CEA hastalık nüksünü saptamak açısından daha etkindir<sup>49,50</sup>. Metastatik kolorektal kanser hastalarının yaklaşık % 85'inde CEA düzeyi yüksektir<sup>51</sup>. Serum

CEA düzeyi, kanser-ilişkili semptomların başlamasından ortalama 4.5-8 ay önce yükselir<sup>52</sup>. Karsinoembriyonik antijen en çok hepatik veya retroperitoneal metastazlar için duyarlıdır, en az duyarlılığa ise lokal, peritoneal ve pulmoner metastazlar için sahiptir. Karsinoembriyonik antijen, nüks eden hastalığın saptanmasında en etkin maliyetli testtir<sup>53</sup>. + 5 ng/mL 'nin üzerindeki CEA düzeyi karaciğer metastazı için %78–82, diğer metastazlar içinse %40–46 duyarlılığa sahiptir. Tek bir CEA sonucunun 5 ng/mL 'nin üzerinde olmasının yanlış pozitif olma olasılığı %10'dan azdır<sup>54,55</sup>. Uzak metastazda (özellikle karaciğer metastazı) CEA artışı daha hızlı olmaktadır<sup>56</sup>. Tümör nüksü (yeri nerede olursa olsun) ayda ortalama % 5 CEA artışı ile beraber seyredir<sup>57,58</sup>.

American Society of Clinical Oncology (ASCO)'nun hayatta kalım süresi, yaşam kalitesi ve maliyeti göz önüne alarak hazırladığı panele göre , sadece hastalığın tekrarı durumunda karaciğer rezeksiyonuna aday olan evre 2 ve 3 kolorektal kanser hastaları için ameliyat sonrası CEA izlemi, her 2-3 ayda bir en az iki yıl devam etmelidir<sup>59</sup>. Karsinoembriyonik antijen yüksekliği - eğer yeniden yapılan testle sonuç doğrulanırsa- metastatik hastalık için ileri araştırma yapılması gerektiğini gösterir ancak tek başına sistemik tedavi başlama endikasyonu değildir<sup>59</sup>.

#### **2.1.5.5. İleri Evre Kolorektal Kanser Takibinde Karsinoembriyonik Antijen**

Hepatik rezeksiyondan önce ve sonraki serum CEA ölçümleri, sonuç için güçlü kestirimci özellik gösterir. Preoperatif değerlerin yüksekliği hayatta kalım kısalığı ile doğru orantılı olduğu için ameliyat öncesi ve sonrası CEA ölçümü önerilmektedir<sup>45</sup>.

Metastatik kolon karsinom hastalarının yaklaşık % 85'inde CEA düzeyi yüksektir<sup>51</sup>. Kemoterapi tedavisi alan hastalarda, ardışık CEA ölçümleri tedaviye cevap verenleri diğer yöntemlerden önce saptayabilmektedir. Kemoterapi tedavisi ile CEA'nın düşmesi, hayatta kalım artışıyla, klinik ve radyolojik cevapla pozitif korelasyon gösterir<sup>30,52</sup>. Kemoterapi tedavisindeki serum CEA düzeyleri düşük hastalar (görüntüleme yöntemleri ile hiçbir cevap alınamasa dahi) CEA düzeyleri stabil seyreden veya yükselen hastalarla kıyaslandığında daha yüksek hayatta kalıma sahiptir.

Sonuç olarak; metastatik kolon kanserinde CEA, tedavinin ve hastalığın klinik gidişinin izlenmesinde faydalı bir serum tümör belirteçidir<sup>52,60</sup> ancak 5-FU ve Levamisole ile tedaviden sonra CEA'da yanlış pozitif değerlere rastlanabilmektedir<sup>30</sup>.

### **2.1.6. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Onkoloji Kliniğinde Kemoterapiye Yanıtın İzlenmesi**

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde kolorektal kanserin tedavisinde Folfox KT protokolü, 15 günde bir olmak üzere üç ay boyunca altı kür olarak uygulanmaktadır (Avrupa protokolü). Kolorektal kanserli hastaların KT tedavisi sırasında izlemi, operasyon öncesi ve sonrası üç ayda bir serum CEA değerleri ile yapılmakta ve üç ayın sonunda tümör radyolojik olarak değerlendirilmektedir. Bu aşamadan sonra KT'nin yararlılığı için karar verilmekte ve gerek görülürse KT protokolünde değişikliğe gidilmektedir. Tümörün radyolojik olarak değerlendirildiği üçüncü ayın sonuna kadar beklenilmesini gerektirmeyecek bir belirtece ihtiyaç duyulmaktadır. Tedavinin yararlılığını erken dönemde belirleme üstünlüğü olan bir belirteç ile tedavi protokolünde daha erken dönemde değişikliğe gidilmesi mümkün olabilecektir. Kemoterapi tedavisindeki hastalarda kullanılan ilacın etkisini takip etmek için kullanılacak bir yöntem basit olmalıdır. Kanserde tedaviye cevabı izlemek için tümör hücre ölümünü kandaki belirteçlere bakarak takip etmek bu kriteri karşılamaktadır ancak aynı tedavi protokolü bazı tümörlerde nekroza neden olurken bazılarında apoptozla sonuçlanabilir. Tedaviye cevap takip edilirken her iki tip hücre ölümü de ölçülmelidir. Bu ihtiyacı karşılayacak bir belirtece ihtiyaç bulunmaktadır<sup>61</sup>. Kemoterapi tedavisi alan hastalarda ardışık CEA ölçümleri, tedaviye cevap veren hastaları diğer yöntemlerden önce saptayabilir<sup>62</sup> ancak serum CEA düzeyi ile apoptoz/nekroz oranını saptamak mümkün değildir. Ayrıca bazı hastalarda 5-fluorouracil ve levamisole ile tedaviden sonra CEA'da yanlış pozitif yüksekliğe rastlandığı belirtilmektedir<sup>63</sup>.

### **2.2. HÜCRE ÖLÜMÜ**

Hücre, fizyolojik strese maruz kaldığında genellikle yapısını korur. Hücrenin adaptif gücü aşıldığında ise hücre zedelenmesi oluşur. Hücre zedelenmesi bir noktaya kadar geri dönüşlüdür, fakat kalıcı stres durumunda geri dönüşümsüz hale gelir ve ölümle sonuçlanır<sup>64</sup>. Hücre ölümü, vücutta homeostazı sağlamak için hücre bölünmesi kadar önemlidir<sup>65</sup>. Hücre ölümü embriyonik ve yetişkin hayatı boyunca meydana gelen aşırı hücre oluşumunu dengeler<sup>66</sup>.

Yakın zamana kadar başlıca hücre ölüm yolağının apoptoz olduğu düşünülmekteydi. Ancak, son yıllarda yapılan araştırmalar göstermiştir ki kemoterapötikler ve diğer faktörler, hücrenin



apoptoz dışındaki ölüm mekanizmalarına da yönelmesine sebep olabilmektedir. Bu mekanizmalar otofaji, mitotik katastrof, otofagositoz ve nekrozdur<sup>67</sup>.

### ***Otofaji***

Otofaji, hücrel homeostazın sağlanması için gerekli lizozomal katabolik bir süreçtir. Otofaji antikanser tedaviye yanıt olarak gerçekleşebilmektedir. Bu yanıt, hücrenin yaşamasını sağlayabileceği gibi ölümüne de neden olabilir<sup>68</sup>. Otofaji sürecinde fazla, yaşlı ve gereksiz sitoplazmik makromoleküller, endoplazmik retikulum benzeri izolasyon zarlarının içinde birikerek otofagozomları oluşturur<sup>69</sup>. Otofagozomlar taşıyıcı veziküllerle birleşerek lizozomal enzimleri alır ve hücrel bileşenlerin yıkımı başlar<sup>70</sup>.

### ***Otofagositoz***

Otofagositozda makromoleküller hücre içine endozomlar aracılığıyla alınır. Lizozom endozom zarıyla birleşerek makromolekülün yıkımına başlar. Otofagositoz sürecinde yaşlı veya hasar görmüş organel endozomla kaplanıp lizozomla birleşir ve yıkılır<sup>71</sup>.

### ***Mitotik katastrof***

Anormal mitoz sonucu gelişen bir çeşit hücre ölümüdür. Birçok değişik çeşit sitotoksik ajan mitotik katastrofa neden olur ve anormal mitozun takip ettiği yolak etkene, hücrenin siklusun hangi evresinde bulunduğuna bağlı olarak değişir. Mitotik katastrof, tümör hücrelerinin büyümesinin uzun süreli duraklamasının ardından hücre siklusuna anormal bir şekilde yeniden girmesi nedeniyle de oluşabilmektedir<sup>72</sup>.

### ***Nekroz***

Klasik hücre ölümü nekroz olarak adlandırılmaktadır. Nekroz, sitoplazmik şişme, enerji kaybı, hücre-içi komponentlerin entegrasyonunun ve plasma membranının bütünlüğünün bozulması ile karakterizedir. Şiddetli bir travma veya zararlı bir uyarı ile meydana gelebilir ve genellikle hücreleri gruplar halinde etkiler. Morfolojik olarak, endoplazmik retikulum ve mitokondride şişme, plazma membran iyon transportunun bozulması, hücrelerin şişmesi ve parçalanması tipiktir.

Hücrelerin parçalanması ile hücre içeriği ve lizozomal enzimler hücre dışı ortama dökülür. Hücre dışına çıkan enzimlerin komşu hücre ve dokuları zedelemesiyle inflamatuvar yanıt oluşmaktadır<sup>73</sup>.

### ***Programlı Hücre Ölümü (Apoptoz)***

Çok hücreli organizmalarda fetal gelişimden başlayarak ölüme kadar süregelen süreçlerde temel rol oynayan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Programlanmış hücre ölümü (Apoptoz, hücre intiharı) fizyolojik şartlarda meydana geldiği için fizyolojik hücre ölümü olarak da tanımlanır<sup>74</sup>. Apoptoz çok hücreli canlıların gelişimi esnasında görülen hücre ölüm tipidir. Ökaryotik organizmadaki hücrelerin belirli bir yaşam süresi vardır. Yaşam süresi hücre tipine ve fonksiyonuna göre değişmektedir. Barsak hücrelerinin yaşam süresi üç-beş gün iken, epidermis hücrelerinin yaşam süresi 20-25 gündür<sup>75</sup>.

Apoptoz, birçok özelliği ile nekrozdan farklılık gösteren bir hücre ölüm tipidir<sup>75</sup>. Apoptoz, nükleer piknoz, kromatin kondansasyonu, plazma membranının ve hücre organellerinin bütünlüğünün korunması ile karakterizedir. Apoptotik hücre ölümü, aktif enerji tüketimi gerektirir ve bu tip hücre ölümünde nükleus içinde deoksiribonükleik asid (DNA)'nın parçalara ayrılması, spesifik sistein proteazların (kaspazlar) aktivasyonu gerçekleşir. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde hücre zarının iç yüzünde bulunan fosfolipidlerin'in erken evrede zarın dış yüzüne doğru yer değiştirmesidir. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar. Kromatin kondansasyonunu takiben nükleus küçük parçacıklara ayrılır. Hücre büzülerek küçülür ve çevresi zarla sarılmış, apoptotik cisimlere ayrılır. Bu apoptotik cisimler, makrofajlar ve komşu hücreler tarafından tanınmaya ve fagosite edilmeye hazırdır. Böylelikle apoptoz yolu ile ölen hücreler dokulardan temizlenir ve inflamasyon oluşmaz<sup>73,74</sup>.

Normal apoptotik hücre ölümü ve yerine doku yeniden yapılanmasında günde yaklaşık  $1 \times 10^{11}$  hücrenin yer aldığı bilinmektedir<sup>76</sup>. Yapım ile yıkım arasındaki kontrollü dengenin apoptoz lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogeneze katkıda bulunur. Apoptozun gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak kazanılmış immün defekt hastalığı (AIDS), nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklar verilebilirken; apoptozun yavaşladığı hastalıklara örnek

olarak ise otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilir<sup>75</sup>. Apoptoz ve nekrozu tetikleyen etkenler ve farklılıkları tablo 2’de özetlenmiştir.

<b>ÖZELLİK</b>	<b>APOPTOZ</b>	<b>NEKROZ</b>
<b>Etioloji</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hücre yaşlanması</li> <li>-Büyüme faktörü eksikliği</li> <li>-Kanser ilaçları</li> <li>-Radyasyon</li> <li>-HIV</li> <li>-Oksidatif stres</li> <li>-Yüksek doz glukokortikoid</li> <li>-Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-İskemi</li> <li>-Şiddetli Oksidatif stres</li> <li>-Hipertermi</li> <li>-Hipoksi</li> <li>-Litik viral enfeksiyon</li> <li>-Toksik maddeler</li> </ul>
<b>Biyokimyasal Özellikler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Kontrollüdür.</li> <li>-ATP gereklidir</li> <li>- +4 °C’de gerçekleşmez.</li> <li>-DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır, mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven paterni: apoptozisin en önemli belirteci)</li> <li>-Prelitik DNA fragmantasyonu (erken evrede gerçekleşir)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-KontROLSÜZDÜR.</li> <li>-ATP gerekmez</li> <li>- +4 °C’de gerçekleşebilir.</li> <li>-DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde ‘smear’ görüntüsü)</li> <li>-Postlitik DNA fragmantasyonu (ölümün geç safhasında)</li> </ul>

<b>ÖZELLİK</b>	<b>APOPTOZ</b>	<b>NEKROZ</b>
<b>Morfoloji</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hücre zarı bütünlüğünü korur ancak zarında kabarcıklar oluşur.</li> <li>-Kromatin nükleer zar civarında toplanır ve yoğunlaşır.</li> <li>-Hücre küçülür.</li> <li>-Organellerde parçalanma yoktur.</li> <li>-Hücre zarla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanır.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hücre zarının bütünlüğü bozulur.</li> <li>-Kromatin kümelenir.</li> <li>-Hücre şişer.</li> <li>-Organeller parçalanır.</li> <li>-Endoplazmik retikulum genişler.</li> <li>-Büyük vaküoller oluşur.</li> <li>-Hücre lizisi meydana gelir.</li> </ul>
<b>Diğer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hücreler tek tek/birkaçı bir arada ölür.</li> <li>-Fizyolojik şartlarda da gerçekleşir.</li> <li>-Hücreler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilir.</li> <li>-İnflamasyon görülmez.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hücreler gruplar halinde ölür.</li> <li>-Patolojik etkiler sonucu oluşur.</li> <li>-Lizozomal enzimler salınır.</li> <li>-İnflamasyona neden olur.</li> </ul>

**Tablo 2.** Apoptoz ile nekrozun farkları

### **2.3. ARA FİLAMENLER VE SİTOKERATİN 18 (K18)**

#### **2.3.1. Sitokeratin 18 Genel Bilgi**

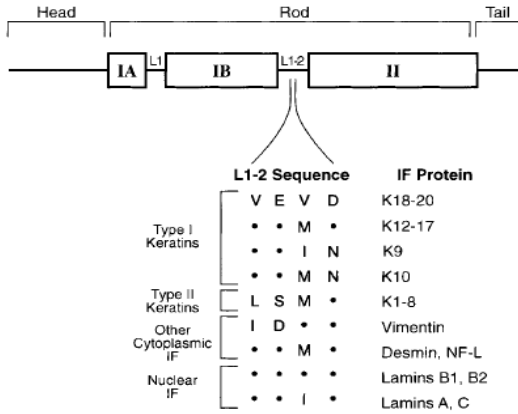
Hücre iskeleti 3 farklı tip filament sistemi içerir:

1. Ara filament (Tip I-V)
2. Aktin içeren filament (MF)
3. Mikrotübüller (MT)<sup>77</sup>.

Ara filament proteinler; nükleer laminleri ve dokuya spesifik sitoplazmik proteinleri kapsar. Epitel hücrelerinde keratinler, kasta desmin, nöronal hücrelerde nörofilamentler, mezenkimal hücrelerde vimentin ; dokuya spesifik sitoplazmik proteinlerdir<sup>78</sup>. Ara filamentler genomik yapıları ve aminoasit dizilim homolojisine göre beş tipe ayrılır<sup>79</sup>: Tip I-IV ara filament proteinler sitoplazmiktir ve dokuya spesiftir, tip V ara filament proteinler ise nükleer laminlerden oluşur.

Tip I ve II keratinler (K) (“yumuşak” keratinler veya sitokeratinler de denir) epitel hücrelerinde bulunur ve hücre tipine spesifik en az 20 üyesi vardır (CK1–CK20), nonkovalent bağlı tip I ve II heteropolimerler oluşturur<sup>79</sup>. Tip I ve II sitokeratinler birbirinden izoelektrik noktaları ve antijenik özelliklerine göre ayrılır. Tip I keratinler relatif olarak asidik (K9-20), Tip II keratinler ise relatif olarak baziktir (K1-K8) . Keratinler, ara filament proteinlerin en büyük alt grubunu oluşturur, hem normal hem de transforme epitel hücrelerinde bulunur ve çoğu kanser çeşidinde eksprese olur<sup>80</sup>.

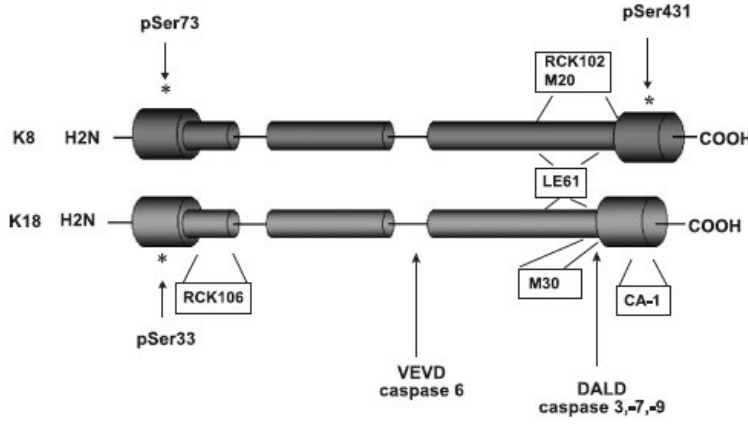
Ara filament proteinler; santral bir  $\alpha$ -helikal gövde (rod domain) ve helikal olmayan NH<sub>2</sub>-uç (baş) ve COOH uç (kuyruk)’tan oluşur. Baş ve kuyruk, fosforilasyon ve glikozilasyonu da içeren birçok posttranslasyonel modifikasyon bölgesi içerir (Şekil 1,2)<sup>77</sup>. Ara filament , bağlayıcı bölgelerle (L1–2 gibi) birbirine bağlı birçok parçadan (IA, IB, II gibi) oluşur (Şekil 1). Parçaların her biri yedi farklı aminoasit tekrardan oluşur. Birinci ve dördüncü aminoasitler nonpolardır ve ara filamentlerin hidrofobik olmasından sorumludur. Ara filamentin halka şeklinde kıvrılmasını sağlayan hidrofobik yapısıdır<sup>79</sup>.



**Şekil 1.** Ara filament proteinlerin genel yapısı içinde L1–2 bölgesindeki kaspaz kesim sekansları. Gövde, bağlayıcı bölgelerle (L) birbirine bağlanmış parçalardan oluşur. Noktalar CK18, CK19 ve CK20’nin VEVD sekansına eş olan amino asidleri göstermektedir<sup>79</sup>.

Tüm ara filament proteinlerin temel birimi bir tetramerdir<sup>79</sup>. Bir dimer (tip I ve tip II keratinlerin bir heterodimeri), iki polipeptidin paralel yerleşimiyle oluşur ve  $\alpha$ -helikal gövdeler arasında maksimum halkalaşma sağlar. İki dimerin anti-paralel ilişkisi ile de stabil tetramerler oluşur. Tetramerlerin *subfilamentous* parçaları uç-uca bağlanır ve laterale doğru dizilerek olgun

filamentleri oluşturur<sup>79,81</sup>. *Ara* filament proteinlerinin in vitro ortamda bir araya gelme özelliklerinin pH'ye ve sıcaklığa bağlı olarak belirgin farklılıklarının olması, bu proteinlerin birbirlerinden farklı fizyolojik özelliklere sahip olduğunu gösterir<sup>81</sup>.



**Şekil 2.** Sitokeratin 8/18 dimerinin şematik görünümü. Baş, kuyruk ve gövde silindirlere, bağlayıcı bölgeler ise düz çizgilerle gösterilmiştir. Fosforilasyon ve kaspaz kesim bölgeleri şekil üzerinde gösterilmiştir<sup>82</sup>.

Keratinler çözünür değildir ve bu özellikleri saflaştırılmalarında kullanılır. Kolon hücre kültüründe çözünür CK8/18, total keratin havuzunun %5'ini oluşturmaktadır. Çözünürlük mitoz sırasında ve birçok farklı hücre stresinde artmaktadır<sup>81</sup>.

10 nm'lik sitokeratinler, mekanik strese karşı hücre bütünlüğünü dezmozom hücre-hücre kontakları ile stabil ağ oluşturarak korur<sup>83</sup>. *Ara* filamentin ağ oluşturması  $\alpha$ -helikal gövdenin santral rol oynadığı birçok basamaktan oluşur<sup>83</sup>. Baş ve kuyruk bölgelerinin filamentöz yapının esas parçası olmadığı düşünülmektedir ancak laterale doğru uzanarak ara filament paketine katılır. Ara filament, baş ve kuyruk bölgeleri aracılığıyla hücrenin diğer elemanlarıyla ilişki içindedir<sup>83</sup>. Başsız CK8 ve CK18' in kotransfeksiyonu, fibriler olmayan, dağınık bir yapı ile sonuçlanır<sup>83</sup>.

Keratinler dinamiktir ve birçok uyarana karşısında yeniden organize olur<sup>79</sup>. Filamentlerin yeniden organizasyonundaki mekanizmalar: Proteinlerle etkileşim<sup>84</sup> ve fosforilasyon, proteoliz, glikozilasyon, transglutaminasyon gibi posttranslasyonel değişikliklerdir<sup>85</sup>. Bunlardan üzerinde en çok araştırma yapılmış olan fosforilasyondur. Fosforilasyon baş ve/veya kuyruk bölgelerinde meydana gelir<sup>79</sup>. Keratin fosforilasyonu dinamiktir, mitoz ve hücre stresini de kapsayan birçok

fizyolojik olay sırasında yeniden düzenlenir<sup>86</sup>. CK8/18 'in N-uç (baş) bölgesi birçok fosforilasyon bölgesi içermektedir.

CK8/18 için bilinen in vivo fosforilasyon bölgeleri:

1) CK18: Ser-52/Ser-33 . Bu bölgeler filamentin yeniden organizasyonu ve dağılımıyla ilişkilidir. Ayrıca CK18'in 14-3-3 proteinlerine bağlanması için de önemlidir.

2) CK8: Ser-23/Ser-431/Ser-73 (şekil 2)<sup>87</sup>.

Apoptoz sırasında CK8/18 ara filamentler yeniden organize olarak, serine 52'den fosforile olmuş CK18' den zengin yapılar oluştururlar. Keratin hiperfosforilasyonunun, apoptozun erken döneminde mi yoksa geç döneminde mi meydana geldiği kesinlik kazanmamıştır<sup>82</sup>. Bazı araştırmacılar keratin hiperfosforilasyonunun basit epitel için erken bir fizyolojik stres belirteci olduğunu ileri sürmektedir<sup>88</sup>. Alternatif olarak, keratinlerin apoptozun son fazında fosforile olarak hücre iskeletinin hızlı çöküşüne yardımcı olduğunu savunan çalışmalar da bulunmaktadır<sup>82</sup>.

