

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLON KANSERLİ HASTALARDA İNTERLÖKİN-21 VE
İNTERLÖKİN-32 GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİ VE
METASTAZ İLİŞKİSİ**

Uzm. Biol. Gizem Övgü ÖNER

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2014**

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLON KANSERLİ HASTALARDA İNTERLÖKİN-21 VE
İNTERLÖKİN-32 GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİ VE
METASTAZ İLİŞKİSİ**

Uzm. Biol. Gizem Övgü ÖNER

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Emin KANSU**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Füsun ÖZMEN**

**ANKARA
2014**

Anabilim Dalı : **Temel Onkoloji**
 Program : **Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi**
 Tez Başlığı : **Kolon Kanserli Hastalarda IL-21 ve IL-32 Gen Ekspresyon
 Düzeyleri ve Metastaz İlişkisi**

Öğrenci Adı-Soyadı : **Gizem Övgü Erdem**
 Savunma Sınavı Tarihi : **06-06-2014**

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **Prof. Dr. A. Lale Doğan**
Hacettepe Üniversitesi

Tez danışmanı: **Prof. Dr. Emin Kansu**
Hacettepe Üniversitesi

Üye: **Prof. Dr. Dicle Güç**
Hacettepe Üniversitesi

Üye: **Doç. Dr. Güneş Esendağlı**
Hacettepe Üniversitesi

Üye: **Prof. Dr. Ayşegül Atak Yücel**
Gazi Üniversitesi

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


 Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans sürecimin her aşamasında bilgi ve tecrübesine her zaman ihtiyaç duyduğum, beni yüreklendiren tez danışmanım sayın Prof. Dr. Emin Kansu' ya gönülden teşekkür ederim.

İlgisini ve desteğini esirgmeden, deneyimini devamlı benimle paylaşan, sıkıştığım her an yanımda olan, akademik gelişmeye katkıda bulunan tez danışmanı olmanın haricinde benden manevi desteğini hiç esirgemeyen, zor zamanlarımda yanımda olan sevgili hocam, ikinci tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Füsün Özmen' e ve çalışmamızda doku örneklerimizi bize sağlayarak akademik desteğini hiç esirgemeyen, Genel Cerrahi AD öğretim üyesi sayın Prof. Dr. M. Mahir Özmen' e,

Pozitif enerjilerini hep üzerimde hissettiğim, motivasyonuma katkıda bulunan sevgili hocalarım Prof. Dr. Dicle Güç'e, Prof. Dr. Lale Doğan' a, Doç. Dr. Güneş Esendağlı ve Öğr.Gör.Dr.Hande Canpınar' a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarımda istatistiklerimize yardımcı olan Biyoistatistik Anabilim Dalı Araş. Gör. Dr. Erdal Coşkun' a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında hem çalışma arkadaşı, hem birer abla olarak yanlarında hep mutlu olduğum, desteklerini ve yardımlarını hiç eksik etmeyen Sevil Oskay Halaçlı' ya, Burçin Taşbasan, Banu Avşar ve Necla Çelik' e, tezimi yazarken manevi destek olan Temel Onkoloji öğrencilerine, bir okuldan ziyade aile sıcaklığı ile bizi sarıp sarmalayan tüm Temel Onkoloji ailesine teşekkür ederim.

Bu süreçte bana inancını sürekli hissettiren, hoşgörü, sevgi ve sabırla yanımda olan sevgili hayat arkadaşım, eşim Ahmet Öner' e teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başlamamı teşvik ederek, yorulmadan usanmadan her an her yerde destek olan ve olmaya devam eden, beni devamlı yüreklendiren sonsuz sevgi kaynağım çok sevgili annem, babam ve kardeşime minnettarım.

"Bu tez Hacettepe üniversitesi Bilimsel araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir."