Tümör hücrelerinde Ras sinyal transdüksiyon yolağını aktive eden onkogenler, K18 gen ekspresyonunu transkripsiyon faktörleri aracılığıyla aktive etmektedir<sup>89</sup>. Sitokeratin 8 ve 18 ekspresyonu ile artmış metastatik özellikler arasında ilişki olduğu gözlenmektedir<sup>90</sup>. Kanser hücre yüzeylerinde reseptör veya reseptör kofaktörü olarak davranan modifiye olmuş CK8 ve CK18 proteinlerine rastlanmaktadır<sup>91</sup>. Örneğin, meme kanseri hücrelerinin yüzeyindeki modifiye CK8'in plasminojene ve doku plasminojen aktivatörüne bağlandığı gösterilmiştir<sup>91</sup>. Hepatositlerin yüzeyindeki CK18 , trombin-antitrombin kompleksi için reseptör görevi görür<sup>92</sup>.

### **2.3.2. Keratinlerin Sindirim Epitelindeki Fonksiyonları**

Epitel hücreleri, epitel hücrelerinin çeşidine bağlı olarak tip I ve II keratinlerinin değişik kombinasyonlarını eksprese eder. Dominant bir keratin çiftini majör ara filamentleri olarak eksprese ederken birçok diğer tip I ve/veya tip II keratini farklı düzeylerde eksprese ederler (Tablo 3). Keratinlerin sindirim epitelindeki fonksiyonları tablo 4'de gösterilmiştir<sup>79</sup>.

<b>SİNDİRİM EPİTELİNDEKİ DAĞILIM</b>	
Hepatositler	CK8/18
Safra yolu	CK8/19 + (CK7/18)*
Duktal pankreas	CK8/19 + (CK7/18)*
Asinar pankreas	CK8/18 + CK19
İnce barsak	CK8/20 + CK19+ CK18
Kolon	CK8/18 + CK19 +CK20
Ösefagus	CK4/13 + (CK6)*
Mide	CK8/18 + CK19 +CK20 (CK7)*
Safra kesesi	CK8/18 + (CK7/19)*
<b>DİĞER EPİTELLERDEKİ DAĞILIM</b>	
Bazal keratinositler	CK5/14
Suprabazal keratinositler	CK1/10
Hiperproliferatif keratinositler	CK6/16/17
Kornea epiteli	CK3/12

**Tablo 3.** Sitokeratinler ve dokulardaki dağılımı<sup>79</sup>

\*Belirtilen dokudaki minör keratinler



<b>Özellik ve Fonksiyonlar</b>
Hepatosit bütünlüğünün korunması
Karaciğerin çevresel stresten korunması (keratin fosforilasyonu aracılığıyla)
Sitoplazmik protein kullanılabilirliğinin düzenlenmesi (14-3-3 proteinleri ve hsp 70)
Hücre sinyal iletimi (14-3-3, fosforilasyonun mitojenlerle regülasyonu)
Hücre tipi spesifik
Kompartman spesifik
İlaç direnci
Tümör invazyonu ve metastaz
“Hücre yüzey” reseptörleri
<b>İnsanda Hastalıklarla İlişkisi</b>
Kriptojenik karaciğer hastalığı olan bir hastada mutasyon saptanmıştır
Mallory cisimcikleri
Kanserin histolojik tanısında doku-spesifik belirteç olarak çok kullanışlı
Serum keratin fragmanları (tanısal önemi var)
Antikeratin antikorlar

**Tablo 4.** Keratinlerin sindirim epitelindeki fonksiyonları, bazı özellikleri ve hastalıklarla ilişkisi<sup>79</sup>.

### 2.3.3. Sitokeratinlerin Epitel Kaynaklı Olmasının Önemi

Sitokeratinler dinamiklerdir. Diferansiyasyon, mitoz ve apoptoz gibi birçok hücreyel olay esnasında yeniden organize olurlar. Keratinlerin tüm fonksiyonları bilinmemesine rağmen, hücre stres altındayken epitel hücresinin bütünlüğünü korudukları gösterilmiştir<sup>93</sup>. Tüm epitel hücreleri en az bir tip I ve bir tip II keratini nonkovalent bağlı heteropolimerler şeklinde epitel hücreesine has bir biçimde ekspres eder (Tablo 3). Örneğin, basit tip epitel (barsak, karaciğer gibi) daha çok CK8/18 ekspres ederken bir miktar da CK19 ve CK20 ekspres etmektedir<sup>94</sup>. Keratinositler epidermis katları içindeki diferansiyasyon durumuna göre CK1/10 ve/veya CK5/14 ekspres eder. Korneal epitelial hücreler CK3/12 ekspres eder<sup>95</sup>. Basit glandular epitel hücrelerinin ara filament

ağı, daha çok CK8/18 heterodimerlerinden oluşmaktadır. Diğer sitokeratinlerden farklı olarak, CK8 ve CK18 malign değişim sırasında sürekli olarak eksprese olur ve filament ağındaki değişiklikler, hücre morfolojisindeki değişikliklere eşlik eder<sup>83</sup>. Kanser hastalarının serumlarında CK8/CK18'in artmış düzeyleri saptanmıştır<sup>83</sup>.

Sitokeratin 18'in epitelial kaynaklı olması, serum düzeyinin epitelial olmayan organlardan (KT'den en çok etkilenen organ olan kemik iliği gibi) etkilenme olasılığını ortadan kaldırmaktadır. Bu da CK18'in kanser tedavisinde hücrelerin yanıtını izlemedeki önemini ve avantajını göstermektedir<sup>94</sup>.

#### 2.3.4. Apoptoz - Nekroz Ayırımında Sitokeratin 18'in Önemi

Kolon kanseri için potansiyel apoptoz belirteçleri; kesilmiş CK18, kesilmiş kaspaz-3 (c-cas-3), kesilmiş lamin A (c-lam-A), fosforile histon H2AX ( $\gamma$ H2AX), kesilmiş poly ADP ribose polymerase (c-PARP), ve apoptoz indükleyici faktör (AIF)'dür.  $\gamma$ H2AX, c-cas-3, c-lam-A ve c-PARP apoptotik hücelere spesifik olduğu halde c-CK18 antikoru hepsinden daha kullanışlıdır. AIF antikorunun ise spesifik olmadığı saptanmıştır<sup>96</sup>. Sitokeratin 18 antikorunun apoptotik kolon epitel hücrelerini saptamada neredeyse morfoloji kadar spesifik ve kullanışlı olduğu düşünülmektedir<sup>96</sup>.

Apoptoz sırasında aktive olan kaspaz kaskadı, birçok kritik hücrel proteinin proteolizinden sorumludur<sup>97</sup>. Sitoplazmik ve nükleer iskeletin birçok parçası (ara filament proteinler ve plectin, gelsolin, Gas2 ve h-catenin gibi hücre iskeleti ile alakalı proteinler) bu proteoliz için hedefir<sup>98</sup>. Apoptoz sırasında kaspazların kestiği birçok hücrel proteinden biri, CK18'dir. Apoptoz, tip I keratin CK18'in selektif kaspaz aracılı proteolizi ile sonuçlanır<sup>87</sup>. Bu pozisyondan kesilme, apoptozun erken döneminde kaspaz 3, 7 ve 9 tarafından gerçekleştirilir<sup>82</sup>. Bu sırada tip II keratin olan CK8 ise proteolize uğramaz<sup>99</sup>.

Prokaspaz 3 ve 9'un, CK8/18 ara filament ağında "DNA binding protein (DEDD)" içeren "death effector" bölgesine yöneldiği gösterilmiştir<sup>101</sup>. Prokaspaz 3 ve 9'un yaptığı bu proteolizin engellenmesi, sitoplazmik ve nükleer hücre iskeletinin yeniden organizasyonunda ve kromatin kondensasyonu gibi eşlik eden olaylarda bozulma ile sonuçlanır<sup>101</sup>. Birçok ara filament proteini, santral  $\alpha$ -helikal gövdenin L1-2 bağlayıcı parçasında kaspazlar için bir bölge içerir<sup>97</sup>. Örneğin, nükleer laminler ve tip I keratinler bir VEVD/A veya VEID/A bölgesi içermektedir. Bir diğer

kaspaz kesim bölgesi ise, CK18'in COOH terminal (kuyruk) bölgesindeki **393 DALD/S'**dir<sup>24</sup>. Bu bölgeden kesim, apoptozun erken döneminde yani membran asimetrisinin kaybindan , DNA fragmantasyonundan ve kaspaz 3 aktivasyonundan önce gerçekleşir<sup>102</sup> ve kesim sonucu oluşan CK18Asp396 neo-epitopu , spesifik olarak M30 monoklonal antikoru tarafından tanınır<sup>102</sup>. Tip I keratinlerin proteolitik fragmanları stabildir<sup>87</sup> ve apoptotik cisimcikler içerisinde büyük agregatlar şeklinde yer alır<sup>99</sup>. Bu keratin agregatlarının hücrelerden atıldığı ve fagositlerin klirensinden kaçtığı tahmin edilmektedir çünkü keratinler kanser hastalarının serumunda ölçülebilir düzeyde bulunmaktadır<sup>103</sup>. Santral  $\alpha$ -helikal gövdenin L1-2 bağlayıcı bölgesinin kesilmesi, keratin çökmesinden ve büyük agregatlara dönüşmesinden sorumludur<sup>104</sup>. Fosforilasyon bu agregatların oluşumunu hızlandırır. CK18 ve CK8 apoptoz sırasında agregatlar içerisinde birbirleri ile ilişki içindedir. Apoptozun daha geç dönemlerinde keratin agregatlarının hücre kültür ortamına döküldüğü gözlenmiştir<sup>104</sup>. Tip II keratinler ise kaspazlar tarafından proteolize dirençlidir ve apoptoz sırasında partner oldukları keratin fragmanları ile bir arada bulunmaktadır<sup>87</sup>.

Sonuç olarak; sitokeratinler epiteliyal hücrelerde yüksek düzeylerde bulunmakta ve serumda ölçülebilmektedir. Onkojenik transformasyondan sonra bu ekspresyon devam etmekte hatta artmaktadır<sup>105</sup>.

Apoptozun çözünür sitokeratin fragmanlarının tümör hücrelerinden salınımına neden olduğunun gösterilmesi, sitokeratin tümör belirteçleri olan doku polipeptid antijeni (TPA), *tissue-polypeptide-specific antigen* ve CYFRA 21-1' in tümör apoptozunu yansıttığı düşüncesini desteklemektedir<sup>106,107</sup>.

Keratin fragmanlarının epitel tümörü olan hastaların serumlarında saptanabilmesi, keratinlerin tanısal potansiyeli olduğunu düşündürmektedir<sup>108</sup>. Hücre transformasyonu ve tümör oluşumu sırasında, CK8 ve CK18'in hücre tipi spesifikliğini koruması, bu filamentleri kullanışlı histopatolojik belirteçler haline getirmektedir<sup>95</sup>.

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### 3. ARAC-GEREC ve YÖNTEMLER

#### 3.1. ARAC ve GEREÇLER

Çalışmada kullanılan cihaz ve kitler tablo5’de listelenmiştir.

Cihaz/Kit Adı	Marka/Yöntem	Model	Üretici Firma
ELISA plak okuyucu	Biotek	System Reader EL 800	Biotek Instruments
ELISA plak yıkayıcı	Biotek	System Washer EL 50	Biotek Instruments
Vorteks	Nuvmix		
Derin dondurucu (-80 °C)	Thermo	ULT Freezer Forma -86 °C	Thermo Electron Corporation
Saf su sistemi	USF Elga		
Otoanalizör	Immulate	2500	Diagnostic Products Corporation, İngiltere
Otoanalizör	Hitachi	DP Modüler Sistem	Boehringer Mannheim Co. Almanya
Otomatik pipetler	Finnpipette	Digital	Thermo Scientific ABD
Shaker	Heidolph	Vibramax 100	
CK18 (M30)	ELISA		Peviva-10010
CK18 (M65)	ELISA		Peviva-10020

**Tablo 5.** Çalışmada kullanılan cihazlar ve kitler

## **3.2.OLGU SEÇİMİ VE MATERYAL ELDESİ**

### **3.2.1.Olgu Seçimi**

DEÜTF Hastanesi Onkoloji Polikliniğinde KT (Folfox) verilmesi kararlaştırılan kolorektal kanser hastaları gönüllülük esası içinde çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalara gönüllü bilgilendirme formu okunarak bilgi verildikten sonra onam formu imzalatılmıştır. Yaklaşık bir yıllık bir süreçte DEÜTF'ye başvuran hastalar çalışmaya dahil edilmiş, olgu seçiminde dışlama için ek bir kriter uygulanmamıştır. Çalışmaya tümörün histolojik tipi, evresi, radyoterapi öyküsü alınmış olan, gönüllü bilgilendirilme formu imzalamış 37-75 yaşları arasında 7 kadın ve 10 erkek hasta dahil edildi. Kontrol grubu herhangi bir ilaç kullanmayan ve bilinen bir hastalığı olmayan, 30-56 yaşları arasında 9 kadın ve 11 erkek bireyden oluşturuldu.

### **3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması**

Hasta grubunu oluşturan bireylerden serum sitokeratin 18 ölçümü için kan alımları KT kürleri ve kontroller sırasında DEÜTF Kemoterapi Ünitesi'nde gerçekleştirildi. Örnekler hastanın onayına bağlı olarak periferik venden veya venöz porttan düz tüpe alındı. Bazı hastalar porttan kan alımının mümkün olmadığı durumlarda venöz kan vermeyi reddettiği için kan alınamadı. Hastaların psikolojik durumu göz önüne alınarak ısrardan kaçınıldı. Bu nedenle çalışmamızda bazı CK18 verilerinde eksiklikler bulunmaktadır.

Tüpler 20 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar -80 °C'de 1-12 ay boyunca saklandı.

CEA, metabolik panel 1,2 sonuçları için ise hastalardan rutin kontrolleri esnasında onkoloji polikliniğinde istemi yapılmış olan tetkik sonuçlarından faydalanıldı.

Kontrol grubundan sadece bir defa kan alındı. Hastalardan sitokeratin 18 ölçümleri için kan alım günleri ise tablo 6'da belirtilmiştir. Sitokeratin 18'in kürler arası seyrini izlemek amacıyla birinci, üçüncü, altıncı KT kürlerinde, kür içi seyrini izlemek amacıyla da sıfıncı, ikinci, 14. günlerde kan alımı gerçekleştirildi.

	1.KT KÜRÜ			3.KT KÜRÜ			6.KT KÜRÜ		
<b>Kan alım günü</b>	0.gün	2.gün	14.gün	0.gün	2.gün	14.gün	0.gün	2.gün	14.gün

**Tablo 6.** Hastalardan kan alım günleri. Sıfıncı gün kan alımı, hastaya KT verilmesinden önce gerçekleştirilmiştir.

### **3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER**

#### **3.3.1. Sitokeratin 18 Düzeyinin Ölçümü**

Serumda CK 18 düzeyleri, M65-ELISA (Peviva, AB-Sweeden) ve M30-ELISA (Peviva, AB-Sweeden) kitleri kullanılarak ölçüldü. M30 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kiti, kaspaz-kesimli sitokeratin 18' in (CK18Asp<sup>396</sup>-NE: M30 neo-epitope) kantitatif spesifik ve sensitif ölçümü için geliştirilmiş bir yöntemdir. M65-ELISA kiti ise toplam CK18'in ölçümü için geliştirilmiş bir yöntemdir. M65 ELISA kitinin M30 ELISA Kiti ile kombine bir şekilde kullanılmasıyla apoptotik/toplam hücre ölüm oranı belirlenebilmektedir. Alınan tüm serum örnekleri, kit standartları ve kontrol örnekleri iki kez çalışılarak ortalamaları değerlendirmeye alındı.

#### **3.3.1.1. Enzim-Bağlı İmmunosorbent Ölçüm**

Enzim-bağlı immunosorbent ölçüm (ELISA), klinik analizlerde yaygın olarak kullanılan bir heterojen enzim-immün ölçüm (EIA) tekniğidir. Bu tip ölçümlerde, reaksiyon komponentlerinden biri katı faz yüzeyine bağlanmaktadır. Katı faz genellikle mikrotitrasyon kuyucuğu olmaktadır. Bağlanma nonspesifik adsorbsiyon, kimyasal veya immunokimyasal bağlanma olabilir. Enzim-bağlı immunosorbent ölçüm tekniğinde, ölçülecek antijeni içeren kalibratör veya örnek, katı faza bağlı olan antikorla bağlanması için bir süre inkübe edilir. Katı faz yıkandıktan sonra, bağlı antikordan farklı enzim işaretli bir antikor ortama eklenir ve katı faz üzerinde Antikor:Antijen:Antikor-enzim şeklinde bir sandviç kompleksi oluşur. Ortamdaki bağlı olmayan fazla antikor, yıkama ile uzaklaştırılır ve enzime spesifik bir substrat eklenir. Enzim işaretleyici eklenen substratı ürüne dönüştürür ve ürün miktarı örnekteki antijen miktarı ile doğru orantılıdır.

Enzim-bağlı immunosorbent ölçüm yöntemi ile örnekteki antikor miktarı da ölçülebilir. Burada antikor yerine antijen, katı faza bağlanmaktadır<sup>109</sup>.

### 3.3.1.2. Sitokeratin 18 Asp396-NE ( M30) Ölçüm Yöntemi

#### **M30® ELISA Kiti**

M30® ELISA kiti ile sağlanan çalışma materyalleri:

96 testlik reaktif
Her biri sekiz adet kuyucuk içeren 12 adet mikrostrip
HRP konjugat konsantresi : Bir şişe 0.4 mL horseradish peroxidase (HRP) ile konjuge fare monoklonal anti-CK18Asp396 neo-epitopu (M30) antikorunu içerir. Işığa maruz kalmamalıdır.
Konjugat seyreltme tamponu: Bir şişe 12 mL fosfat tamponu içerir.
TMB Substrat Solüsyonu: Bir şişe 22 mL 3,3',5,5'-Tetrametil-benzidin (TMB) solüsyonu içerir.
Stop Solüsyonu: Bir şişe 8 mL 1.0 M sülfürik asid içermektedir. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ciltte yanığa neden olur.
Standardlar A-F: Dilüent içerisinde standard materyali içeren altı adet 0.5 mL'lik şişe bulunmaktadır. Standardların değerleri 50, 125, 250, 500, 750 ve 1,000 U/L'dir.
Düşük ve yüksek kontrol materyali: Fosfat tamponlu FCS içerisinde ölçülecek materyali içeren iki adet 0.5 mL'lik şişe. Düşük ve yüksek kontrollerin değerleri sırasıyla; 100±20 U/L ve 650±100 U/L'dir.
Dilüent: 8 mL Fosfat tamponlu FCS içeren bir şişe.
Yıkama Solüsyonu: Bir şişe 50 mL konsantre (10X) yıkama solüsyonu içerir. Kullanımdan önce 450 mL taze distile su ile dilüe edilir. Dilüe solüsyon 0.014 M fosfat tamponu, 0.15 M sodyum klorür ve 0.1 % Tween <sup>®</sup> 20 içerir.

### ***Ölçümün Temel İlkesi***

M30-Apoptosense<sup>®</sup> ELISA testi katı-fazlı iki yönlü immunosorbent ölçüm yöntemi prensibine dayalı ölçüm yapmaktadır. Sitokeratin 18'e karşı geliştirilmiş fare monoklonal antikoru "M5", polisteren kuyucuklar içerisine sabitlenmiştir. Kuyucuklara ilave edilen örnek antikor ile reaksiyona girer. Bununla eşzamanlı olarak CK18Asp396 NE'ye karşı geliştirilmiş HRP (Horseradish Peroxidase) konjuge M30 monoklonal antikoru da reaksiyona ilave edilir. Katı faz/antijen/işaretli antikor sandviçinin oluşumunu takiben, bağlanmamış konjuge antikor, yıkama ile uzaklaştırılır. Bağlı antikor ile reaksiyona giren TMB substratı eklenir ve bağlı analit miktarı ile doğru orantılı oluşan renk şiddeti ölçülür. Reaksiyon H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilavesi ile durdurulduktan sonra renk şiddeti 450 nm'de plak okuyucuda ölçülür. Bilinen konsantrasyonlara karşı ölçülmüş absorbanslar ile oluşturulmuş standard eğri ile örnekteki antijen miktarı ölçülür. M30-antijen konsantrasyonu Unite/ Litre (U/L) olarak ifade edilir.

Ölçüm aralığı:0-1000 U/L, ölçüm içi % CV < %10, ölçümler arası % CV < %10, alt saptama sınırı: 25 U/L'dir.

### ***Ölçüm Öncesi Hazırlıklar***

HRP konjugat solüsyonunun hazırlanması: HRP konjugat konsantresi , konjugat dilüsyon tamponu ile dilüe edilir (Dilüsyon faktörü 1:24).

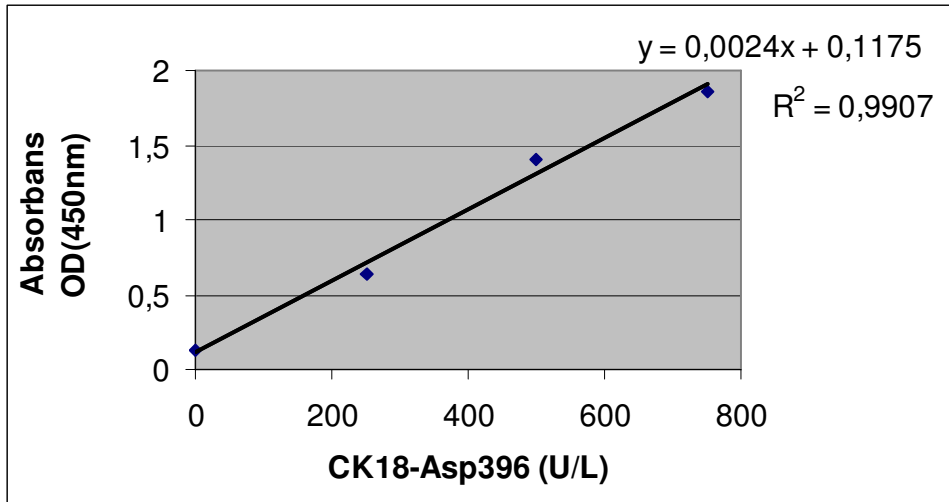
Yıkama solüsyonunun hazırlanması: 50 ml yıkama solüsyon konsantresi, 450 ml taze distile su ile dilüe edilir.

### ***Ölçüm yöntemi***

- M30-Apoptosense<sup>®</sup> ELISA ölçümü oda sıcaklığında (20±4°C) gerçekleştirildi. Ölçümden önce tüm reaktiflerin ve serumların oda sıcaklığına ulaşması beklendi. Reaktifler ve serumlar vortekslendi.
- 25 µl standard, kontrol veya örnek kuyucuklara pipetlendi. Ara vermeden her kuyucuğa 75 µl dilüe HRP konjugat solüsyonu eklendi. Bu adım toplam 15 dakika içinde bitirildi.
- Her kuyucuğa 75 µL M30 HRP konjugat solüsyonu eklendi.
- Plaklar yaklaşık 600 rpm'de dört saat boyunca çalkalanarak oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Kuyucuklardaki sıvı tamamen aspire edilerek her kuyucuk 250 µL yıkama solüsyonu ile yıkandı. Bu işlem toplam beş defa tekrar edildi.



- HRP'nin yıkama ile tamamen uzaklaştırılmasından sonra her kuyucuğa 200 µL TMB çözeltisi eklendi ve karanlıkta 19-21 dakika inkübe edildi.
- Reaksiyon her kuyucuğa 50 µl "Stop" solüsyonu (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) eklenerek durduruldu. TMB çözeltisi ile "Stop" solüsyonunun tamamen karıştığından emin olmak için plak, 5-10 saniye çalkalandı.
- Her kuyucuğun absorbansı 30 dakika içerisinde 450 nm'de ELISA plak okuyucuda okutularak saptandı.
- M30-Apoptosense<sup>®</sup> ELISA ölçüm sonuçları Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplandı. Elde edilen absorbans değerleri 50, 250, 500, 750 U/L'lik standartlar ile hazırlanan eğrilere yerleştirilerek CK18 konsantrasyon değerleri saptandı (Şekil 3).