ÖZET

Erdem G.Ö. Kolon Kanserli Hastalarda İnterlökin-21 ve İnterlökin-32 Gen Ekspresyon Düzeyleri ve Metastaz İlişkisi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmunolojisi Yüksek Lisans Tezi. Ankara, 2014. Tümör mikroçevresi tümörü, stromayı, stromayla ilişkili ve tümöre infiltrate immün sistem hücrelerini içerir. Bu mikroçevredeki immün sistem hücrelerinden salınan kemokin ve sitokinler tümörün prognozunda önemli rol oynar ve tümörün immün fenotipini belirlerler. IL-32 ve IL-21 immün sistem hücrelerinden salınan proinflamatuvar sitokinlerdir. IL-32 Th, NK hücreleri, makrofaj ve epitelden, IL-21 ise Th, Tfh, Th17, NKT hücrelerinden salgılanır. Bu sitokinlerin gen ekspresyon düzeyleri kanserin bulunduğu dokuya göre değişim gösterir. Bu çalışmada kolon kanserli hastalarda IL-32 ve IL-21' in gen ekspresyon düzeyleri ve bu sitokinlerin klinikopatolojik parametrelerle ilişkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışmaya kolon kanseri tanısı almış 31(17 K) hasta alındı. Ameliyat sırasında hastaların tümörlü ve tümörsüz dokularından örnekler alındı. Bu dokulardan RNA izolasyonu yapıldıktan sonra IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon düzeyleri gerçek-zamanlı PCR kullanılarak ölçüldü. Tümörlü dokudaki rölatif gen ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı. Ekspresyon düzeyleri ile tümör diferansiyasyonu, evresi, lenf nodu metastazı, vasküler ve perinöral invazyon arasındaki ilişki araştırıldı. IL-32 gen ekspresyonu genel olarak tümörlü dokuda, tümörsüz dokuya göre artış göstermekteydi (median: 1.16). Hastaların %51.6' sında artmış, %48.4' ünde ise azalmış değerler bulundu. IL-21 gen ekspresyon düzeyi tümör dokusunda azalma eğiliminde (median: 0.911) olmasına karşın hastaların %50'sinde artmış, %50' sinde ise azalmıştı. IL-32 gen ekspresyonu, erken evre kanserlerde düşük düzeyde seyrederken tümör duvarını aşınca kadar yükselmekte, ileri evrede özellikle lenf nodu tutulumu ile tekrar düşüş göstermekteydi. Bu ekspresyon düzeyleri patolojik tümör (pT) evresi ile de uyumlu bulundu. Bu bulguyu destekler şekilde tümörlü lenf nodu sayısı arttıkça IL-32 ekspresyon düzeyinin anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi. Öte yandan, IL-21 ekspresyon düzeylerinin vasküler invazyon varlığında anlamlı biçimde arttığı izlendi.

Sonuç olarak, kolon kanseri mikroçevresinde eksprese olan IL-21 ve IL-32 'ye ilişkin bulgularımız, IL-32 ekspresyonunun tümörün büyümesini kontrol altına alabilmek için artış gösterdiğine, tutulan lenf nodu sayısı arttıkça ekspresyonunun azaldığına; vasküler invazyon ve lenf nodu tutulumu ile birlikte artan IL-21 düzeyleri de kolon kanserinde tümör büyümesi ve yayılımında sitokinlerin rolü olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolon Kanseri, IL-21, IL-32, Tümör Mikroçevresi, Sitokinler

"Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 012D12104002)"

ABSTRACT

Erdem, G.Ö. Interleukin-21 and Interleukin-32 gene expression levels and their relationship with metastasis in colon cancer. Hacettepe University, Institute of Health Sciences, A dissertation for the degree of Master of Science in Tumor Biology and Immunology. Ankara, 2014.

Tumor microenvironment contains tumor cells, immune cells, stroma and stroma associated immune cells. This microenvironment of the immune system cells release chemokines and cytokines which play an important role in the prognosis of the tumor and determine the immune phenotype of the tumor. IL-32 and IL-21 are pro-inflammatory cytokines released by immune system cells. IL-32 is released by Th, NK, macrophages and epithelium and IL-21 is released by Th, Tfh, Th17, NKT cells. The gene expression levels of these cytokines changes according to their location. Present study aims to evaluate the gene expression levels of IL-21 and IL-32 and their relationship with clinicopathologic parameters in patients with colon cancer. 31(17F) patients with diagnosis of colon cancer were included. Samples were obtained from normal and tumor tissues during surgery. After RNA isolation, IL-21 and IL-32 gene expression levels were measured using real-time PCR. The relative gene expression levels in tissues were calculated using using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The relations between expression levels and tumor differentiation, tumor stage, presence of vascular, perineural invasion and lymph node metastasis were investigated. While IL-32 gene expression levels were found to be increased in tumor tissues (median: 1.16). IL-32 were increased in 51.6 % and decreased in 48.4% of the patients. IL-21 gene expression levels were found to be decreased (median:0.911) in 50% of the patients. While IL-32 expression levels were low in early stages of the tumors, continued to increase with the stage till passing the colonic wall, but were found to be decreased again with the involvement of lymph nodes. These expression levels were also in correlation with the pathological T stages (pT) of the tumor. IL-32 expression levels were also decreased significantly with the increased number of the lymph nodes with metastasis. On the other hand, expression levels of IL-21 increased significantly with the presence of vascular invasion. In conclusion, our findings on IL-21 and IL-32 expressed by tumor microenvironment reveals that IL-32 expression increased to control tumor growth, but levels are decreased with the increased number of involved lymph nodes. Increased levels of IL-21 with vascular invasion and lymph node involvement, together with the changes on IL-32, indicates the role for cytokines in tumor growth and invasion in colon cancer.