Şekil 3. M30 standart eğrisi , x-ekseni: konsantrasyon (U/L); y-ekseni: absorbans (A450)

### 3.3.1.3. Toplam Sitokeratin 18 Düzeyi ( M65 ) Ölçüm Yöntemi

#### *M65<sup>®</sup> ELISA Kiti*

M65<sup>®</sup> ELISA kiti ile sağlanan çalışma materyalleri aşağıdadır:

96 testlik reaktif
Her biri sekiz adet kuyucuk içeren 12 adet mikrostrip

HRP konjugat konsantresi : Bir şişe 0.4 mL horseradish peroxidase (HRP) ile konjuge fare monoklonal antikoru “M5” içerir. Işığa maruz kalmamalıdır.
Konjugat seyreltme tamponu: Bir şişe 12 mL fosfat tamponu içerir.
TMB Substrat Solüsyonu: Bir şişe 22 mL 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (TMB) solüsyonu içerir.
Stop Solüsyonu: Bir şişe 8 mL 1.0 M sülfürik asid içermektedir. $H_2SO_4$ ciltte yanığa neden olur.
Standardlar A-F: Dilüent içerisinde standard materyali içeren altı adet 0.5 mL'lik şişe bulunmaktadır. Standardların değerleri 125, 250, 500, 750, 1200 ve 2000 U/L'dir.
Düşük ve yüksek kontrol : Fosfat tamponlu FCS içerisinde ölçülecek materyali içeren iki adet 0.5 mL'lik şişe. Düşük ve yüksek kontrollerin değerleri sırasıyla; $200 \pm 20$ U/L ve $1000 \pm 100$ U/L'dir.
Dilüent: 8 mL Fosfat tamponlu FCS içeren bir şişe.
Yıkama Solüsyonu: Bir şişe 50 mL konsantre (10X) yıkama solüsyonu içerir. Kullanımdan önce 450 mL taze distile su ile dilüe edilir. Dilüe solüsyon 0.014 M fosfat tamponu, 0.15 M sodyum klorür ve 0.1 % Tween <sup>®</sup> 20 içerir.

### ***Ölçümün Temel İlkesi***

M65, çözünür CK18'in kantitatif ölçümü için geliştirilmiş ELISA yöntemidir. Hücre zarının bütünlüğünü kaybetmesiyle CK18 hücre dışına salındığı için , hücre dışı CK18 epiteliyal hücre ölümü için bir belirteç olarak kullanılabilir.

M65<sup>®</sup> ELISA, CK18 üzerindeki epitoplara spesifik iki fare monoklonal antikoru kullanır (klon “M6” ve “M5”, ikisi de IgG2b). M65<sup>®</sup> ELISA yöntemi ile toplam çözünür CK18 proteini (hem kaspazlarca kesilmiş, hem de kesilmemiş) ölçüldüğü için, hücre kültür süpernatantlarından veya insan serum ve plazma örneklerinden elde edilen değerler, toplam epiteliyal hücre ölümünü yansıtmaktadır.

M65<sup>®</sup> ELISA katı-fazlı iki yönlü immunosorbent ölçüm yöntemidir. CK18'e karşı geliştirilmiş fare monoklonal antikoru “M6”, polisteren kuyucuklar içerisine sabitlenmiştir. Örnekler antikor ile reaksiyona girer. Bununla eşzamanlı olarak CK18 üzerindeki başka bir epitopa karşı geliştirilmiş HRP konjuge “M5” monoklonal antikoru da reaksiyona sokulur.

Katı faz/antijen/işaretli antikor sandviçinin oluşumunu takiben, bağlanmamış fazlalık konjuge antikor, yıkama ile uzaklaştırılır. Bağlı antikor ile reaksiyona giren TMB substratı eklenir ve bağlı analit miktarı ile doğru orantılı oluşan renk şiddeti ölçülür. Reaksiyon  $H_2SO_4$  ilavesi ile durdurulduktan sonra renk şiddeti 450 nm’de plak okuyucuda ölçülür. Bilinen konsantrasyonlara karşı ölçülmüş absorbanlar ile oluşturulmuş standard eğri ile örnekteki antijen miktarı ölçülür. M65-antijen konsantrasyonu Unite/ Litre (U/L) olarak ifade edilir.

Ölçüm aralığı:0-2000 U/L, ölçüm içi % CV < %10, ölçümler arası % CV < %10, alt saptama sınırı: 11 U/L’dir.

### ***Ölçüm Öncesi Hazırlıklar***

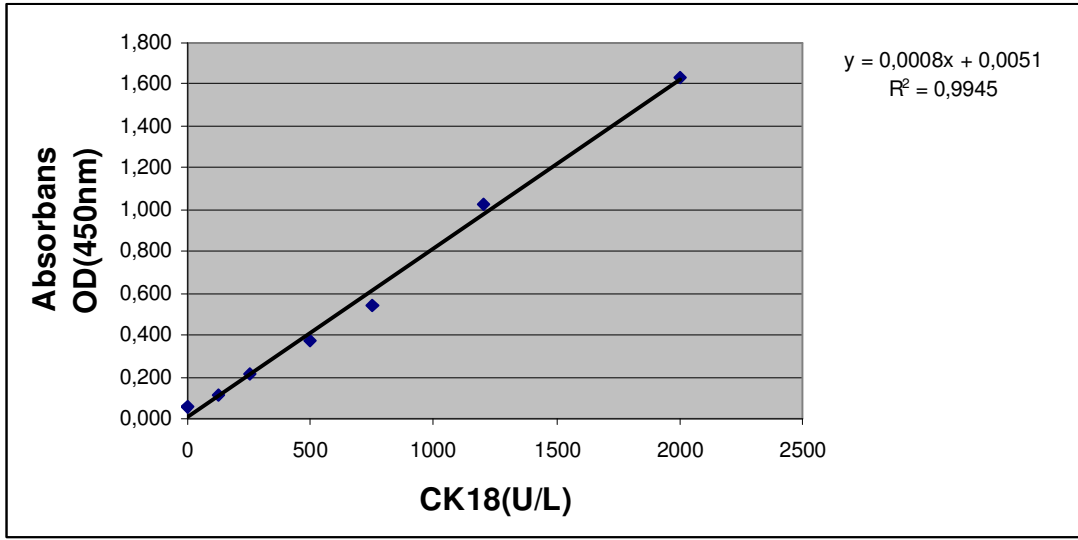
HRP konjugat solüsyonunun hazırlanması: HRP konjugat konsantresi , konjugat dilüsyon tamponu ile dilüe edilir (Dilüsyon faktörü 1:24).

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması: 50 ml yıkama solüsyon konsantresi, 450 ml taze distile su ile dilüe edilir.

### ***Ölçüm yöntemi***

- M65-Apoptosense<sup>®</sup> ELISA ölçümü oda sıcaklığında ( $20\pm 4^\circ C$ ) gerçekleştirildi. Ölçümden önce tüm reaktiflerin ve serumların oda sıcaklığına ulaşması beklendi. Reaktifler ve serumlar vortekslendi.
- 25 µl standard, kontrol veya örnek kuyucuklara pipetlendi. Ara vermeden her kuyucuğa 75 µl dilüe HRP konjugat solüsyonu eklendi. Bu adım toplam 15 dakika içinde bitirildi.
- Her kuyucuğa 75 µL M65 HRP konjugat solüsyonu eklendi.
- Plaklar yaklaşık 600 rpm’de iki saat boyunca çalkalanarak oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Kuyucuklardaki sıvı tamamen aspire edilerek her kuyucuk 250 µL yıkama solüsyonu ile yıkandı. Bu işlem toplam beş defa tekrar edildi.
- HRP’nin yıkama ile tamamen uzaklaştırılmasından sonra her kuyucuğa 200 µL TMB çözeltisi eklendi ve karanlıkta 19-21 dakika inkübe edildi.
- Reaksiyon her kuyucuğa 50 µl “Stop” solüsyonu ( $H_2SO_4$ ) eklenerek durduruldu.TMB çözeltisi ile “Stop” solüsyonunun tamamen karıştığından emin olmak için plak, 5-10 saniye çalkalandı.

- Her kuyucuğun absorbanası 30 dakika içerisinde 450 nm’de ELISA plak okuyucuda okutularak saptandı.
- M65-Apoptosense<sup>®</sup> ELISA ölçüm sonuçları Mikrosoft Excel programı yardımıyla hesaplandı. Elde edilen absorban değerleri 125, 250, 500, 750, 1200 ve 2000 U/L’lik standartlar ile hazırlanan standart eğrilerine (Şekil 4) yerleştirilerek CK18 konsantrasyon değerleri saptandı.



Şekil 4. M65 standart eğrisi , x-ekseni: konsantrasyon (U/L); y-ekseni: absorban (A450)

### 3.4. DIĞER BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN ÖLÇÜMLERİ

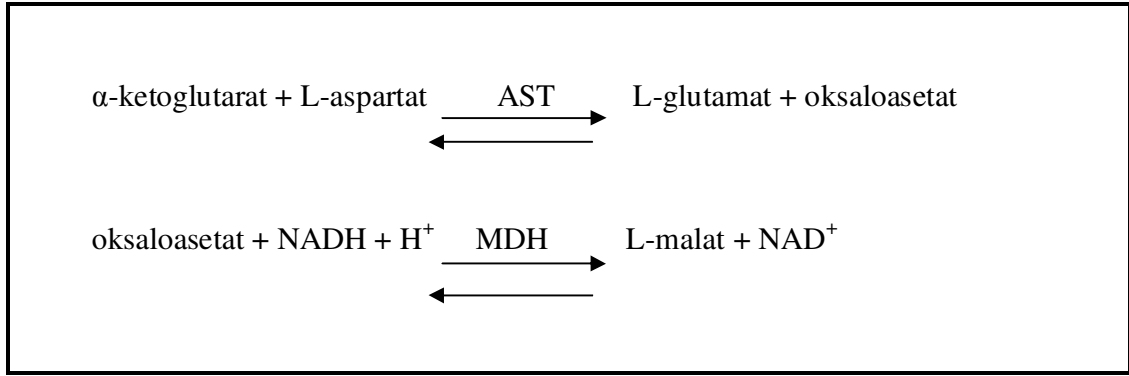
#### 3.4.1. Karsinoembriyonik Antijen Ölçüm Yöntemi

Karsinoembriyonik antijen ölçümü katı faz, iki yönlü immunometrik kemilüminesans yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Serum örnekleri Immulite 2500 otoanalizöründe çalışıldı.

Kemilüminesans immünometrik yöntemde, immünolojik reaksiyonları ölçmek için işaretleyici olarak kemilüminesans bir molekül kullanılmaktadır. Kemilüminesans, kimyasal reaksiyon sırasında oluşan ışık yayılımıdır. İzoluminol veya akridinyum esterleri gibi kemilüminesans özellik gösteren işaretleyici maddeler reaksiyon sırasında konsantrasyona paralel oranda ışık yayılımı yapmaktadır<sup>110</sup>.

### 3.4.2. Aspartat Aminotransferaz Ölçüm Yöntemi

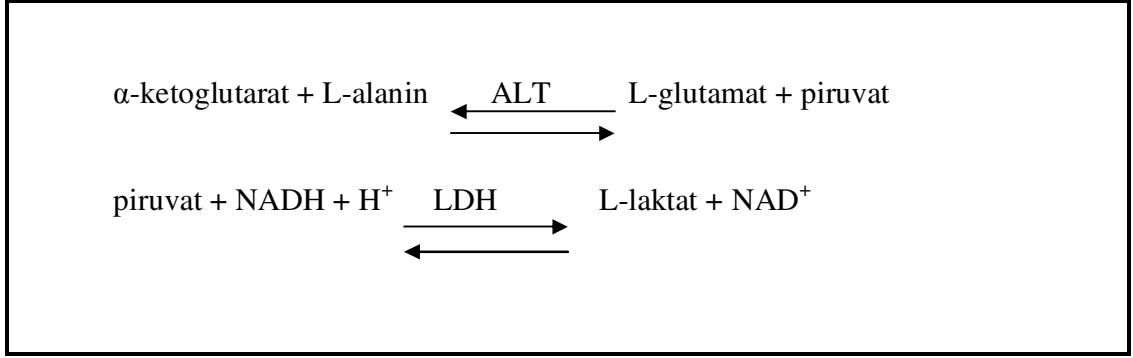
Aspartat aminotransferaz (AST) ölçümü, enzimatik kolorimetrik yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Serum örnekleri Hitachi DP Modüler Sistem otoanalizöründe Roche Diagnostik firmasının reaktifleri kullanılarak analiz edildi. Aspartat aminotransferaz enzimi aspartat amino asidinden  $\alpha$ -ketoglutarata amin grubunun taşınmasını katalizleyerek glutamat ve oksaloasetat oluşumunu sağlar. Oluşan oksaloasetat malat dehidrogenaz (MDH) enzimi ve  $\text{NADH} + \text{H}^+$  koenzimi yardımıyla L-malata çevrilirken  $\text{NAD}^+$  oluşur. 340 nm'de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  tüketişine bağlı absorbands azalışı oksaloasetat oluşumuyla ve dolayısıyla AST aktivitesi ile doğru orantılıdır (Şekil 5).



Şekil 5. AST ölçüm yöntemi

### 3.4.3. Alanin Aminotransferaz Ölçüm Yöntemi

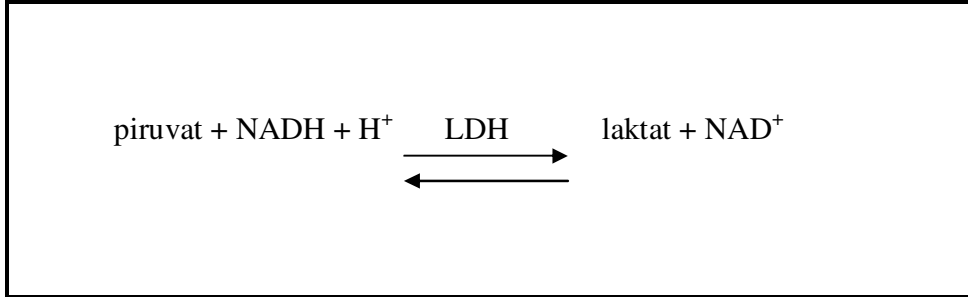
Alanin aminotransferaz (ALT) ölçümü, enzimatik kolorimetrik bir yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Serum örnekleri Hitachi DP Modüler Sistem otoanalizöründe Roche Diagnostik firmasının reaktifleri kullanılarak çalışıldı. Alanin aminotransferaz enzimi alanin amino asidinden  $\alpha$ -ketoglutarata amin grubunun taşınmasını katalizleyerek glutamat ve piruvat oluşumunu sağlar. Oluşan piruvat laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi ve  $\text{NADH} + \text{H}^+$  koenzimi yardımıyla L-laktata çevrilirken  $\text{NAD}^+$  oluşur. 340 nm'de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  tüketişine bağlı absorbands azalışı piruvat oluşumuyla ve dolayısıyla ALT aktivitesi ile doğru orantılıdır (Şekil 6).



**Şekil 6.** ALT ölçüm yöntemi

#### 3.4.4. Laktat Dehidrogenaz Ölçüm Yöntemi

Laktat dehidrogenaz (LDH) ölçümü, enzimatik kolorimetrik yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Serum örnekleri Hitachi DP Modüler Sistem otoanalizöründe Roche Diagnostik firmasının reaktifleri kullanılarak çalışıldı. Piruvat, LDH enziminin katalizlediği reaksiyonla laktata çevrilirken,  $\text{NADH} + \text{H}^+$  de  $\text{NAD}^+$ 'ye okside olmaktadır.  $\text{NADH} + \text{H}^+$  tüketiş hızı LDH aktivitesiyle doğru orantılıdır ve fotometrik olarak 340 nm'deki absorbans azalışına bağlı olarak saptanır (Şekil 7).

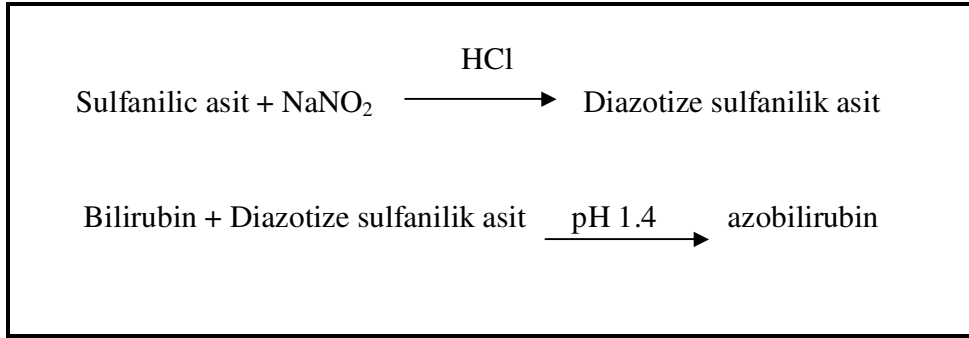


**Şekil 7 .** LDH ölçüm yöntemi

### 3.4.5. Total Bilirubin Ölçüm Yöntemi

Total bilirubin ölçümü, *end point* kolorimetrik yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Serum örnekleri Hitachi DP Moduler Sistem otoanalizöründe Roche Diagnostik firmasının reaktifleri kullanılarak çalışıldı. Bilirubin 2,5-diklorofenil diazonyum tetrafloroborata asit ortamda (pH 1-2) mavi renkli azobilirubini oluşturmak üzere birleşir. Reaksiyon ortamına alkol eklenerek yapılan bilirubin ölçümü total bilirubini göstermektedir.

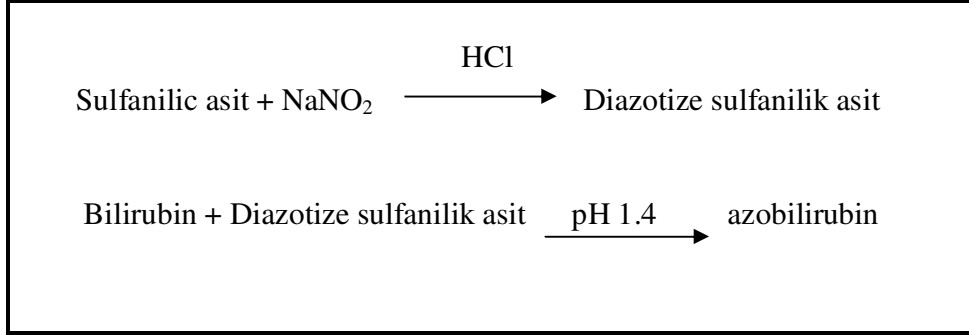
Rengin yoğunluğu total bilirubin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve spektrofotometrik olarak 570 nm’de belirlenir (Şekil 8).



Şekil 8 . Total bilirubin ölçüm yöntemi

### 3.4.6. Direk Bilirubin Ölçüm Yöntemi

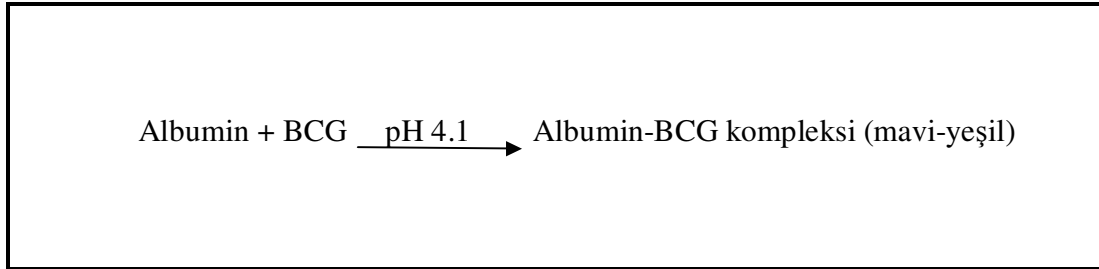
Direk bilirubin ölçümü, kolorimetrik yöntem kullanılarak yapıldı. Serum örnekleri Hitachi DP Moduler Sistem otoanalizöründe Roche Diagnostik firmasının reaktifleri kullanılarak çalışıldı. Diazonyum bilirubinle birleşerek azobilirubin oluşturur. Alkolün yokluğunda diazo reaktifleri ile reaksiyon veren bilirubin fraksiyonu direkt bilirubin olarak tanımlanmıştır. Sadece konjuge bilirubin diazonyum iyonuyla birleşir. Oluşan mavi renkli azo boyasının renk yoğunluğu direkt bilirubin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 570 nm’de fotometrik olarak belirlenir (Şekil 9).



**Şekil 9 .** Direk bilirubin ölçüm yöntemi

### 3.4.7. Albumin Ölçüm Yöntemi

Albumin ölçümü *endpoint* kolorimetrik yöntem kullanılarak yapıldı. Serum örnekleri Hitachi DP Moduler Sistem otoanalizöründe çalışıldı. Albumin pH 4.1’de katyonik özellik kazanmakta ve anyonik bir boya olan bromokrezol green (BCG) ile bağlanarak mavi-yeşil bir kompleks oluşturmaktadır. Mavi-yeşil rengin 600 nm’de verdiği absorbans artışı albumin konsantrasyonuyla doğru orantılıdır (Şekil 10).



**Şekil 10 .** Albumin ölçüm yöntemi

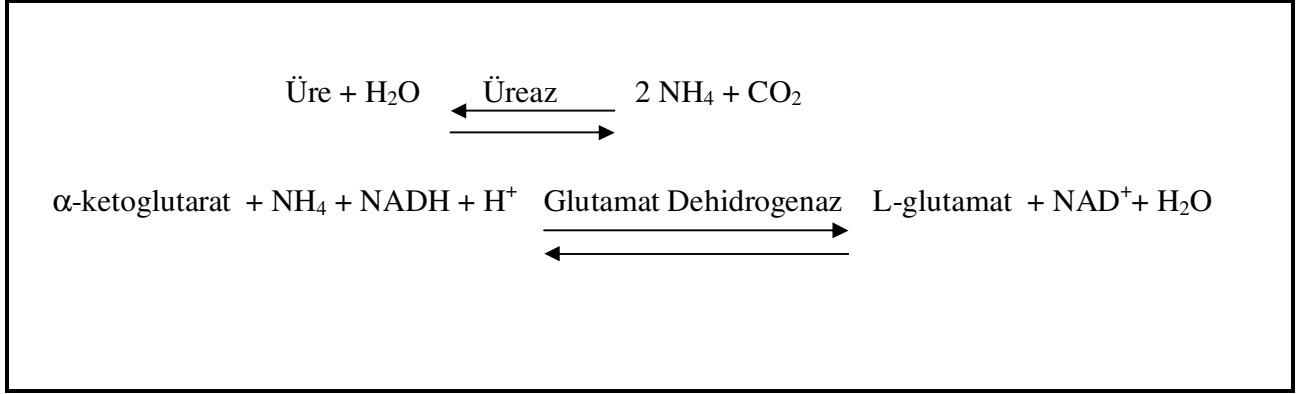
### 3.4.8. BUN Ölçüm Yöntemi

BUN ölçümü, kinetik kolorimetrik yöntem kullanılarak yapıldı. Serum örnekleri Hitachi DP Moduler Sistem otoanalizöründe çalışıldı.

Üre üreaz enziminin katalizlediği reaksiyonla  $\text{NH}_4$  ve  $\text{CO}_2$ ’e dönüşür.  $\text{NH}_4$  ve  $\alpha$ -ketoglutarat, glutamat dehidrogenazın katalizlediği reaksiyonla glutamata çevrilirken  $\text{NADH} + \text{H}^+$  de  $\text{NAD}^+$ ’ye



dönüür. NADH+ H<sup>+</sup> konsantrasyonundaki azalmaya bađlı olarak absorbands düűer. Absorbanstaki bu azalma üre konsantrasyonuyla dođru orantılıdır ve 340 nm’de ölçüür (űekil 11).

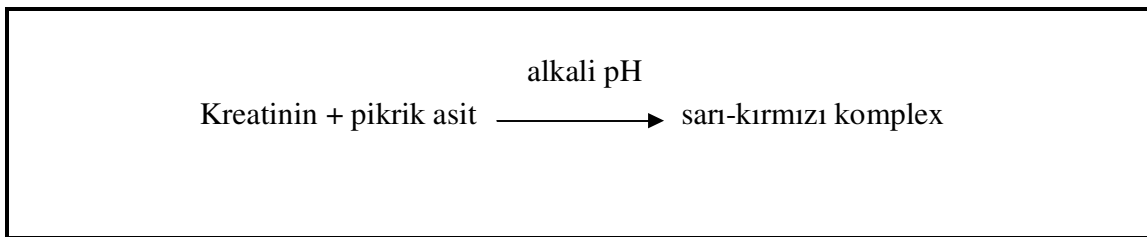


űekil 11 . BUN ölçüm yöntemi

### 3.4.9. Kreatinin Ölçüm Yöntemi

Kreatinin ölçümü, kolorimetrik yöntem kullanılarak yapıldı. Serum örnekleri Hitachi DP Moduler Sistem otoanalizöründe Jaffe reaktifi kullanılarak çalışıldı.

Kreatinin pikrat iyonu ile alkali ortamda reaksiyona girerek, turuncu kırmızı bir kompleks oluşturur. Oluűan renk yoğunluđu kreatinin konsantrasyonuyla dođru orantılıdır ve 512 nm’de fotometrik olarak belirlenir (űekil 12).



űekil 12. Kreatinin ölçüm yöntemi

### 3.5. RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME

#### *Neoadjuvan Kemoterapi Alan Hastalar*

Neoadjuvan KT alan hastaların radyolojik değerlendirmesinde RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) kriterlerine göre sınıflama yapılmıştır. Buna göre, tam veya kısmi yanıt alınan olgular tedaviye yanıt verenler olarak değerlendirilmiştir (Tablo 7).

<b>YANIT</b>	<b>KRİTER</b>
Tam yanıt	Tüm lezyonların kaybolması.
Kısmi yanıt	Tedavi öncesi ölçülen değer referans alındığında , tedavi sonrası ölçümde hedef lezyonların ölçümünün toplamının en az %30 oranında azalması.
İlerleyici hastalık	Tedavi öncesi ölçülen değer referans alındığında , tedavi sonrası ölçümde hedef lezyonların %20 oranında artması veya yeni lezyonların ortaya çıkması.
Stabil hastalık	Tedavi öncesi ölçülen değer referans alındığında , ne kısmi yanıt ne de ilerleyici hastalığı karşılıyor.

**Tablo 7.** RECIST kriterlerine göre radyolojik değerlendirme

### ***Adjuvan Kemoterapi Alan Hastalar***

Adjuvan KT alan hastalar, tedavi sonrası “progresyonlu” ve “progresyonsuz” olarak iki gruba ayrılmıştır. Progresyonsuz hastalar tedaviye yanıt verenler, progresyonlu hastalar tedaviye yanıt vermeyenler olarak değerlendirilmiştir.

### **3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER**

Bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 11.0 Windows istatistik programı kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme yapılırken Mann whitney U, Wilcoxon işaretlenmiş sıralar, Spearman, Fisher’ın kesinlik testi kullanıldı.

İstatistiksel olarak p değeri < 0,05 ise anlamlı olarak değerlendirildi. Anlamlı değerler sayısal ifade, kalın ve italik karakterlerle verildi.

---

---

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

---

---

### 4. BULGULAR

#### 4.1. TANIMLAYICI BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kemoterapi Ünitesi'nde KT tedavisi alan 37-75 yaş arası 17 kolorektal kanser hastası ve 20 sağlıklı gönüllü birey çalışmaya dahil edildi. Hasta grubunda altı hasta neoadjuvan (ameliyat öncesi tümörü küçültmek amacıyla), 11 hasta adjuvan (ameliyat sonrası) KT almıştır.

Kontrol grubu, bilinen herhangi bir hastalığı olmayan, ilaç kullanmayan 30-56 yaş arası 20 bireyden oluşturuldu. Hasta ve kontrol gruplarının özellikleri ve rutin biyokimya değerleri tablo 8 ve 9'da gösterilmiştir.

ÖZELLİK	Malign grup (n=17)	Kontrol grubu (n=20)
Yaş-ortalama ( $\pm$ SD)	55 ( $\pm$ 11)	41 ( $\pm$ 6)
Cinsiyet (K/E)	7/10	9/11
Tümör evre III/ IV(n)	11/6	-
*AST (U/L)	23,6 ( $\pm$ 12,9)	19 ( $\pm$ 5,5)
*ALT (U/L)	26,5( $\pm$ 21,8)	25,2( $\pm$ 15,5)
*LDH (U/L)	314( $\pm$ 153)	171( $\pm$ 1,09)
*T.Bilirubin (mg/dL)	0,56( $\pm$ 0,2)	0,41( $\pm$ 0,15)
*D.Bilirubin (mg/dL)	0,12( $\pm$ 0,08)	0,21( $\pm$ 0,06)
*Albumin (g/dL)	4,03( $\pm$ 0,5)	4,9( $\pm$ 0,19)
*BUN (mg/dL)	13,5( $\pm$ 4,39)	14,5( $\pm$ 2,29)
*Kreatinin (mg/dL)	0,91( $\pm$ 0,08)	0,92( $\pm$ 0,16)

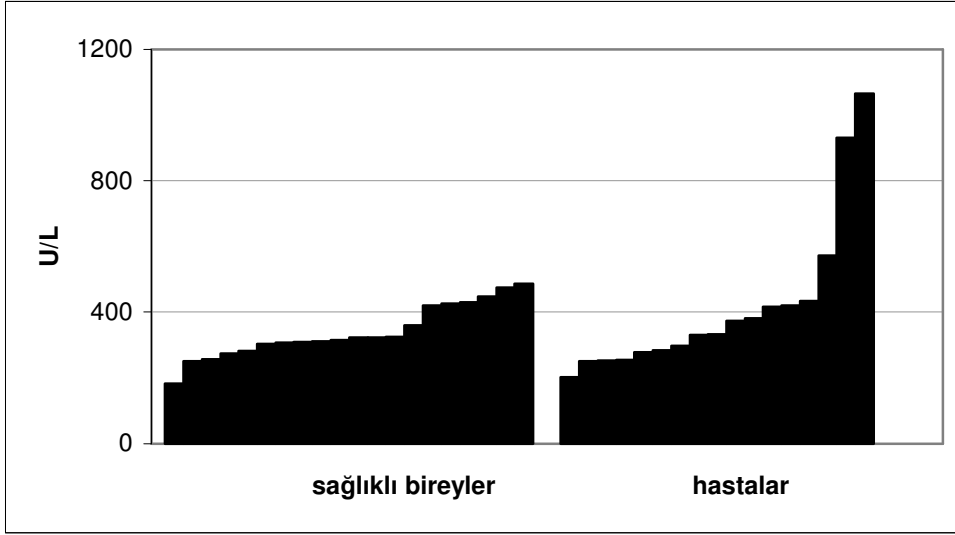
**Tablo 8 :** Hasta ve kontrol gruplarının özellikleri ve rutin biyokimya değerleri

Hasta No	Yaş	Metastaz Yeri	TNM evre	Patoloji	KT	RC
2	38	Mesane, Lenf nodu	IV	AdenoCA (rektum)	N	Kısmi yanıt
6	62	Karaciğer	IV	AdenoCA (sigmoid)	N	Kısmi yanıt
7	60	Karaciğer	IV	AdenoCA (sigmoid)	N	Kısmi yanıt
5	43	Akciğer, Lenf nodu	IV	AdenoCA (rektum)	N	İlerleyici hastalık
9	47	Karaciğer, Lenf nodu	IV	AdenoCA (rektosigmoid)	N	İlerleyici hastalık
10	57	Lenf nodu	III	AdenoCA (rektum)	N	İlerleyici hastalık
1	58	Karaciğer, Lenf nodu	IV	AdenoCA (rektosigmoid)	A	Progresyonsuz
3	47	Lenf nodu	III	AdenoCA (sigmoid)	A	Progresyonsuz
4	75	Lenf nodu	III	AdenoCA (sigmoid)	A	Progresyonsuz
8	37	Lenf nodu	III	AdenoCA (rektum)	A	Progresyonsuz
11	59	Lenf nodu	III	AdenoCA (çıkan kolon)	A	Progresyonsuz
12	48	Lenf nodu	III	AdenoCA (sigmoid)	A	Progresyonsuz
13	71	Lenf nodu	III	AdenoCA (çekum,çıkan kolon)	A	Progresyonsuz
14	55	Lenf nodu	III	AdenoCA (rektosigmoid)	A	Progresyonsuz
15	59	Lenf nodu	III	AdenoCA (sigmoid)	A	Progresyonsuz
16	50	Lenf nodu	III	AdenoCA (sigmoid)	A	Progresyonsuz
17	70	Lenf nodu	III	AdenoCA (çıkan kolon)	A	Progresyonsuz

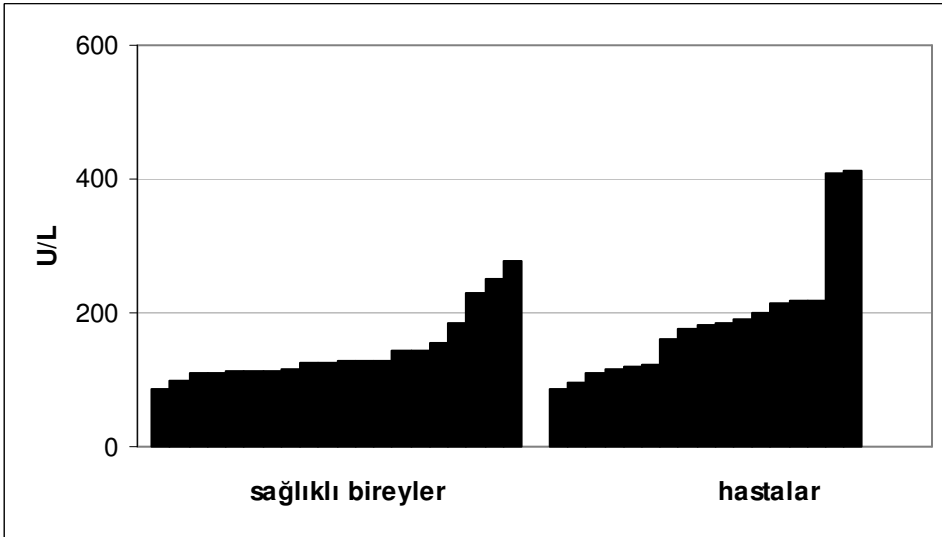
**Tablo 9:** Hastalarda tümör metastaz yerleri, TNM evresi, tümör tipi

KT: Kemoterapi, A: Adjuvan, N: Neoadjuvan, RC: Radyolojik Cevap. Neoadjuvan KT alan hastalar için RECIST kriterleri esas alınmıştır. Adjuvan KT alan hastalar progresyonlu / progresyonsuz olarak değerlendirilmiştir.

Hasta grubunun KT tedavisine başlamadan önceki (bazal) ve kontrol grubunun serum M65 ve M30 düzeyleri grafik 1 ve 2’de gösterilmektedir.



**Grafik 1.** Hasta (tedavi öncesi) ve kontrol grubundaki bireylerde serum M65 düzeyleri



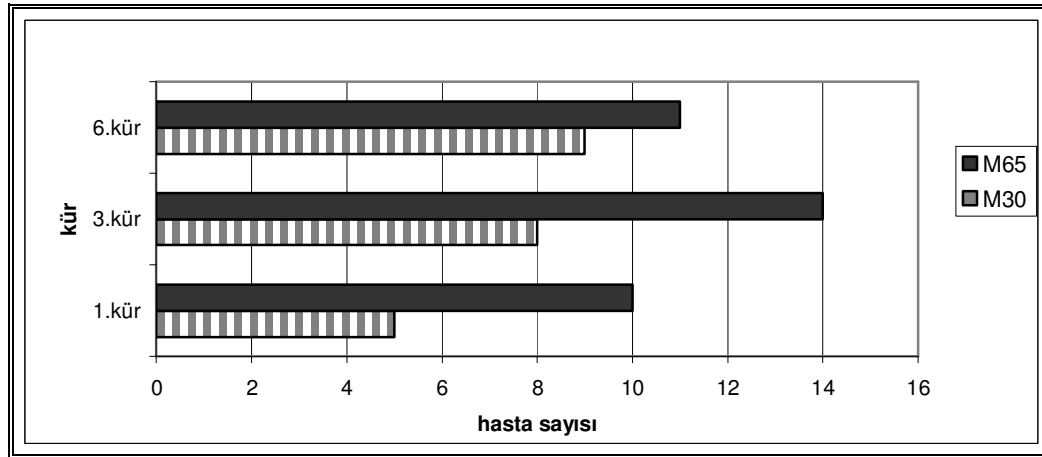
**Grafik 2.** Hasta (tedavi öncesi) ve kontrol grubundaki bireylerde serum M30 düzeyleri

Hastalar altı kürlük kemoterapiye başlamadan önce alınan kanlarında ölçülen CEA ve CK18 düzeyleri tablo 10’da gösterilmiştir.

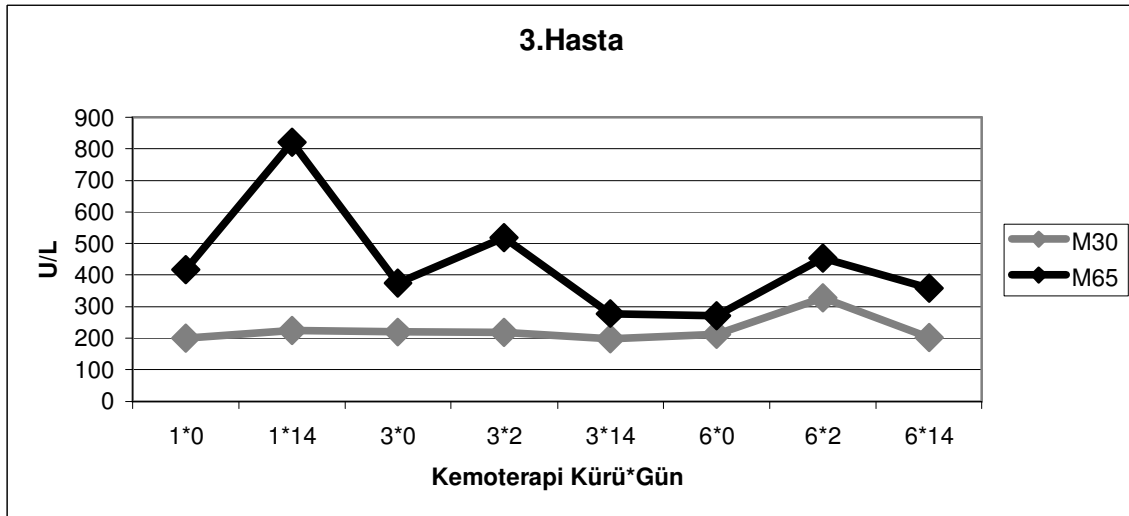
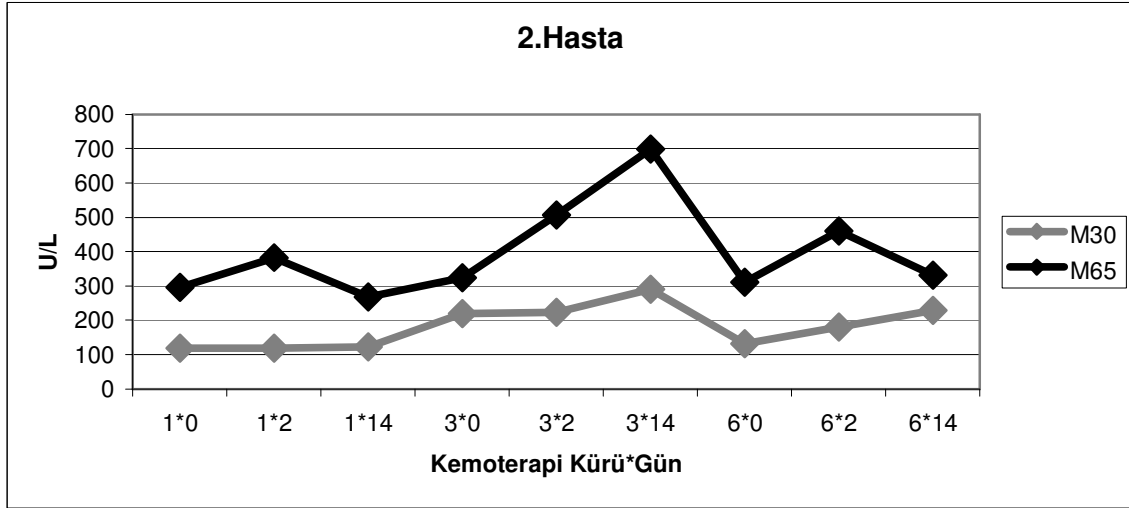
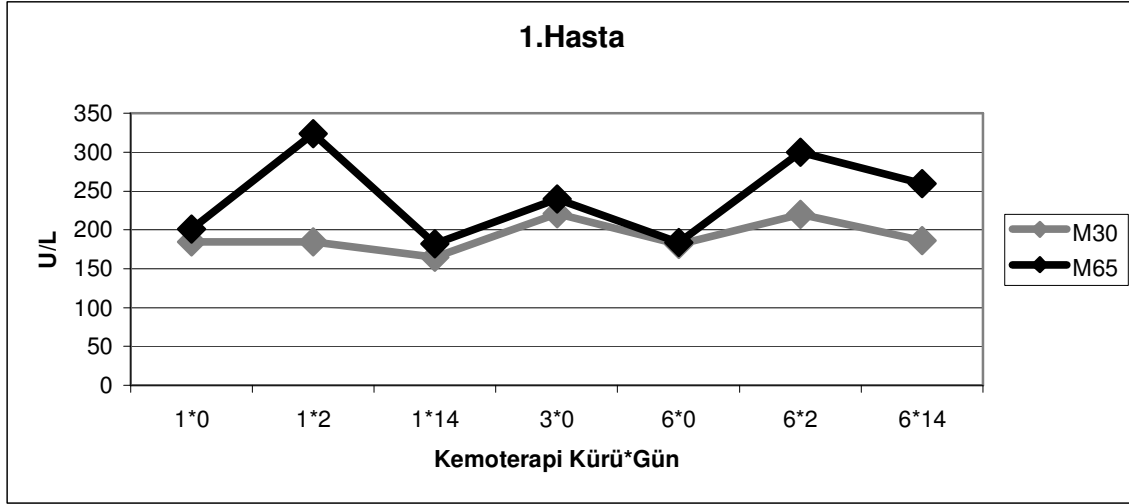
Hasta No	CEA (ng/mL)	M30 (U/L)	M65 (U/L)
1	0,44	185 (±29)	201(±23)
2	1,59	119(±30)	296(±22)
3	2,75	200(±4,9)	417(±7)
4	2,02	161(±5,8)	254(±6)
5	21	122(±27)	284(±32)
6	3,34	183(±2,7)	931(±24)
7	4,98	116(±7,1)	329(±0,4)
8	6,93	192(±19,2)	252(±0,8)
9	448	215(±4,4)	277(±8)
10	11	86(±2)	251(±4)
11	1,67	217(±0,2)	433(±2,2)
12	1,27	412(±0,1)	572(±0,0)
13	1,86	176(±0,0)	382(±3)
14	2,34	110(±2)	332(±0,0)
15	3,11	217(±1)	420(±6)
16	39,1	408(±0,1)	1066(±24)
17	0,72	96(±0,4)	374(±7)

**Tablo 10.** Kolon kanser hastalarında KT öncesi serum CEA, M30 ve M65 düzeyleri

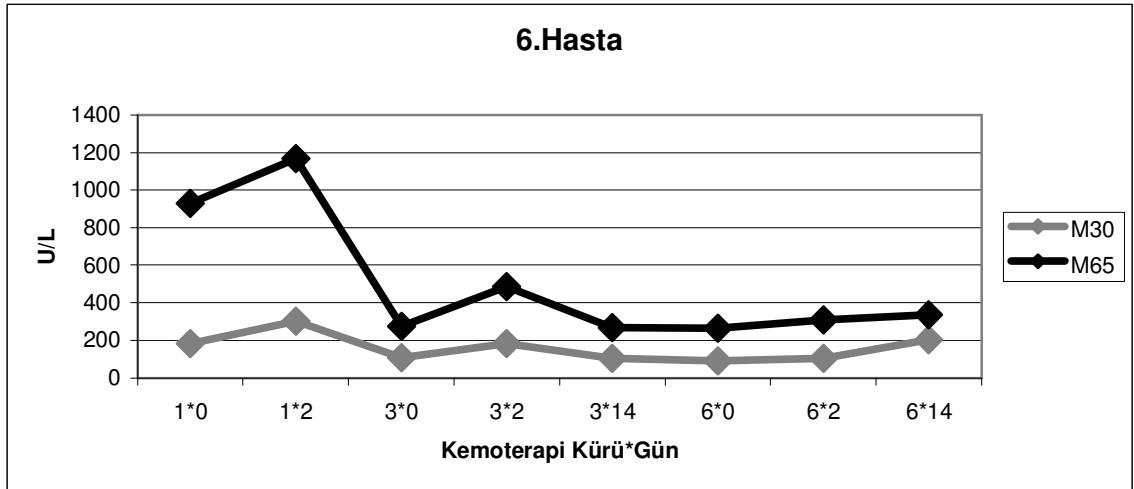
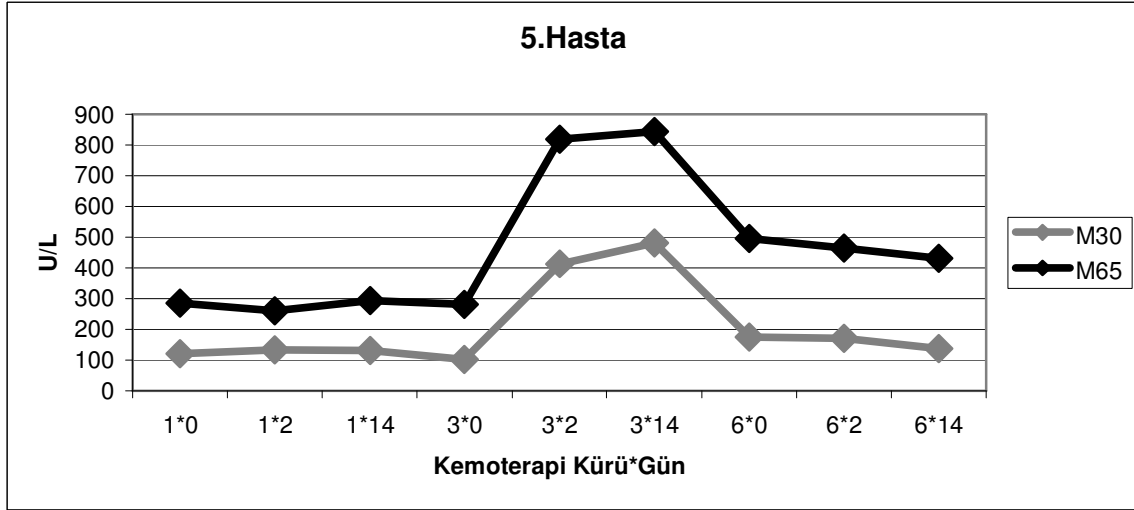
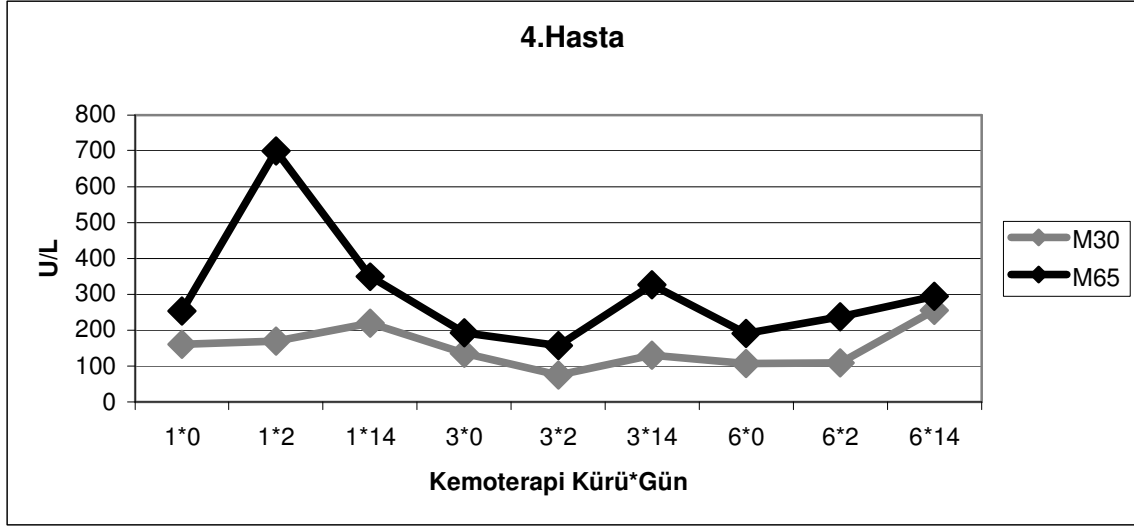
Hastalar KT'ye başlamadan önce alınan kanlarında ölçülen M65 ve M30 düzeylerinin (bazal düzey), bir kısım hastada tedavi boyunca yükseldiği bir kısım hastada düştüğü saptandı (Grafik 3 ve 4).