Key words: Colon cancer, Interleukin-21, Interleukin-32, Tumor microenvironment, Cytokines

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. (BAB, Grant Number, 012D12104002).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolon Anatomisi	3
2.2. Kolon Histolojisi	4
2.3. Kolon Kanseri	5
2.3.1. Epidemiyoloji	5
2.3.2. Etiyoloji	6
2.3.3. Kolon Kanseri Histolojik Alt Tipleri	8
2.3.4. Kolon Kanseri Patolojisi	8
2.3.5. Kolon Kanserinde Adenom-Karsinom Dönüşümü	9
2.3.6. Kolon Kanserinin Yayılım yolları	10
2.3.7. Kolon Kanseri ve immün sistem ilişkisi	10
2.3.8. Kolon Kanseri Evrelendirmesi	11
2.3.9. Tümör Diferansiyasyonu	15
2.4. Tümör mikroçevresi	15
2.5. İnterlökin 32 (IL-32)	18
2.5.1. Kolon Kanseri IL-32 ilişkisi	23
2.6. İnterlökin 21 (IL-21)	23
2.6.1. Kanser tedavisinde IL-21	27
3. HASTALAR VE YÖNTEMLER	31
3.1. Hastalar	31

3.2. Doku Lizisi ve Homojenizasyonu	31
3.3. RNA İzolasyonu	32
3.4. RNA Konsantrasyonu Ölçümü	33
3.5. RNA Örneklerinde Genomik DNA (gDNA) Kontrolü	33
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi	34
3.7. gDNA ile Kontamine RNA Örneklerinin Temizlenmesi İşlemi	35
3.8. DNase I İşlemi Sonrası gDNA Kontrolü	37
3.9. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	37
3.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR)	38
3.11. Gerçek-Zamanlı PCR (<i>Real Time PCR</i> , qPCR)	40
3.12. İstatistik Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1. RNA Örneklerinde genomik DNA (gDNA) Kontaminasyon Kontrolü	44
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Optimizasyonları (PZR, PCR)	46
4.2.1. IL-32 optimizasyonu	47
4.2.2. GAPDH Optimizasyonu	50
4.2.3. IL-21 Optimizasyonu	50
4.3. Doku örneklerinde IL-21 ve IL-32 Gen Ekspresyonu Düzeyleri	51
4.4. Diferansiyasyona Göre IL-32 ve IL-21 Ekspresyon Düzeyleri	56
4.5. Tümör evresine göre IL-32 ve IL-21 Gen Ekspresyonlarının Dağılımı	57
4.6. Tümör invazyonuna göre IL-32 ve IL-21 Gen Ekspresyonlarının Dağılımı	59
4.7. Lenf Nodu Metastazına göre IL-32 ve IL-21 Gen ekspresyon Dağılımı	61
4.8. Vasküler invazyona göre IL-32 ve IL-21 Gen ekspresyon düzeyleri	63
4.9. Perinöral invazyon ve Uzak Metastaza Göre IL-32 ve IL-21 Ekspresyon Düzeyleri	65
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	75
EKLER	
EK-1. Etik Kurul İzni	
EK-2. Çalışmanın sunulduğu bilimsel toplantılar	

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC	Adenomatöz polipozis coli
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CD44	Adezyon molekülü
CIN	Kromozomal instabilite
COX-2	Siklooksijenaz-2
Ct	Eşik siklusu (<i>threshold cycle</i>)
DC	Dendritik hücre
E7	İnsan Papilloma Virüs ilişkili Onkogen
<i>FAP</i>	Ailesel adenomatöz polipozis coli
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
<i>HNPCC</i>	Hereditör nonpolipozis coli- <i>Lynch</i> sendromu
HPV-16	Human Papilloma virüs-16
HSK	Hepatoselüler karsinoma
IFN- γ	İnterferon gama
IgG	İmmünglobulin G
IL-21	İnterlökin-21
IL-32	İnterlökin-32
JAK-3	Janus kinaz -3
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
K-ras	Kirsten ras onkogen
LYVE-1	Lenfatik damar endothelyall hyaluronan reseptör
MDSC	Miyeloid kökenli süpresör hücreler
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MSI	Mikrosatellit instabilite
NF- κ B	Nükleer faktör kappa B
NK	Doğal öldürücü hücre
NKT	Doğal öldürücü T-hücresi
p53	Tümör süpresör protein 53
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI-3K	Fosfatidil inositol 3 kinaz 3