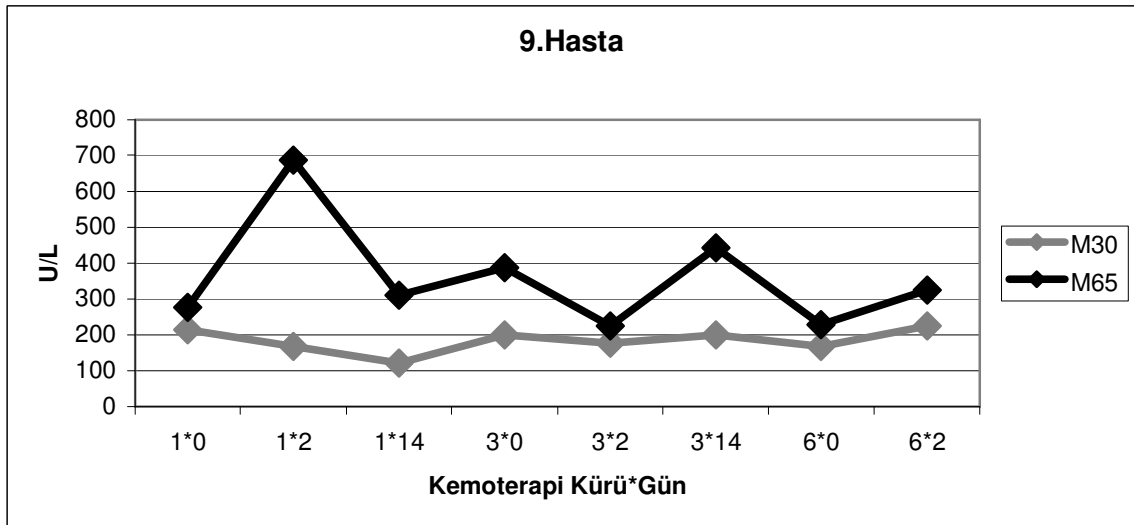
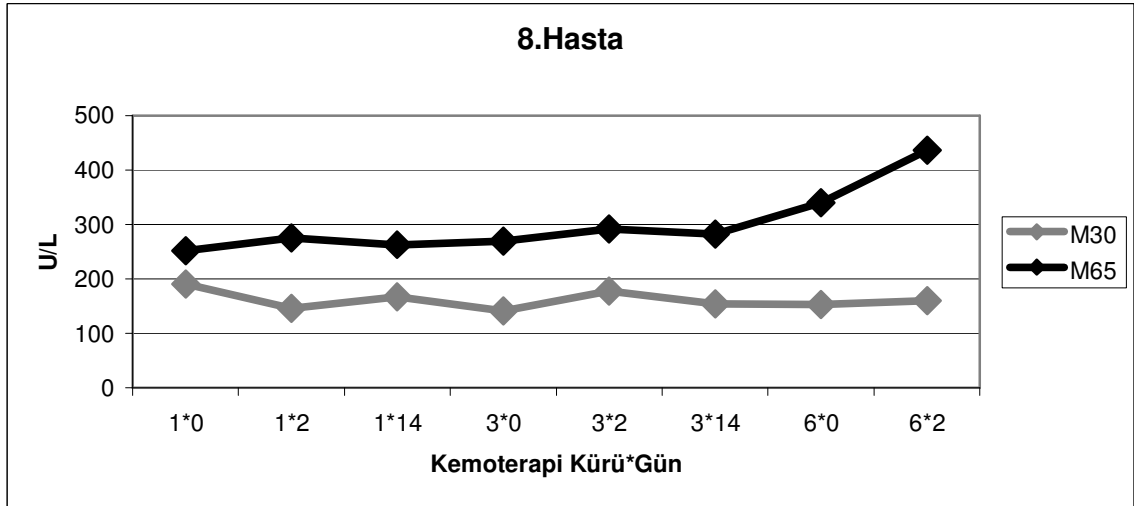
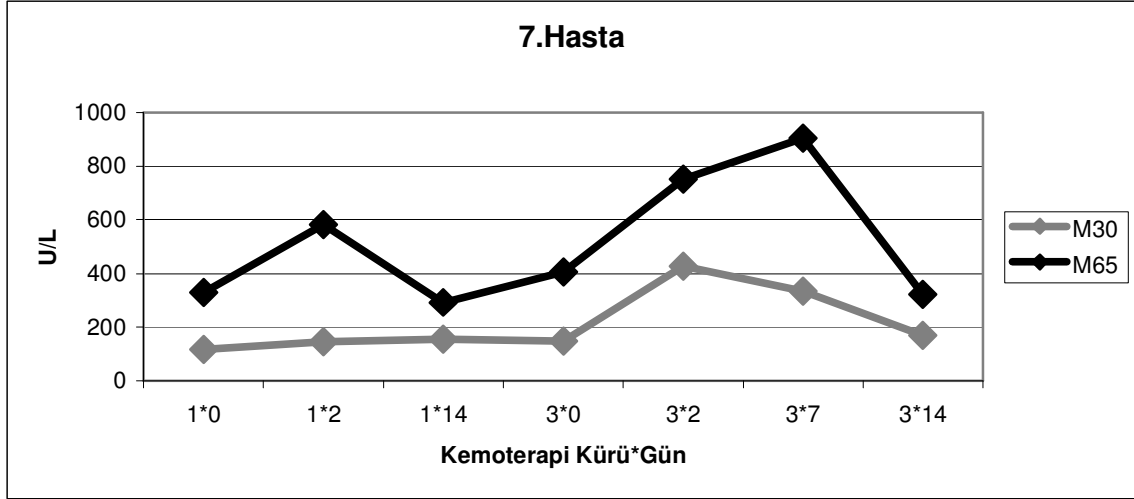


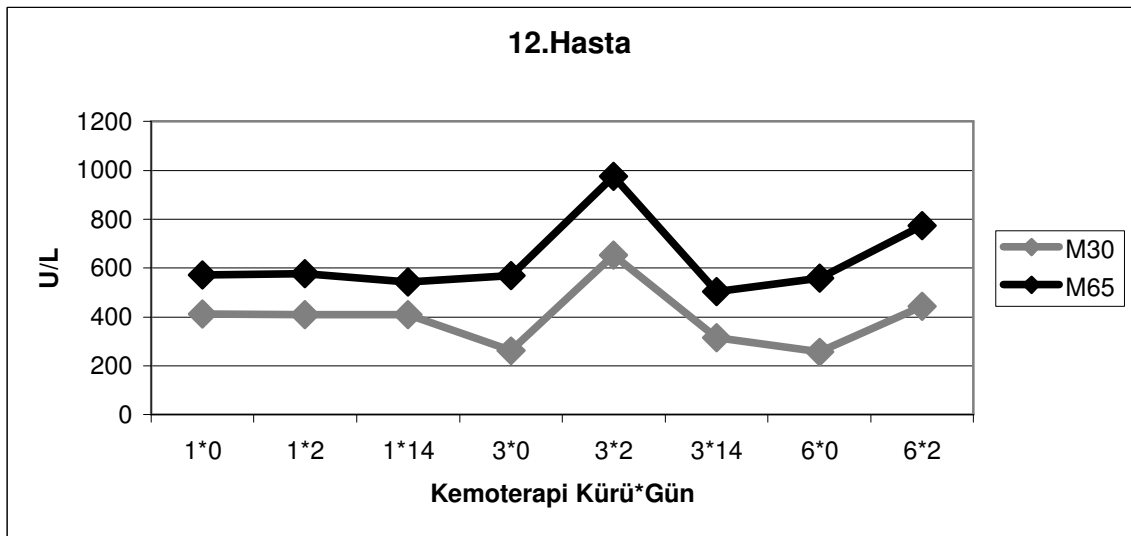
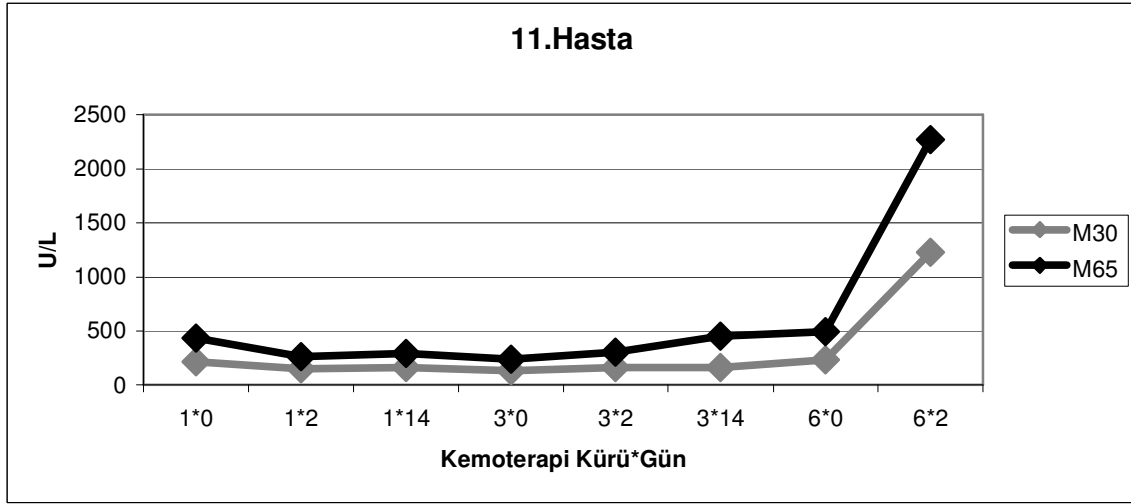
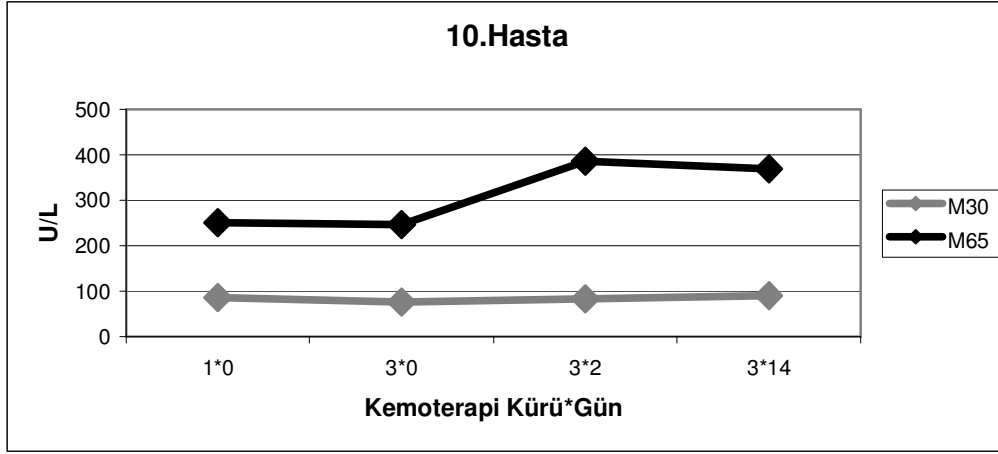
**Grafik 3.** Kemoterapi kürleri sırasında M30 ve M65 düzeyleri birinci KT öncesi alınan kandaki düzeyinin üzerine çıkan hastaların sayısı. M30 ve M65 hasta yanıtı (yanıt=hasta bazal düzeyinin üzeri)

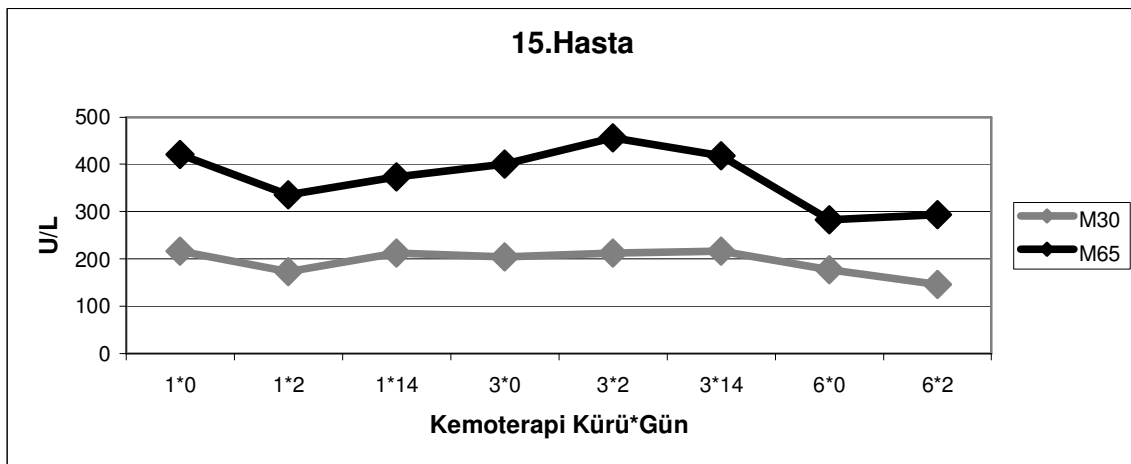
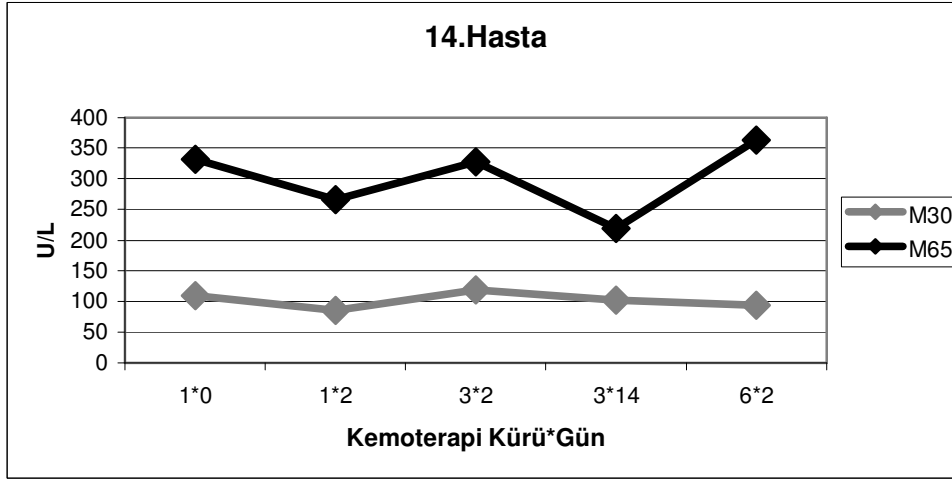
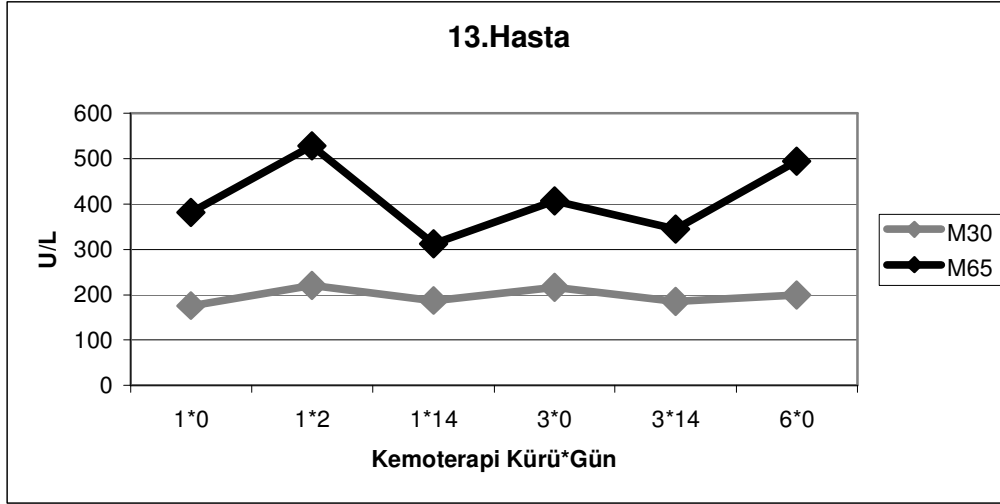


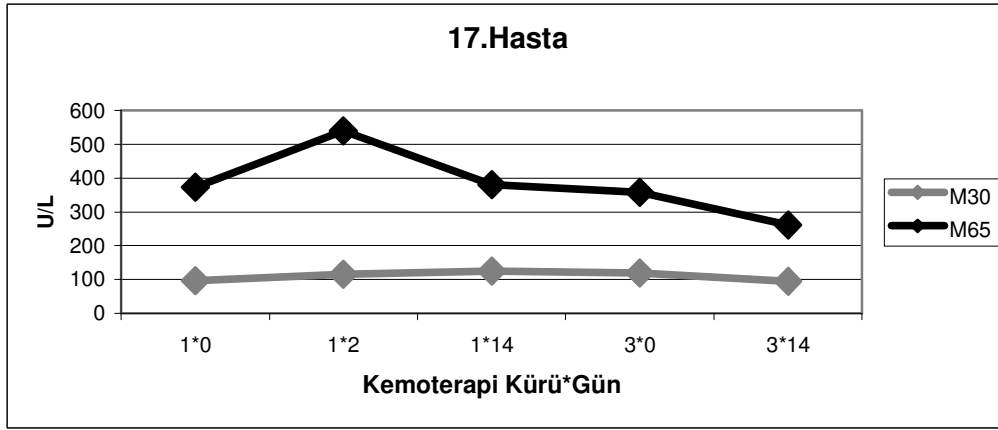
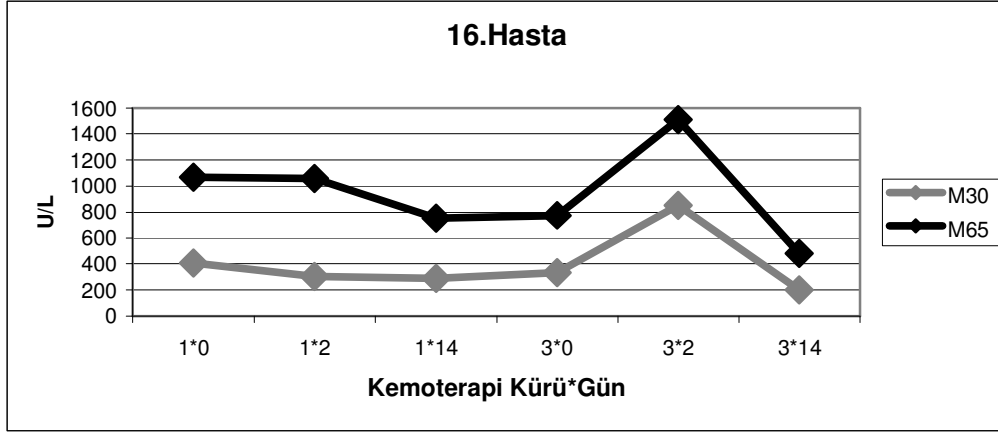








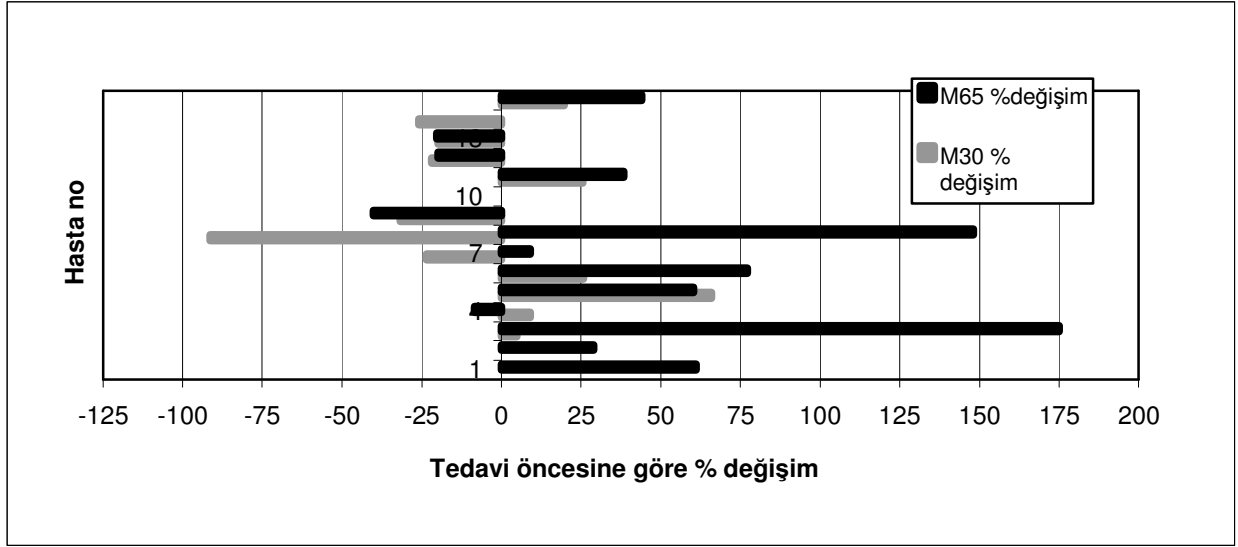




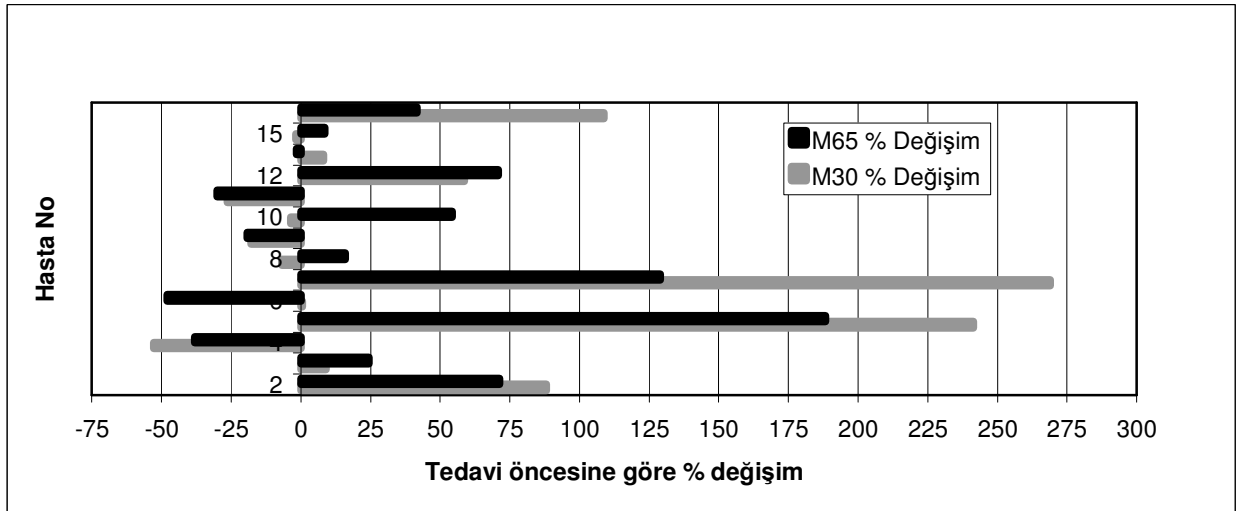
**Grafik 4.** Hastalarda M30 ve M65 düzeylerinin tedavi boyunca değişimi

Hastalarda KT'den sonra serum M30 ve M65 düzeylerinin KT öncesine göre değişiminin hangi oranda olduğu yüzde (%) değişim ile hesaplandı (Grafik 5,6,7). Hastalarda birinci, üçüncü ve altıncı KT'den iki gün sonraki serum M30/M65 düzeylerinin tedavi öncesine göre % değişimi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

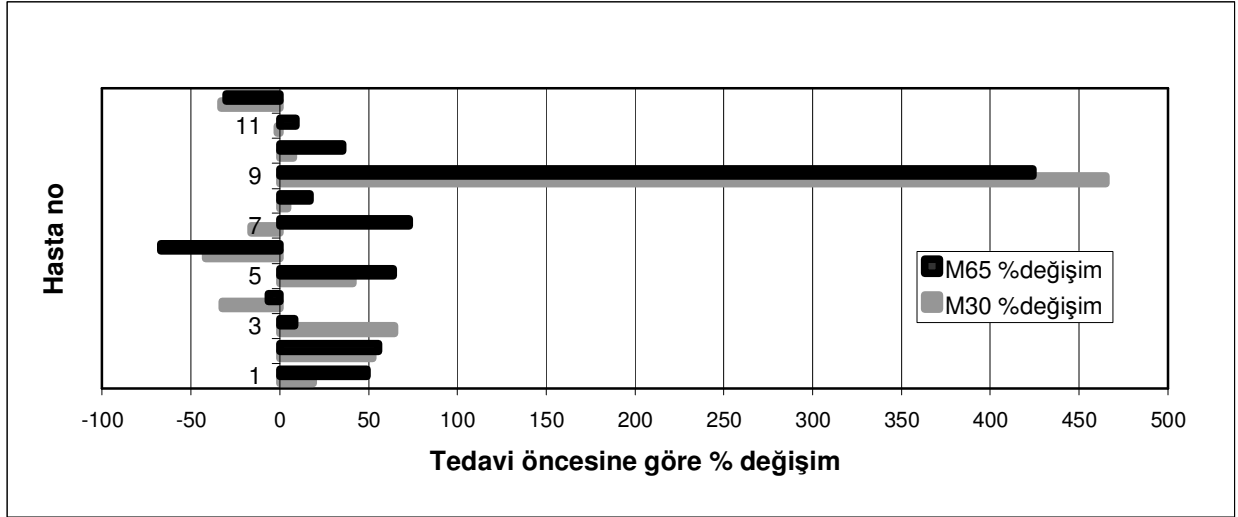
$\% \text{ Değişim} = 100 \times (\text{KT'den iki gün sonraki M30/M65 düzeyi} - \text{KT'den önceki M30/M65 düzeyi}) / \text{KT'den önceki M30/M65 düzeyi}$



**Grafik 5.** Hastalarda birinci KT'den iki gün sonraki serum M30 ve M65 düzeylerinin tedavi öncesine göre % değişimi

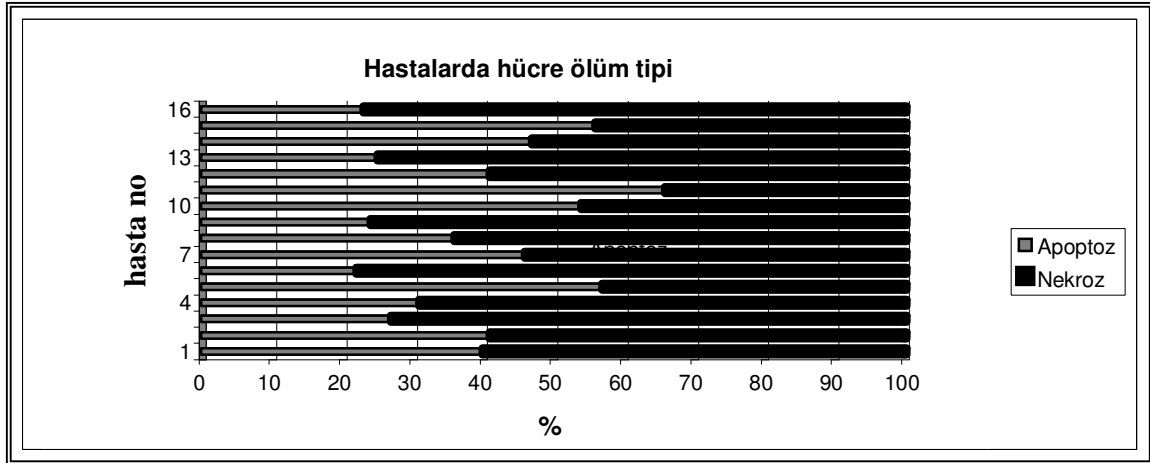


**Grafik 6.** Hastalarda üçüncü KT'den iki gün sonraki serum M30 ve M65 düzeylerinin tedavi öncesine göre % değişimi



**Grafik 7.** Hastalarda altıncı KT'den iki gün sonraki serum M30 ve M65 düzeylerinin tedavi öncesine göre % değişimi

Hastalarda tedavi sırasında toplam hücre ölümünün en fazla olduğu günlerdeki M65 düzeyinden M30 düzeyi çıkarılarak apoptoz dışındaki hücre ölüm tiplerinin miktarı hesaplanmıştır. Grafik 8'de toplam hücre ölümünün en fazla olduğu günlerde baskın hücre ölüm tipinin apoptoz dışı hücre ölüm yolları olduğu görülmektedir.



**Grafik 8.** Hastalarda tedavi sırasında toplam hücre ölümünün en fazla olduğu günde apoptoz-apoptoz dışı yüzdesi

Hasta grubunda tedavi sırasında M30, M65 ve CEA düzeylerinin değişimi, hastanın üç KT kürü sırasında tepe M30/M65 düzeyinin tedavi öncesi düzeyine (bazal düzey) bölünmesiyle elde edilen orana göre değerlendirildi (Tablo 11).

Hasta no	1.KÜR <sup>a</sup>	3.KÜR <sup>a</sup>	6.KÜR <sup>a</sup>	CK18 cevap(+) <sup>b</sup>	CEA cevap <sup>c</sup>	Radyolojik Cevap
2	1/1,29	<b>2,42/2,36</b>	<b>1,92/1,55</b>	+	Referans aralığında	Kısmi yanıt
6	<b>1,4/1,25</b>	1/0,51	1,12/0,36	-	Artış	Kısmi yanıt
7	<b>1,43/1,77</b>	<b>3,65/2,75</b>	<b>1,46/0,98</b>	+	Azalma	Kısmi yanıt
5	1,07/1,02	<b>3,95/2,97</b>	<b>1,42/1,74</b>	+	Azalma	İlerleyici hastalık
9	<b>0,78/2,48</b>	<b>0,93/1,59</b>	1,04/1,16	+	Azalma	İlerleyici hastalık
10	-	<b>1,05/1,54</b>	-	+	Artış	İlerleyici hastalık
1	<b>1/1,61</b>	<b>1,2/2,73</b>	<b>1,19/1,49</b>	+	Referans aralığında	P
3	<b>1,12/1,96</b>	1,09/1,24	<b>1,64/1,08</b>	+	Referans aralığında	P
4	<b>1,36/2,75</b>	1,27/1,28	<b>1,58/1,15</b>	+	Referans aralığında	P
8	1/1,09	0,92/1,15	<b>0,83/1,73</b>	+	Artış	P
11	1/0,66	0,73/1,04	<b>5,65/5,24</b>	+	Referans aralığında	P
12	0,99/1	<b>1,58/1,7</b>	1,07/1,35	+	Referans aralığında	P
13	1,25/1,38	1,23/1,06	1,13/1,29	-	Artış	P
14	0,78/0,8	1,09/0,98	0,85/1,09	-	Referans aralığında	P
15	0,97/0,88	0,99/1,08	0,66/0,7	-	Referans aralığında	P
16	0,74/0,99	<b>2,09/1,41</b>	-	+	Azalma	P
17	<b>1,31/1,44</b>	1,25/0,95	-	-	Referans aralığında	P

**Tablo 11 .** Kolorektal kanser hastalarında serum M30 ve M65 düzeylerinin tedavi sırasındaki değişimi

<sup>a</sup> P: Progresyonsuz

<sup>a</sup> Üç kürde M30/M65'deki değişim (tepe düzeyin tedaviden önceki düzeye bölünmesiyle elde edilir). Boş bölgeler, bir defadan fazla serum elde edilemeyen kürlerdir.

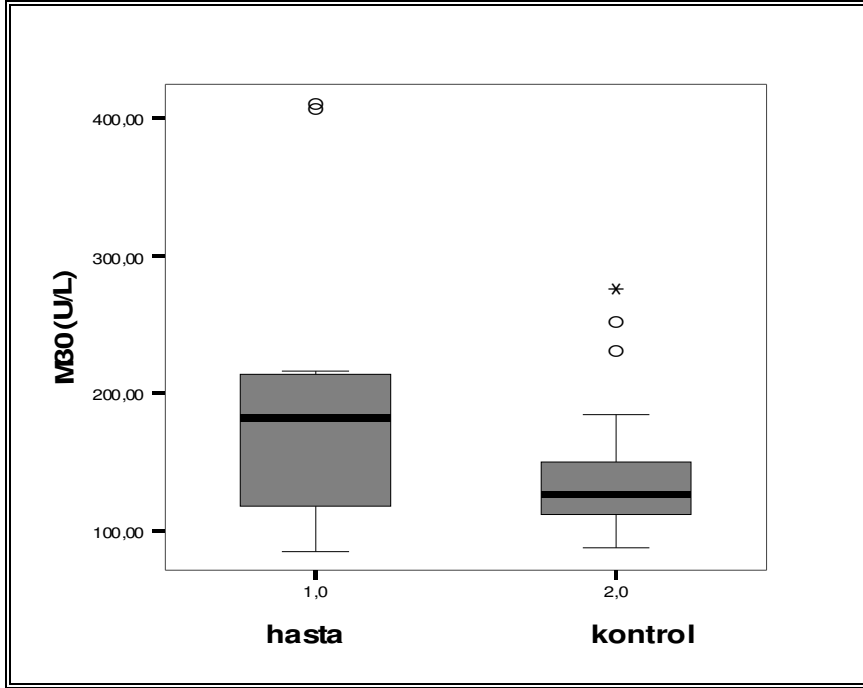
<sup>b</sup> CK18 cevabı veren hasta: M30 veya M65'de en az bir kürde 1,4 kat artış.

<sup>c</sup> Kürler boyunca CEA düzeylerindeki değişim

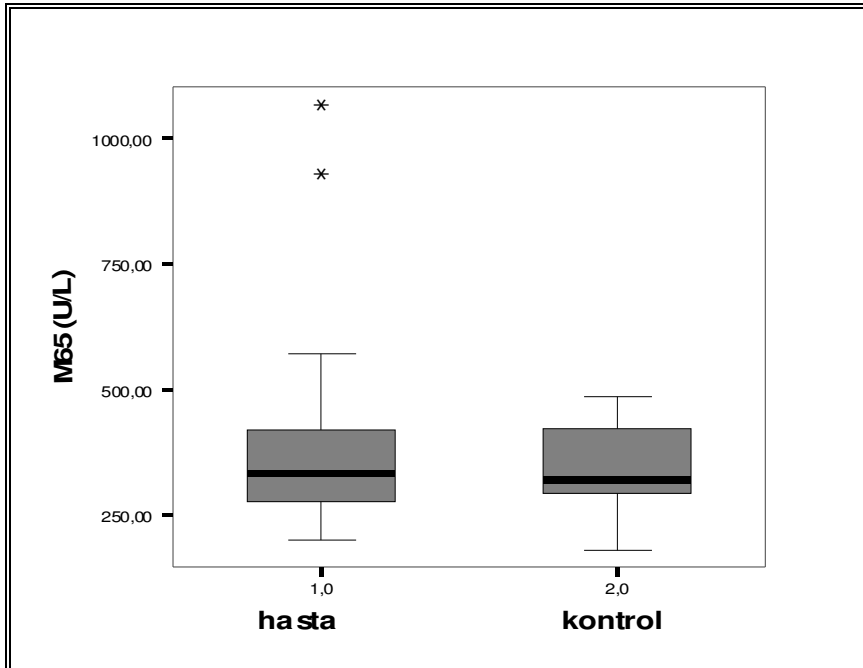


## **4.2. KONTROL GRUBUNUN HASTA GRUBUYLA KARŞILAŞTIRILMASINA AİT BULGULAR**

Kontrol grubu ile hastalarda KT öncesi M30 ve M65 düzeyleri karşılaştırılmış ve anlamlı fark bulunmamıştır ( $p < 0,05$ ) (Tablo 12,13)(Grafik 9, 10).



**Grafik 9.** Kontrol ve hasta grubunda birinci KT'den önce serum M30 düzeyleri(\*,o:uç değerler)



**Grafik 10.** Kontrol ve hasta grubunda birinci KT'den önce serum M65 düzeyleri(\*:uç değerler)

Kontrol grubu ile hasta grubunun birinci KT'den 2 ve 14 gün sonraki M30 ve M65 düzeyleri karşılaştırıldığında, birinci kürden 14 gün sonraki M30 düzeylerinde hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Kontrol grubu ile hasta grubunun üçüncü KT'nin 0, 2 ve 14. gün M30 ve M65 düzeyleri karşılaştırıldığında, üçüncü kürden 2 gün sonraki M30 düzeylerinde hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmuştur( $p<0,05$ ) .

Kontrol grubu ile hasta grubunun altıncı KT'nin 0., 2. ve 14. gün M30 ve M65 düzeyleri karşılaştırıldığında, altıncı kürden 14 gün sonraki M30 düzeyleri ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ) .

Kontrol grubu ile KT alan hasta grubunun M65 düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 12,13).

Kür-Gün	Kontrol	1-0	1-2	1-14	3-0	3-2	3-14	6-0	6-2	6-14
<b>Ortalama±SD (U/L)</b>	144(±52)	188 (±94)	188(±87)	192(±78)	170(±68)	283(±227)	193(±100)	173(±48)	198(±86)	201(±40)
<b>Ortanca</b>	127	182	168	166	173	197	177	175	186	202,5
<b>Alt sınır-üst sınır</b>	88-277	85-412	86-410	122-410	76-333	76-852	90-482	92-256	94-444	136-255
<b>p</b>		<sup>a</sup> 0,141	<sup>b</sup> 0,05	<sup>c</sup> <b>0,02*</b>	<sup>d</sup> 0,17	<sup>b</sup> <b>0,04*</b>	<sup>c</sup> 0,15	<sup>d</sup> 0,13	<sup>b</sup> 0,17	<sup>c</sup> <b>0,01*</b>

**Tablo 12.** Hasta ve kontrol grubunda M30 düzeylerinin karşılaştırılması. Kür-Gün : Kemoterapi kürü- kan alım günü

\* Mann Whitney U testine göre p<0,05 düzeyinde anlamlı

<sup>a</sup> Hasta grubunun KT kürü öncesi M30 düzeyi ile kontrol grubunun M30 düzeyinin karşılaştırılması

<sup>b</sup> Hasta grubunun KT kürünün ikinci günündeki M30 düzeyi ile kontrol grubunun M30 düzeyinin karşılaştırılması

<sup>c</sup> Hasta grubunun KT kürünün 14. günündeki M30 düzeyi ile kontrol grubunun M30 düzeyinin karşılaştırılması

<sup>d</sup> Hasta grubunun KT küründen önceki M30 düzeyi ile kontrol grubunun M30 düzeyinin karşılaştırılması

Kür-Gün	Kontrol	1-0	1-2	1-14	3-0	3-2	3-14	6-0	6-2	6-14
<b>Ortalama±SD (U/L)</b>	340(±81)	338(±96)	484(±231)	388(±188)	359(±145)	477(±243)	407(±168)	343(±132)	401(±146)	335(±58)
<b>Ortanca</b>	318	329	455,5	311	341	456	357,5	297	363	333,5
<b>Alt sınır-üst sınır</b>	182-486	201-572	259-1059	182-821	193-774	157-977	219-844	184-558	238-774	260-431
<b>p</b>		<sup>a</sup> 0,73	<sup>b</sup> 0,08	<sup>c</sup> 0,82	<sup>d</sup> 0,63	<sup>b</sup> 0,13	<sup>c</sup> 0,35	<sup>d</sup> 0,8	<sup>b</sup> 0,28	<sup>c</sup> 0,8

**Tablo 13.** Hasta ve kontrol grubunda M65 düzeylerinin karşılaştırılması. Kür-Gün : Kemoterapi kürü- kan alım günü

\* Mann Whitney U testine göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı

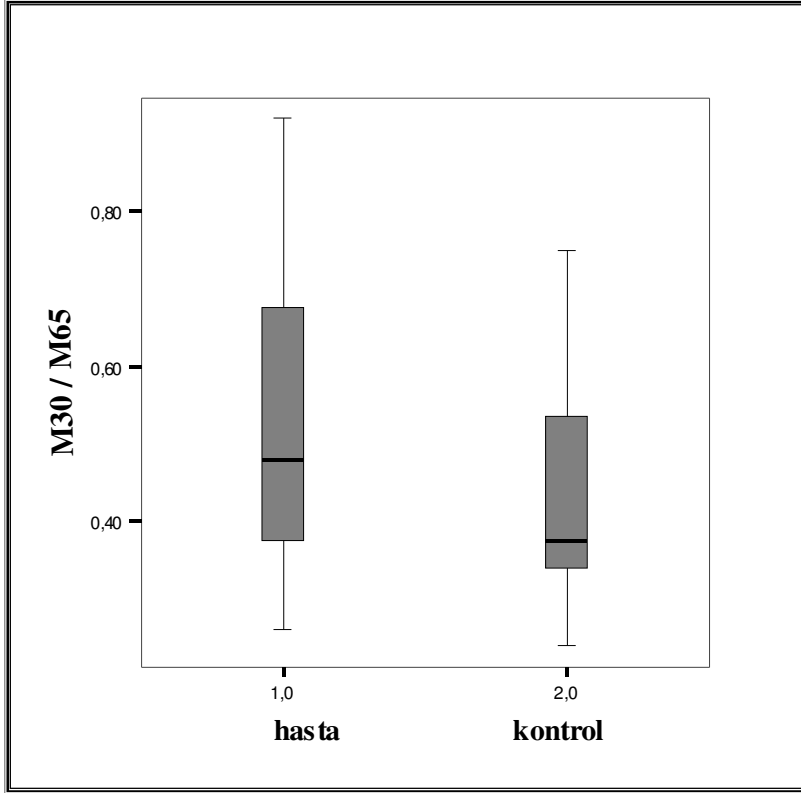
<sup>a</sup> Hasta grubunun KT kürü öncesi M65 düzeyi ile kontrol grubunun M65 düzeyinin karşılaştırılması

<sup>b</sup> Hasta grubunun KT kürünün ikinci günündeki M65 düzeyi ile kontrol grubunun M65 düzeyinin karşılaştırılması

<sup>c</sup> Hasta grubunun KT kürünün 14. günündeki M65 düzeyi ile kontrol grubunun M65 düzeyinin karşılaştırılması

<sup>d</sup> Hasta grubunun KT küründen önceki M65 düzeyi ile kontrol grubunun M65 düzeyinin karşılaştırılması

Hasta grubundaki bireylerde birinci KT'den önce M30/M65 oranı 0,26-0,92 aralığında, kontrol grubundaki bireylerde ise 0,24-0,75 aralığındadır (Grafik 11). Kontrol ve hasta grubu (birinci KT'den önce) karşılaştırıldığında M30/M65 oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ) (Mann Whitney U testi,  $p=0,166$ ).



**Grafik 11.** Birinci KT öncesi hasta ve kontrol grubu M30/M65 oranı

#### **4.3. HASTA GRUBUNDA M30'A AİT BULGULAR**

Hasta grubunda serum M30 düzeylerinin kürler-arası ve kür-içi değişimi  $p<0,05$  anlamlılık düzeyinde *nonparametrik* Wilcoxon işaretlenmiş sıralar testi kullanılarak karşılaştırıldı.

##### ***Kürler Arası:***

Hasta grubunun KT öncesi serum M30 düzeyleri ile; birinci, üçüncü ve altıncı KT kürlerinin sıfıncı, ikinci ve ondördüncü günlerindeki M30 düzeyleri karşılaştırıldığında; altıncı KT kürünün 14. günündeki M30 düzeyleri ile KT öncesi M30 düzeyleri arasında

anlamli fark saptandı (p= 0,027). Diğer kan alım günleri ile KT öncesi M30 düzeyleri arasında anlamli fark saptanmadı (p>0,05)(Tablo 14).

***Kür İçi:***

Hasta grubunun her bir KT kürü içinde M30 değişiminin istatistiksel anlamlılığı incelendiğinde; üçüncü ve altıncı KT kürlerinin sıfırıncı günleri ile ikinci günleri arasında anlamli fark saptanırken (p değerleri sırası ile 0,02 ve 0,03), diğer günler arasında kür-içi anlamli fark saptanmamıştır (p>0,05)(Tablo 15).

<b>Kür-Gün</b>	<b>1-0</b>	<b>1-2</b>	<b>1-14</b>	<b>3-0</b>	<b>3-2</b>	<b>3-14</b>	<b>6-0</b>	<b>6-2</b>	<b>6-14</b>
<b>Ortalama±SD (U/L)</b>	188(±94)	188(±87)	192(±78)	170(±68)	283(±227)	193(±100)	173(±48)	198(±86,4)	201(±40)
<b>Ortanca</b>	182	168	166	173	197	177	175	186	202,5
<b>Alt sınır-üst sınır</b>	85-412	86-410	122-410	76-333	76-852	90-482	92-256	94-444	136-255
<b>p</b>		<sup>a</sup> 0,57	<sup>b</sup> 0,90	<sup>c</sup> 0,42	<sup>a</sup> 0,24	<sup>b</sup> 0,39	<sup>c</sup> 0,22	<sup>a</sup> 0,8	<sup>b</sup> <b>0,027*</b>

**Tablo 14.** Hasta grubunda KT öncesi M30 düzeyi ile KT sonrası M30 düzeylerinin kürler-arası karşılaştırılması.

Kür-Gün: Kemoterapi kürü-kan alım günü

\* Wilcoxon işaretlenmiş sıralar testi ile  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlılık

<sup>a</sup> Hasta grubunda KT öncesi M30 düzeyi ile KT kürlerinin ikinci günündeki M30 düzeylerinin karşılaştırılması

<sup>b</sup> Hasta grubunda KT öncesi M30 düzeyi ile KT kürlerinin 14. günündeki M30 düzeylerinin karşılaştırılması

<sup>c</sup> Hasta grubunda KT öncesi M30 düzeyi ile üçüncü ve altıncı KT kürlerinin sıfırıncı günündeki M30 düzeylerinin karşılaştırılması

<b>Kür-Gün</b>	<b>1-0</b>	<b>1-2</b>	<b>1-14</b>	<b>3-0</b>	<b>3-2</b>	<b>3-14</b>	<b>6-0</b>	<b>6-2</b>	<b>6-14</b>
<b>Ortalama±SD (U/L)</b>	188(±94)	188(±87)	192(±78)	170(±68)	283(±227)	193(±100)	173(±48)	198(±86,4)	201(±40)
<b>Ortanca</b>	182	168	166	173	197	177	175	186	202,5
<b>Alt sınır-üst sınır</b>	85-412	86-410	122-410	76-333	76-852	90-482	92-256	94-444	136-255
<b>p</b>		<sup>a</sup> 0,57	<sup>b</sup> 0,90		<sup>a</sup> 0,02*	<sup>b</sup> 0,4		<sup>a</sup> 0,03*	<sup>b</sup> 0,24

**Tablo 15.** Hasta grubunda M30 düzeylerinin kür- içi karşılaştırılması. Kür-Gün: Kemoterapi kürü-kan alım günü

\* Wilcoxon işaretlenmiş sıralar testi ile  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlılık

<sup>a</sup> Hasta grubunda KT kürlerinin sıfıncı günündeki M30 düzeyleri ile ikinci günündeki M30 düzeylerinin karşılaştırılması

<sup>b</sup> Hasta grubunda KT kürlerinin sıfıncı günündeki M30 düzeyleri ile 14. günündeki M30 düzeylerinin karşılaştırılması



#### **4.4. HASTA GRUBUNDA M65'E AİT BULGULAR**

Hasta grubunda serum M65 düzeylerinin kürler-arası ve kür-içi değişimi  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde *nonparametrik* Wilcoxon işaretlenmiş sıralar testi kullanılarak karşılaştırıldı.

##### ***Kürler Arası:***

Hasta grubunun KT öncesi serum M65 düzeyleri ile; birinci, üçüncü ve altıncı KT kürlerinin sıfıncı, ikinci ve ondördüncü günlerindeki M65 düzeyleri karşılaştırıldığında; KT öncesi M65 düzeyleri ile altıncı KT kürünün ikinci günündeki M65 düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p=0,037$ ) (Tablo 16).

##### ***Kür İçi:***

Hasta grubunun her bir KT kürü içinde M65 değişiminin istatistiksel anlamlılığı incelendiğinde; üçüncü KT kürünün sıfıncı günü ile ikinci günü arasında anlamlı fark saptanırken ( $p=0,019$ ), diğer günler arasında kür-içi anlamlı fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ) (Tablo 17).

<b>Kür-Gün</b>	<b>1-0</b>	<b>1-2</b>	<b>1-14</b>	<b>3-0</b>	<b>3-2</b>	<b>3-14</b>	<b>6-0</b>	<b>6-2</b>	<b>6-14</b>
<b>Ortalama±SD (U/L)</b>	338(±96)	484(±231)	388(±188)	359(±145)	477(±243)	407(±168)	343(±132)	401(±146)	335(±58)
<b>Ortanca</b>	329	455,5	311	341	456	357,5	297	363	333,5
<b>Alt sınır-üst sınır</b>	201-572	259-1059	182-821	193-774	157-977	219-844	184-558	238-774	260-431
<b>p</b>		<sup>a</sup> 0,1	<sup>b</sup> 0,5	<sup>c</sup> 0,9	<sup>a</sup> 0,08	<sup>b</sup> 0,5	<sup>c</sup> 1,09	<sup>a</sup> <b>0,037</b> *	<sup>b</sup> 0,22

**Tablo 16.** Hasta grubunda KT öncesi ile KT sonrası M65 düzeylerinin kürler-arası karşılaştırılması.

Kür-Gün: Kemoterapi kür sayısı-kan alım günü

\* Wilcoxon işaretlenmiş sıralar testi ile  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlılık

<sup>a</sup> Hasta grubunda KT öncesi M65 düzeyi ile KT kürlerinin ikinci günündeki M65 düzeylerinin karşılaştırılması

<sup>b</sup> Hasta grubunda KT öncesi M65 düzeyi ile KT kürlerinin 14. günündeki M65 düzeylerinin karşılaştırılması

<sup>c</sup> Hasta grubunda KT öncesi M65 düzeyi ile üçüncü ve altıncı KT kürlerinin sıfırıncı günündeki M65 düzeylerinin karşılaştırılması

Kür-Gün	1-0	1-2	1-14	3-0	3-2	3-14	6-0	6-2	6-14
<b>Ortalama±SD (U/L)</b>	338(±96)	484(±231)	388(±188)	359(±145)	477(±243)	407(±168)	343(±132)	401(±146)	335(±58)
<b>Ortanca</b>	329	455,5	311	341	456	357,5	297	363	333,5
<b>Alt sınır-üst sınır</b>	201-572	259-1059	182-821	193-774	157-977	219-844	184-558	238-774	260-431
<b>p</b>		<sup>a</sup> 0,1	<sup>b</sup> 0,5		<sup>a</sup> <b>0,019*</b>	<sup>b</sup> 0,5		<sup>a</sup> 0,09	<sup>b</sup> 0,07

**Tablo 17.** Hasta grubunda M65 düzeylerinin kür- içi karşılaştırılması. Kür-Gün: Kemoterapi kür sayısı-kan alım günü

\* Wilcoxon işaretlenmiş sıralar testi ile  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlılık

<sup>a</sup> Hasta grubunda KT kürlerinin sıfıncı günündeki M65 düzeyleri ile ikinci günündeki M65 düzeylerinin karşılaştırılması

<sup>b</sup> Hasta grubunda KT kürlerinin sıfıncı günündeki M65 düzeyleri ile 14. günündeki M65 düzeylerinin karşılaştırılması

#### **4.5. KARSİNOEMBRYONİK ANTİJEN İLE İLGİLİ BULGULAR**

Hasta grubunda KT öncesi serum CEA düzeyleri ile üçüncü ve altıncı KT'den 14 gün sonraki serum CEA düzeyleri  $p<0,05$  anlamlılık düzeyinde nonparametrik Wilcoxon işaretlenmiş sıralar testi kullanılarak karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 18).

<b>CEA (ng/mL)</b>	<b>Kemoterapi öncesi</b>	<b>Üçüncü kür 14.gün</b>	<b>Altıncı kür 14. gün</b>
<b>Ortalama±SD</b>	6,51 (±13,1)	4,76 (±4,26)	8,2 (±12,6)
<b>Ortanca</b>	2,1	2,67	3,01
<b>Alt sınır-üst sınır</b>	(0,44-39,1)	(1,48-16)	0,44-40,6
<b>p</b>	<sup>a</sup> 0,73	<sup>b</sup> 0,77	<sup>c</sup> 0,91

**Tablo 18.** Hasta grubunda KT öncesi serum CEA düzeyleri ile üçüncü ve altıncı KT sonrası serum CEA düzeylerinin karşılaştırılması

\* Wilcoxon işaretlenmiş sıralar testi ile  $p<0,05$  düzeyinde anlamlılık

<sup>a</sup> KT'den önceki CEA düzeyi ile üçüncü KT'den 14 gün sonraki CEA düzeyinin karşılaştırılması

<sup>b</sup> Üçüncü KT 'den 14 gün sonraki CEA düzeyi ile altıncı KT'den 14 gün sonraki CEA düzeyinin karşılaştırılması

<sup>c</sup> KT'den önceki CEA düzeyi ile altıncı KT'den 14 gün sonraki CEA düzeyinin karşılaştırılması

#### **4.6. KORELASYON ANALİZLERİ**

Hasta grubunda rutin olarak KT öncesi, üçüncü KT'nin 14.günü ve altıncı KT'nin 14.gününde saptanan CEA düzeyleri ile KT süresince saptanan M30 ve M65 düzeyleri arasındaki ilişki  $p<0,05$  anlamlılık düzeyinde spearman korelasyon testi ile incelendi. Belirtilen günlerdeki CK18 (M30/M65) düzeyleri ile CEA düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı (Tablo 19,20).

Kür-Gün		CEA (ng/mL)
1-0	r	0,05
	p	0,83
3-14	r	-0,11
	p	0,69
6-14	r	-0,14
	p	0,78

**Tablo 19.** Hastalarda serum CEA düzeyleri ile M30 düzeyleri (U/L) arasındaki korelasyon ( r : korelasyon katsayısı). Kür-Gün : KT kürü - kan alım günü

\* Spearman korelasyon testi ile  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlılık

Kür-Gün		CEA (ng/mL)
1-0	r	-0,29
	p	0,28
3-14	r	0,10
	p	0,71
6-14	r	0,77
	p	0,07

**Tablo 20.** Hastalarda serum CEA düzeyleri ile M65 düzeyleri (U/L) arasındaki korelasyon ( r : korelasyon katsayısı). Kür-Gün : KT kürü - kan alım günü

\* Spearman korelasyon testi ile  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlılık

---

---

## BEŞİNCİ BÖLÜM

---

---

### **5.TARTIŞMA ve SONUC**

Günümüzde kanser hastasının tedavisi sırasında ölen tümör hücrelerinden salınan makromoleküllerin serumda ölçülmesi, uygulanan tedavinin etkinliğinin izlenmesini sağlayan etkin ve ucuz bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Hücre iskeletinin yapısındaki filamentlerden olan tip I ve tip II sitokeratinler, hem normal hem de transforme epitel hücrelerinde bulunan ve çoğu kanser çeşidinde eksprese olan proteinlerdir<sup>1</sup>. Sitokeratin 8, 18 ve 19 meme, prostat, akciğer, karaciğer, over ve kolonu da kapsayan birçok kanser hücresi tarafından eksprese edilmektedir<sup>1,111</sup>. Epitelial malignansisi olan hastalarda tümör hücrelerinden salınan sitokeratinlerin klinik progresyonu değerlendirmek için faydalı serum tümör belirteçleri olduğu düşünülmektedir<sup>1</sup>. Apoptotik hücre ölümünü gösteren sitokeratinlerin M30 fraksiyonu ile toplam hücre ölümünü gösteren M65 fraksiyonunun oranı hücrenin hücre ölüm şeklini (apoptotik/nekrotik) yansıtmaktadır. Bugüne kadar CK18'in meme, prostat, akciğer, karaciğer kanser hastalarındaki önemini saptamak amacıyla çalışmalar yapılmış olmasına rağmen kolorektal kanserdeki önemi henüz araştırılmamıştır.

Kolorektal kanser hastalarında CEA ile CK18'in tedavi etkinliğini değerlendirmedeki gücünü karşılaştıran bugüne kadar yayınlanmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, kolorektal kanser hastalarının KT kürleri sırasında M30, M65 ve CEA düzeyleri, herhangi bir hastalığı olmayan bireylerden oluşan kontrol grubunda ise M30 ve M65 düzeyleri ölçüldü. Hasta grubunu oluşturmakta pek çok zorlukla karşılaşıldığı için çalışmamızda hasta grubu 17 birey ile sınırlı kalmıştır. Hasta grubumuzda altı birey neoadjuvan, 11 birey adjuvan KT aldı. Neoadjuvan KT alan altı hasta KT sonunda RECIST kriterlerine göre değerlendirildiğinde üçü kısmi yanıt, üçü ilerleyici hastalık olarak değerlendirildi. Kemoterapi kürleri sırasında M30 veya M65'de saptanan 1,4 katlık artış, yükselme lehine değerlendirildi. Belirlenen günlerde alınan örneklerde saptanan M30, M65 ve CEA düzeyleri radyolojik değerlendirme ile birlikte yorumlandı.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; hastalarda KT'ye başlamadan önce saptanan CK18 (M30/M65) düzeylerinin, bir kısım hastada tedavi boyunca yükselme gösterirken, bir kısım hastada bazı günlerde düşme gösterdiği belirlendi. Hastaların tedavileri sırasında M65 düzeylerinin (altıncı, yedinci ve onyedinci hastalar), M30 düzeylerinin (sekizinci, dokuzuncu ve onikinci hastalar), bazı hastalarda ise (onbirinci, ondördüncü ve onbeşinci hastalar) hem M30 hem de M65 düzeylerinin düşüş gösterdiği gözlenmiştir. Çalışmamızda hasta grubundaki bireylerde birinci KTden önce M30/M65 oranı 0,26-0,92 aralığında, kontrol grubundaki bireylerde ise 0,24-0,75 aralığında idi. Tüm hasta grubu göz önüne alındığında M30/M65 oranı bireyler arasında büyük farklılık göstermekteydi. Kramer ve arkadaşlarının çalışmasında<sup>61</sup>. KT alan 25 prostat kanser hastasının serum CK 18 düzeyleri ölçülmüş ve M30, M65 düzeylerinin hastadan hastaya farklılık gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda prostat kanserli hastalarda saptanan serum M65 düzeyindeki artışa her zaman M30'daki artışın eşlik etmediği belirlenmiştir. Aynı çalışmada, endometrium kanser hastalarında tümör dokusuna yakın bölgeden alınan kanda M30/M65 oranının bireyler arasında farklılık gösterdiği doğrulanmıştır<sup>61</sup>. Çalışmamızda kolorektal kanser hastalarının M30/M65 değerlerinde bulunan bireysel farklılığın Kramer ve arkadaşlarının prostat kanserli hastalarda belirlemiş olduğu bireysel farklılıklar ile aynı nedenlere bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Antikanser ilaçların sitotoksik etkilerini araştırmak üzere yapılan in-vitro çalışmalarda elde edilen veriler, anti-kanser ilaçların hücre ölümünü apoptotik mekanizma ile sağladığını göstermesine karşın aynı ilaçlarla yapılan in-vivo çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilememiştir<sup>112</sup>. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, tedavi sırasında apoptozun her zaman kolorektal kanser dokusundaki baskın hücre ölüm tipi olmadığını göstermektedir. Bu yüzden de sadece apoptozun değil, total hücre ölümünün de izlenmesi gerekmektedir<sup>61</sup>. Hücre ATP üretiminin yetersiz olduğu durumlarda hücrelerin apoptoz yerine nekroza gittiği kanıtlanmıştır<sup>113,114</sup>. Bu durumda, hastalarda bulunan düşük M30/M65 oranlarının tümör hipoksisine bağlı olabileceği düşünülebilir. Tümör hipoksisi tedavi direnciyle ilişkilidir<sup>115,116</sup>. Bu açıdan tedavi öncesi CK 18 düzeylerinin bilinmesi ve tedavi sırasında CK18 düzeylerinin değişiminin izlenmesi, tedaviye direnci izlemek veya belirlemek amacıyla CK 18'in kullanılabilme potansiyelini yansıtmaktadır. Gelecekte hipoksik şartlar uygulanarak yapılacak çalışmaların hipoksi ile M30/M65 oranı arasındaki ilişkiyi açıklayabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada 17 kolorektal kanser hastasında KT kürleri boyunca serumda M30 ve M65 düzeyleri izlendi. On hastada (1-4, 6-10, 17. hastalar) M65'deki artışa her zaman apoptoz-spesifik M30 artışı eşlik etmemiştir. Yedi hastada (5, 11-16. hastalar) ise apoptoz ve toplam

hücre ölümü aynı miktarda olmasa bile genelde aynı günlerde artış göstermiştir. Birçok hastada toplam hücre ölümünün artış gösterdiği günlerde apoptozun aynı oranda artmadığı ve baskın hücre ölüm tipinin apoptoz dışındaki hücre ölüm yolları olduğu saptandı. Nitekim hastalarda tedavi sırasında toplam hücre ölümünün en fazla olduğu günde apoptoz yüzdesi hesaplandığında baskın olan hücre ölüm tipinin apoptoz dışı yollar olduğu görülmektedir (Grafik 8). Elde ettiğimiz veriler apoptozun kanser hücrelerinde esas hücre ölüm yolu olmadığını düşündürmektedir. Bu yönü ile çalışmamız apoptozu tümör biyopsilerinde tedavi etkinliğini değerlendirmek için en önemli biyolojik belirteç olarak belirlemiş olan çalışmalarını desteklememektedir<sup>117,118</sup>. Bu çalışmalarda tümör biyopsisinin incelenmesi ile tümörün kemoterapötik ajana erken dönemde vermiş olduğu yanıt belirlenmiş olabilir ancak kemoterapötik ajanın bir süre sonraki etkisinin hipoksi etkisi ile birleşerek apoptotik etkiyi nekroza dönüştürebileceğini öngörmekteyiz. Seruma salınan sitokeratinler hücre ölümünün sonuçlanmasından sonraki evreyi yansıttığı için serumda saptanan CK 18'in apoptotik etkinin geç fazını veya nekrotik hücre ölümünü saptadığını düşünmekteyiz.

Bu çalışmada RECIST kriterlerine göre, neoadjuvan KT alan altı hastadan üçü tedaviye kısmi yanıt vermiştir. Kısmi yanıt veren bu üç hastanın M30 ve M65 düzeylerinde de artış saptanmıştır. Karsinoembriyonik antijen düzeyleri bu hastaların birinde değişmezken, birinde artış, birinde düşüş göstermiştir. Kısmi yanıt veren hastalarda CK 18 artışlarının birinci kürden itibaren başladığı üçüncü kürde maksimum değere ulaştığı saptanmıştır. Hasta sayısı kısıtlı olmasına karşın elde edilen verilere göre, kısmi yanıt veren hastalarda CK 18'in CEA'dan üstün olduğu düşünülmektedir.

RECIST kriterlerine göre neoadjuvan KT alan altı hastadan üçü KT sonrası ilerleyici hastalık olarak değerlendirilmiştir. Bu hastaların birinde üçüncü kürde M30 ve M65 düzeylerinde artış, ikisinde sadece M65'de artış saptanırken bu hastaların ikisinde CEA düzeylerinde düşüş saptandı. Neoadjuvan KT alan hasta grubumuzda CK 18'in artış göstermesi (M30 veya M65) ilerleyici hastalığın izlenmesinde CK 18'in CEA'dan üstün olabileceğini desteklemektedir. M30 düzeylerinin kısmi yanıt veren hastalarda üçüncü kürde artış göstermesi, ilerleyici hastalıkta artış göstermemesi; M30'un neoadjuvan tedavi alan kolon kanserli hastalarda erken yanıt izleminde CEA'dan daha duyarlı bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Onbir progresyonsuz hastanın sekizinde M30 ve M65 düzeylerinin birinci kürden itibaren kademeli olarak artış gösterdiği ve altıncı kürün sonunda yaklaşık üç kat arttığı, bu hastaların sadece üçünde CEA düzeylerinin arttığı saptandı. Progresyonsuz hastaların üçünde ise M30 ve



M65 düzeylerinde artış görülmezken sadece bir hastanın CEA düzeylerinde artış saptandı. Tümör dokusu bulunmayan progresyonsuz hastalarda M30 ve M65 düzeylerinin KT kürünün son evresinde (altıncı kür) yükselme göstermesinin, KT'nin çevre dokularda oluşturduğu etkilerin sonucu olduğunu öngörmekteyiz. Tümör dokusu bulunan neoadjuvan KT alan hastalarda ise KT'nin daha erken döneminde (üçüncü kür) CK 18'in yanıt vermesi, tümör dokusunun KT'ye yanıtını izlemede CK 18'in CEA'dan daha üstün bir parametre olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada kontrol grubu ile kolorektal kanserli hasta grubu karşılaştırıldığında, hastaların KT öncesi M30 ve M65 düzeyleri ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Ueno ve arkadaşlarının 82 sağlıklı gönüllü ve 201 meme kanser hastasıyla yaptığı çalışmada<sup>120</sup> meme kanser hastalarının serum M30 düzeylerinin sağlıklı bireylerden yüksek olduğu saptanmıştır. Ueno ve arkadaşları, klinik olarak durumu daha kötü olan hastaların M30 antijen düzeylerini diğer hastalara kıyasla daha yüksek bulmuşlardır<sup>119</sup>. Kramer ve arkadaşlarının yayınlanmamış çalışmalarında ise<sup>61</sup> karaciğer ve akciğer kanser hastalarında serum M30 düzeylerinin sağlıklı bireylerden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar meme, karaciğer, akciğer tümör hücrelerinde spontan apoptoz olduğunu göstermektedir. Kolorektal kanser hastalarında ise serum M30 düzeylerini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda sağlıklı bireylerle kolorektal kanser hastalarının serum M30 ve M65 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ancak hasta sayısı artırıldığı takdirde bu iki grup arasında anlamlı fark bulunabileceği düşünülmektedir (Grafik 1,2). Hasta ve kontrol gruplarımızın sayıca yetersizliğinden dolayı daha güçlü bir istatistiksel analiz yapabilmek mümkün olamamıştır.

Hastaların KT öncesi CK18 düzeyleri ile kontrol grubunun CK 18 düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamasına karşın KT alan hastaların, birinci kürden 14 gün sonraki ve üçüncü kürden iki gün sonraki M30 düzeyleri ile kontrol grubunun M30 düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmıştır. Ayrıca altıncı kürden 14 gün sonraki M30 düzeyleri ile kontrol grubuna ait M30 düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmuştur. Kontrol grubu ile KT alan hastaların M65 düzeylerinde anlamlı fark saptanmamıştır. Kontrol grubu ile KT alan hastalar karşılaştırıldığında bulunan CK 18 (M30) artışları, CK18'in hücre ölümünü yansıtan bir parametre olduğunu desteklemektedir.

Hastaların KT öncesi ile KT sırasındaki M30 ve M65 düzeyleri karşılaştırıldığında, hastalarda altı kürlük KT'den sonra, KT öncesine göre hem apoptoz, hem de toplam hücre ölümünün istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır. Üçüncü KT öncesi ile üçüncü kürün ikinci

gününde saptanan M30 ve M65 düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, hasta grubumuzda CK 18'in üçüncü KT küründe hücre ölümünü yansıtan bir yanıt verdiği ve klinisyene altı kürlük KT tedavisinin erken döneminde fikir verebilme potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir.

Hasta grubunda KT öncesi serum CEA düzeyleri ile üçüncü ve altıncı KT'den 14 gün sonraki serum CEA düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Hasta grubunda tedaviye yanıt verenler ve vermeyenler arasında serum CEA düzeyleri incelendiğinde yüzde değişim açısından anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Bu açıdan da CK 18'in şu anda izlemde kullanılan CEA'dan daha üstün bir izlem belirteci olabileceğini savunmaktayız.

Sonuç olarak; kısıtlı sayıda hasta ile gerçekleştirebildiğimiz bu çalışmada özellikle neoadjuvan tedavi alan kolorektal kanserli hastalarda CK 18 M30'un erken yanıt izleminde CEA'dan daha duyarlı bir belirteç olabileceğini düşünmekteyiz. Bunun yanı sıra, kolorektal kanserli hastalarda serum CK 18 düzeyi ile ilgili yayınlanmış bir çalışma bulunmaması nedeniyle çalışmamızın hasta sayısının artırılması ile güçlendirilmesi gerektiğini ancak bu çalışmanın yapılacak daha geniş çaplı çalışmalara temel oluşturacağını düşünmekteyiz.

---

---

## ALTINCI BÖLÜM

---

---

### 6. KAYNAKLAR

- 1.Linder S, Havelka Am, Ueno T, Shoshan Mc. Determining Tumor Apoptosis And Necrosis In Patient Serum Using Cytokeratin 18 As A Biomarker. *Cancer Lett* 2004;214:1-9.
- 2.Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T ve ark. Cancer Statistics, 2007. *Ca Cancer J Clin* 2007;57:43-66.
3. Sayek İ., 2000, Temel Cerrahi, 1169-89, Güneş Kitabevi Ltd.Şti, İstanbul
- 4.Chien Cc, Chen Sh, Liu Cc, Lee Cl ve ark. Correlation Of K-Ras Codon 12 Mutations In Human Feces And Ages Of Patients With Colorectal Cancer . *Transl Res* 2007;149:96-102.
- 5.Yamada K, Yoshitake K, Sato M, Ahnen Dj. Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression In Normal, Preneoplastic And Neoplastic Colonic Epithelium Of The Rat. *Gastroenterology* 1992;103:160-7.
- 6.Wright Na. Epithelial Stem Cell Repertoire In The Gut: Clues To The Origin Of Cell Lineages, Proliferative Units And Cancer. *Int J Exp Pathol* 2000;81:117-43.
- 7.Bufill Ja. Colorectal Cancer Genetics. Closing The Gap Between Genotype And Phenotype. *Cancer* 1995;76:2389-92.
- 8.Franco A, Sikalidis Ak, Solis Herruzo Ja. Colorectal Cancer: Influence Of Diet And Lifestyle Factors. *Rev Esp Enferm Dig* 2005;97:432-48.
- 9.Loftus Ev, Jr. Epidemiology And Risk Factors For Colorectal Dysplasia And Cancer In Ulcerative Colitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2006;35:517-31.
- 10.Petrelli Nj, Barcewicz Pa, Evans Jt, Ledesma Ej ve ark. Hepatic Artery Ligation For Liver Metastasis In Colorectal Carcinoma. *Cancer* 1984;53:1347-53.
11. Katzung B.G., Salmon S.E., Sartorelli E.C., 1992, Basic & Clinical Pharmacology, 766-801, Appleton&Lange, Lebanon.
- 12.Thirion P, Michiels S, Pignon Jp, Buyse M ve ark. Modulation Of Fluorouracil By Leucovorin In Patients With Advanced Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis. *J Clin Oncol* 2004;22:3766-75.

13. Grothey A, Sargent D, Goldberg Rm, Schmoll Hj. Survival Of Patients With Advanced Colorectal Cancer Improves With The Availability Of Fluorouracil-Leucovorin, Irinotecan, And Oxaliplatin In The Course Of Treatment. *J Clin Oncol* 2004;22:1209-14.
14. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A ve ark. Cancer Statistics, 2003. *Ca Cancer J Clin* 2003;53:5-26.
15. Sobrero A, Guglielmi A, Grossi F, Puglisi F ve ark. Mechanism Of Action Of Fluoropyrimidines: Relevance To The New Developments In Colorectal Cancer Chemotherapy. *Semin Oncol* 2000;27:72-7.
16. Kubota T, Watanabe M, Otani Y, Kitajima M, Fukushima M. Different Pathways Of 5-Fluorouracil Metabolism After Continuous Venous Or Bolus Injection In Patients With Colon Carcinoma: Possible Predictive Value Of Thymidylate Synthetase mRNA And Ribonucleotide Reductase For 5-Fluorouracil Sensitivity. *Anticancer Res* 2002;22:3537-40.
17. Petrelli N, Douglass Ho, Jr., Herrera L, Russell D ve ark. The Modulation Of Fluorouracil With Leucovorin In Metastatic Colorectal Carcinoma: A Prospective Randomized Phase II Trial. *Gastrointestinal Tumor Study Group. J Clin Oncol* 1989;7:1419-26.
18. De Gramont A, Vignoud J, Tournigand C, Louvet C ve ark. Oxaliplatin With High-Dose Leucovorin And 5-Fluorouracil 48-Hour Continuous Infusion In Pretreated Metastatic Colorectal Cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:214-9.
19. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N ve ark. Phase II Multicenter Randomized Trial Of Oxaliplatin Added To Chronomodulated Fluorouracil-Leucovorin As First-Line Treatment Of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:136-47.
20. Meng Xw, Lee Sh, Kaufmann Sh. Apoptosis In The Treatment Of Cancer: A Promise Kept? *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:668-76.
21. Kaufmann Sh, Gores Gj. Apoptosis In Cancer: Cause And Cure. *Bioessays* 2000;22:1007-17.
22. Fisher De. Apoptosis In Cancer Therapy: Crossing The Threshold. *Cell* 1994;78:539-42
23. Okada H, Mak Tw. Pathways Of Apoptotic And Non-Apoptotic Death In Tumour Cells. *Nat Rev Cancer* 2004;4:592-603.
24. Caulin C, Salvesen Gs, Oshima Rg. Caspase Cleavage Of Keratin 18 And Reorganization Of Intermediate Filaments During Epithelial Cell Apoptosis. *J Cell Biol* 1997;138:1379-94.
25. Woolfson K. Tumor Markers In Cancer Of The Colon And Rectum. *Dis Colon Rectum* 1991;34:506-11.

26. Von Kleist S, Hesse Y, Kananeh H. Comparative Evaluation Of Four Tumor Markers, Ca 242, Ca 19/9, TPA And CEA In Carcinomas Of The Colon. *Anticancer Res* 1996;16:2325-31.
27. Carpelan-Holmstrom Ma, Haglund Ch, Roberts Pj. Differences In Serum Tumor Markers Between Colon And Rectal Cancer. Comparison Of CA 242 And Carcinoembryonic Antigen. *Dis Colon Rectum* 1996;39:799-805.
28. Fletcher Rh. Carcinoembryonic Antigen. *Ann Intern Med* 1986;104:66-73.
29. Hostetter Rb, Augustus Lb, Mankarious R, Chi Kf ve ark. Carcinoembryonic Antigen As A Selective Enhancer Of Colorectal Cancer Metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:380-5.
30. Goldstein Mj, Mitchell Ep. Carcinoembryonic Antigen In The Staging And Follow-Up Of Patients With Colorectal Cancer. *Cancer Invest* 2005;23:338-51.
31. Duffy Mj. Carcinoembryonic Antigen As A Marker For Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful? *Clin Chem* 2001;47:624-30.
32. Zimmermann W, Weber B, Ortlieb B, Rudert F ve ark. Chromosomal Localization Of The Carcinoembryonic Antigen Gene Family And Differential Expression In Various Tumors. *Cancer Res* 1988;48:2550-4.
33. Fuks A, Banjo C, Shuster J, Freedman So ve ark. Carcinoembryonic Antigen (CEA): Molecular Biology And Clinical Significance. *Biochim Biophys Acta* 1975;417:123-52.
34. Koness Rj. Cea: Is It Of Value In Colorectal Cancer? *R I Med* 1995;78:164-6.
35. Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N ve ark. Carcinoembryonic Antigen, A Human Tumor Marker, Functions As An Intercellular Adhesion Molecule. *Cell* 1989;57:327-34.
36. Kammerer R, Von Kleist S. CEA Expression Of Colorectal Adenocarcinomas Is Correlated With Their Resistance Against Lak-Cell Lysis. *Int J Cancer* 1994;57:341-7.
37. Zimmermann W, Ortlieb B, Friedrich R, Von Kleist S. Isolation And Characterization Of cDNA Clones Encoding The Human Carcinoembryonic Antigen Reveal A Highly Conserved Repeating Structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2960-4.
38. Gold P, Shuster J, Freedman So. Carcinoembryonic Antigen (CEA) In Clinical Medicine: Historical Perspectives, Pitfalls And Projections. *Cancer* 1978;42:1399-405.
39. Hohenberger P, Schlag Pm, Gerneth T, Herfarth C. Pre- And Postoperative Carcinoembryonic Antigen Determinations In Hepatic Resection For Colorectal Metastases. Predictive Value And Implications For Adjuvant Treatment Based On Multivariate Analysis. *Ann Surg* 1994;219:135-43.

- 40.O'brien Mj, Zamcheck N, Burke B, Kirkham Se ve ark. Immunocytochemical Localization Of Carcinoembryonic Antigen In Benign And Malignant Colorectal Tissues. Assessment Of Diagnostic Value. *Am J Clin Pathol* 1981;75:283-90.
- 41.Zeng Z, Cohen Am, Urmacher C. Usefulness Of Carcinoembryonic Antigen Monitoring Despite Normal Preoperative Values In Node-Positive Colon Cancer Patients. *Dis Colon Rectum* 1993;36:1063-8.
- 42.Burtis C.A., Ashwood R.E.,Chan D.W., Sell S., 2005, Klinik Kimyada Temel İlkeler, 390-413, Palme Yayıncılık, Ankara.
- 43.Alexander Jc, Silverman Na, Chretien Pb. Effect Of Age And Cigarette Smoking On Carcinoembryonic Antigen Levels. *Jama* 1976;235:1975-9.
- 44.Tabuchi Y, Deguchi H, Imanishi K, Saitoh Y. Comparison Of Carcinoembryonic Antigen Levels Between Portal And Peripheral Blood In Patients With Colorectal Cancer. Correlation With Histopathologic Variables. *Cancer* 1987;59:1283-8.
- 45.Stangl R, Altendorf-Hofmann A, Chamley Rm, Scheele J. Factors Influencing The Natural History Of Colorectal Liver Metastases. *Lancet* 1994;343:1405-10.
- 46.Ladenson Jh, Mcdonald Jm, Landt M, Schwartz Mk. (Washington University Case Conference). Colorectal Carcinoma And Carcinoembryonic Antigen (CEA). *Clin Chem* 1980;26:1213-20.
- 47.Kim Jc, Gong G, Roh Sa, Park Kc. Carcinoembryonic Antigen Gene And Carcinoembryonic Antigen Expression In The Liver Metastasis Of Colorectal Carcinoma. *Mol Cells* 1999;9:133-7.
- 48.Slantz K, Senagore A, Hibbert J, Mazier Wp, Talbott Tm. Can Preoperative And Postoperative CEA Predict Survival After Colon Cancer Resection? *Am Surg* 1994;60:528-31; Discussion 31-2.
- 49.Sugarbaker Ph, Gianola Fj, Dwyer A, Neuman Nr. A Simplified Plan For Follow-Up Of Patients With Colon And Rectal Cancer Supported By Prospective Studies Of Laboratory And Radiologic Test Results. *Surgery* 1987;102:79-87.
- 50.Rocklin Ms, Senagore Aj, Talbott Tm. Role Of Carcinoembryonic Antigen And Liver Function Tests In The Detection Of Recurrent Colorectal Carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1991;34:794-7.
- 51.Mayer Rj, Garnick Mb, Steele Gd, Jr., Zamcheck N. Carcinoembryonic Antigen (CEA) As A Monitor Of Chemotherapy In Disseminated Colorectal Cancer. *Cancer* 1978;42:1428-33.
- 52.Allen-Mersh Tg. Serum CEA In The Follow-Up Of Colorectal Carcinoma: Experience In A District General Hospital. *Ann R Coll Surg Engl* 1984;66:14-6.

53. Graham Ra, Wang S, Catalano Pj, Haller Dg. Postsurgical Surveillance Of Colon Cancer: Preliminary Cost Analysis Of Physician Examination, Carcinoembryonic Antigen Testing, Chest X-Ray, And Colonoscopy. *Ann Surg* 1998;228:59-63.
54. Mccall JI, Black Rb, Rich Ca, Harvey Jr ve ark. The Value Of Serum Carcinoembryonic Antigen In Predicting Recurrent Disease Following Curative Resection Of Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum* 1994;37:875-81.
55. Seregni E, Bombardieri E, Bogni A, Crippa F ve ark. The Role Of Serum Carcinoembryonic Antigen (CEA) In The Management Of Patients With Colorectal Carcinoma: The Experience Of The Istituto Tumori Of Milan. *Int J Biol Markers* 1992;7:167-70.
56. Berman Jm, Cheung Rj, Weinberg Ds. Surveillance After Colorectal Cancer Resection. *Lancet* 2000;355:395-9.
57. Boey J, Cheung Hc, Lai Ck, Wong J. A Prospective Evaluation Of Serum Carcinoembryonic Antigen (CEA) Levels In The Management Of Colorectal Carcinoma. *World J Surg* 1984;8:279-86.
58. Staab Hj, Anderer Fa, Hornung A, Stumpf E ve ark. Doubling Time Of Circulating CEA And Its Relation To Survival Of Patients With Recurrent Colorectal Cancer. *Br J Cancer* 1982;46:773-81.
59. Desch Ce, Benson Ab, Smith Tj, Flynn Pj ve ark. Recommended Colorectal Cancer Surveillance Guidelines By The American Society Of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 1999;17:1312.
60. Shani A, O'connell Mj, Moertel Cg, Schutt Aj ve ark. Serial Plasma Carcinoembryonic Antigen Measurements In The Management Of Metastatic Colorectal Carcinoma. *Ann Intern Med* 1978;88:627-30.
61. Kramer G, Erdal H, Mertens Hj, Nap M ve ark. Differentiation Between Cell Death Modes Using Measurements Of Different Soluble Forms Of Extracellular Cytokeratin 18. *Cancer Res* 2004;64:1751-6.
62. Sears Hf, Shen Jw, Herlyn M, Atkinson B ve ark. Circulating Tumor Markers And Assessment Of Response To Intrahepatic Chemotherapy Of Colon Carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1985;8:108-17.
63. Moertel Cg, Fleming Tr, Macdonald Js, Haller Dg ve ark. An Evaluation Of The Carcinoembryonic Antigen (CEA) Test For Monitoring Patients With Resected Colon Cancer. *Jama* 1993;270:943-7.

- 64.Kumar V., Cotran R.S., Robbins S.L.,1995, Temel Patoloji, 3-12, Yüce Yayım, İstanbul.
- 65.Hengartner Mo. The Biochemistry Of Apoptosis. Nature 2000;407:770-6.
- 66.Grimsley C, Ravichandran Ks. Cues For Apoptotic Cell Engulfment: Eat-Me, Don't Eat-Me And Come-Get-Me Signals. Trends Cell Biol 2003;13:648-56.
- 67.Stepien A, Izdebska M, Grzanka A. [The Types Of Cell Death]. Postepy Hig Med Dosw (Online) 2007;61:420-8.
- 68.Lorin S, Codogno P, Djavaheri-Mergny M. [Autophagy: A New Concept In Cancer Research]. Bull Cancer 2008;95:43-50.
- 69.Reggiori F, Klionsky Dj. Autophagosomes: Biogenesis From Scratch? Curr Opin Cell Biol 2005;17:415-22.
- 70.Uchiyama Y, Shibata M, Koike M, Yoshimura K ve ark. Autophagy-Physiology And Pathophysiology. Histochem Cell Biol 2008.
- 71.Sun.Menloschool.Org/~Cweaver/Cells/E/Lysosomes/.
- 72.Mansilla S, Bataller M, Portugal J. Mitotic Catastrophe As A Consequence Of Chemotherapy. Anticancer Agents Med Chem 2006;6:589-602.
- 73.Lossi L, Merighi A. In Vivo Cellular And Molecular Mechanisms Of Neuronal Apoptosis In The Mammalian Cns. Prog Neurobiol 2003;69:287-312.
- 74.Chang Hy, Yang X. Proteases For Cell Suicide: Functions And Regulation Of Caspases. Microbiol Mol Biol Rev 2000;64:821-46.
- 75.Ulukaya E., 2003, Biyokimya Ders Notları, 58-64, Bursa.
- 76.Troy Cm, Salvesen Gs. Caspases On The Brain. J Neurosci Res 2002;69:145-50.
- 77.Ueno T, Toi M, Linder S. Detection Of Epithelial Cell Death In The Body By Cytokeratin 18 Measurement. Biomed Pharmacother 2005;59 Suppl 2:S359-62.
- 78.Lazarides E. Intermediate Filaments As Mechanical Integrators Of Cellular Space. Nature 1980;283:249-56.
- 79.Ku No, Zhou X, Toivola Dm, Omary Mb. The Cytoskeleton Of Digestive Epithelia In Health And Disease. Am J Physiol 1999;277:G1108-37.
- 80..Fuchs E, Cleveland Dw. A Structural Scaffolding Of Intermediate Filaments In Health And Disease. Science 1998;279:514-9.
- 81.Herrmann H, Aebi U. Structure, Assembly, And Dynamics Of Intermediate Filaments. Subcell Biochem 1998;31:319-62.
- 82.Schutte B, Henfling M, Kolgen W, Bouman M ve ark. Keratin 8/18 Breakdown And Reorganization During Apoptosis. Exp Cell Res 2004;297:11-26.



83. Ditzel HJ, Strik MC, Larsen MK, Willis AC ve ark. Cancer-Associated Cleavage Of Cytokeratin 8/18 Heterotypic Complexes Exposes A Neoepitope In Human Adenocarcinomas. *J Biol Chem* 2002;277:21712-22.
84. Liao J, Omary MB. 14-3-3 Proteins Associate With Phosphorylated Simple Epithelial Keratins During Cell Cycle Progression And Act As A Solubility Cofactor. *J Cell Biol* 1996;133:345-57.
85. Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D. Keratin Modifications And Solubility Properties In Epithelial Cells And In Vitro. *Subcell Biochem* 1998;31:105-40.
86. Omary MB, Kno L, Liao J, Price D. Intermediate Filaments, *Subcellular Biochemistry Series: Plenum Publishing Co., 1998.*
87. Ku NO, Liao J, Omary MB. Apoptosis Generates Stable Fragments Of Human Type I Keratins. *J Biol Chem* 1997;272:33197-203.
88. Liao J, Ku NO, Omary MB. Stress, Apoptosis, And Mitosis Induce Phosphorylation Of Human Keratin 8 At Ser-73 In Tissues And Cultured Cells. *J Biol Chem* 1997;272:17565-73.
89. Oshima RG, Abrams L, Kulesh D. Activation Of An Intron Enhancer Within The Keratin 18 Gene By Expression Of C-Fos And C-Jun In Undifferentiated F9 Embryonal Carcinoma Cells. *Genes Dev* 1990;4:835-48.
90. Hendrix MJ, Seftor EA, Chu YW, Seftor RE ve ark. Coexpression Of Vimentin And Keratins By Human Melanoma Tumor Cells: Correlation With Invasive And Metastatic Potential. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:165-74.
91. Hembrough TA, Vasudevan J, Allietta MM, Glass WF ve ark. A Cytokeratin 8-Like Protein With Plasminogen-Binding Activity Is Present On The External Surfaces Of Hepatocytes, HepG2 Cells And Breast Carcinoma Cell Lines. *J Cell Sci* 1995;108 ( Pt 3):1071-82.
92. Wells MJ, Hatton MW, Hewlett B, Podor TJ ve ark. Cytokeratin 18 Is Expressed On The Hepatocyte Plasma Membrane Surface And Interacts With Thrombin-Antithrombin Complexes. *J Biol Chem* 1997;272:28574-81.
93. Fuchs E, Coulombe PA. Of Mice And Men: Genetic Skin Diseases Of Keratin. *Cell* 1992;69:899-902.
94. Stasiak PC, Purkis PE, Leigh IM, Lane EB. Keratin 19: Predicted Amino Acid Sequence And Broad Tissue Distribution Suggest It Evolved From Keratinocyte Keratins. *J Invest Dermatol* 1989;92:707-16.
95. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B ve ark. The Catalog Of Human Cytokeratins: Patterns Of Expression In Normal Epithelia, Tumors And Cultured Cells. *Cell* 1982;31:11-24.

- 96.Holubec H, Payne Cm, Bernstein H, Dvorakova K ve ark. Assessment Of Apoptosis By Immunohistochemical Markers Compared To Cellular Morphology In Ex Vivo-Stressed Colonic Mucosa. *J Histochem Cytochem* 2005;53:229-35.
- 97.Oshima Rg. Apoptosis And Keratin Intermediate Filaments. *Cell Death Differ* 2002;9:486-92.
- 98.Stegh Ah, Herrmann H, Lampel S, Weisenberger D ve ark. Identification Of The Cytolinker Plectin As A Major Early In Vivo Substrate For Caspase 8 During Cd95- And Tumor Necrosis Factor Receptor-Mediated Apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000;20:5665-79.
- 99.Van Engeland M, Kuijpers Hj, Ramaekers Fc, Reutelingsperger Cp, Schutte B. Plasma Membrane Alterations And Cytoskeletal Changes In Apoptosis. *Exp Cell Res* 1997;235:421-30.
- 100.Stegh Ah, Barnhart Bc, Volkland J, Algeciras-Schimmich A ve ark. Inactivation Of Caspase-8 On Mitochondria Of Bcl-Xl-Expressing Mcf7-Fas Cells: Role For The Bifunctional Apoptosis Regulator Protein. *J Biol Chem* 2002;277:4351-60.
- 101.Oberhammer Fa, Hohegger K, Froschl G, Tiefenbacher R ve ark. Chromatin Condensation During Apoptosis Is Accompanied By Degradation Of Lamin A+B, Without Enhanced Activation Of Cdc2 Kinase. *J Cell Biol* 1994;126:827-37.
- 102.Leers Mp, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T ve ark. Immunocytochemical Detection And Mapping Of A Cytokeratin 18 Neo-Epitope Exposed During Early Apoptosis. *J Pathol* 1999;187:567-72.
- 103.Gaarenstroom Kn, Kenter Gg, Bonfrer Jm, Korse Cm ve ark. Can Initial Serum Cyfra 21-1, Scc Antigen, And TPA Levels In Squamous Cell Cervical Cancer Predict Lymph Node Metastases Or Prognosis? *Gynecol Oncol* 2000;77:164-70.
- 104.Ku No, Omary Mb. Phosphorylation Of Human Keratin 8 In Vivo At Conserved Head Domain Serine 23 And At Epidermal Growth Factor-Stimulated Tail Domain Serine 431. *J Biol Chem* 1997;272:7556-64.
- 105.Pankov R, Umezawa A, Maki R, Der Cj ve ark. Oncogene Activation Of Human Keratin 18 Transcription Via The Ras Signal Transduction Pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:873-7.
- 106.Gion M, Boracchi P, Dittadi R, Biganzoli E ve ark. Quantitative Measurement Of Soluble Cytokeratin Fragments In Tissue Cytosol Of 599 Node Negative Breast Cancer Patients: A Prognostic Marker Possibly Associated With Apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 2000;59:211-21.

107. Sheard Ma, Vojtesek B, Simickova M, Valik D. Release Of Cytokeratin-18 And -19 Fragments (Tps And Cyfra 21-1) Into The Extracellular Space During Apoptosis. *J Cell Biochem* 2002;85:670-7.
108. Weber K, Osborn M, Moll R, Wiklund B ve ark. Tissue Polypeptide Antigen (TPA) Is Related To The Non-Epidermal Keratins 8, 18 And 19 Typical Of Simple And Non-Squamous Epithelia: Re-Evaluation Of A Human Tumor Marker. *Embo J* 1984;3:2707-14.
109. Burtis C.A., Ashwood R.E., Moss D.W., Henderson R., 2005, *Klinik Kimyada Temel İlkeler*, 157-176, Palme Yayıncılık, Ankara.
110. Burtis C.A., Ashwood R.E., Kricka L., 2005, *Klinik Kimyada Temel İlkeler*, 177-194, Palme Yayıncılık, Ankara.
111. Olofsson Mh, Ueno T, Pan Y, Xu R ve ark. Cytokeratin-18 Is A Useful Serum Biomarker For Early Determination Of Response Of Breast Carcinomas To Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007;13:3198-206.
112. Kaufmann Sh, Vaux Dl. Alterations In The Apoptotic Machinery And Their Potential Role In Anticancer Drug Resistance. *Oncogene* 2003;22:7414-30.
113. Leist M, Single B, Castoldi Af, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch In The Decision Between Apoptosis And Necrosis. *J Exp Med* 1997;185:1481-6.
114. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP Levels Determine Cell Death Fate By Apoptosis Or Necrosis. *Cancer Res* 1997;57:1835-40.
115. Teicher Ba. Hypoxia And Drug Resistance. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13:139-68.
116. Vaupel P, Kelleher Dk, Hockel M. Oxygen Status Of Malignant Tumors: Pathogenesis Of Hypoxia And Significance For Tumor Therapy. *Semin Oncol* 2001;28:29-35.
117. Yuki H, Fujimura M, Yamakawa Y, Hidaka T, Saito S. Detection Of Apoptosis And Expression Of Apoptosis-Associated Proteins As Early Predictors Of Prognosis After Irradiation Therapy In Stage Iııb Uterine Cervical Cancer. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:127-34.
118. Sultana H, Kigawa J, Kanamori Y, Itamochi H ve ark. Chemosensitivity And p53-Bax Pathway-Mediated Apoptosis In Patients With Uterine Cervical Cancer. *Ann Oncol* 2003;14:214-9.
119. Ueno T, Toi M, Biven K, Bando H ve ark. Measurement Of An Apoptotic Product In The Sera Of Breast Cancer Patients. *Eur J Cancer* 2003;39:769-74.