RT-PCR	Reverse transkription PCR
SHAK	Skuamoz hücreli akciğer kanseri
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
STAT5a	<i>Signal transducer and activator of transcription5a</i>
TCR	T hücre reseptörü
Tfh	Yardımcı foliküler T hücresi
Th	Yardımcı T hücresi
Th17	Yardımcı T hücre 17
TLS	Dördüncül lenfoid organlar
TNF- α	Tümör nekrotizan faktör alfa
Treg	T regülatuvar hücre
VEGFR-3	Vasküler Endotelyal GrowthFaktör Reseptör-3

ŞEKİLLER

	Sayfa	
2.1.	Kolon Anatomisi	4
2.2.	Kolon duvarı tabakaları	5
2.3.	Kolon kanseri gelişiminde moleküler genetik olaylar	7
2.4.	Astler-Coller Sınıflandırması	13
2.5.	TNM Sınıflandırması	14
2.6.	Sitokinlerin tümör mikroçevresindeki önemi	17
2.7.	IL-32' nin işlevi	18
2.8.	IL-21 ve görevleri	25
3.1.	Çalışma protokolü	32
4.1.	RNA izolasyonu sonrası deney akışı	44
4.2.	gDNA ile kontamine olan RNA örneklerinin jel görüntüsü	45
4.3.	Genomik DNA temizliği yapılmış RNA örnekleri.	46
4.4.	IL-32 gen optimizasyonunda konvansiyonel PCR jel görüntüsü	47
4.5.	IL-32 konvansiyonel PCR primer titrasyonu	47
4.6.	qPCR'da GAPDH ve IL-32 primerleri ile MgCl ₂ titrasyonu	48
4.7.	qPCR sonrası IL-32 ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü	49
4.8.	qPCR da PCR ürünü eğrileri	49
4.9.	qPCR sonrası GAPDH PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü	50
4.10.	qPCR sonrası IL-21 PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü	51
4.11.	IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon dağılımı	52
4.12.	IL-32 gen ekspresyonu dağılımı	53
4.13.	IL-21 gen ekspresyon dağılımı	54
4.14.	IL-32 gen ekspresyonunun diferansiyasyona göre dağılımı	56
4.15.	IL-21 gen ekspresyonunun diferansiyasyona göre dağılımı	57
4.16.	Astler-Coller sınıflandırmasına göre IL-32 gen ekspresyonu dağılımı	58
4.17.	Astler-Coller sınıflandırmasına göre IL-21 gen ekspresyonu dağılımı	59
4.18.	pT evresine göre IL-32 gen ekspresyonu dağılımı	60
4.19.	pT evresine göre IL-21 gen ekspresyonu dağılımı	61
4.20.	Metastatik lenf nodu sayısına göre IL-32 gen ekspresyonu	62
4.21.	Metastatik lenf nodu sayısına göre IL-21 gen ekspresyonu	63
4.22.	Vasküler invazyona göre IL-32 gen ekspresyonu dağılımı	64
4.23.	Vasküler invazyona göre IL-21 gen ekspresyonu dağılımı	65

TABLOLAR

	Sayfa	
2.1	TNM Sınıflandırması	13
2.2	TNM, Duker ve Astler-Coller sınıflandırmalarının karşılaştırması	14
2.3.	IL-32 ve IL-21 sitokinlerinin özellikleri	19
3.1	gDNA kontaminasyon kontrolü için GAPDH konvansiyonel PCR bileşenleri	34
3.2.	GAPDH konvansiyonel PCR koşulları.	34
3.3.	IL-21, IL-32, GAPDH genlerine ait primer dizileri	39
3.4	IL-32 ve GAPDH konvansiyonel PCR bileşenleri	39
3.5.	IL-21 konvansiyonel PCR bileşenleri	40
3.6.	IL-32 ve GAPDH genleri için gerçek zamanlı PCR bileşenleri	41
3.7	IL-21 geni için gerçek zamanlı PCR bileşenleri	41
3.8	GAPDH ve IL-32 genleri için gerçek zamanlı PCR koşulları	42
3.9	IL-21 için gerçek zamanlı PCR koşulları	42
4.1	Hastaların gruplara göre dağılımı.	52
4.2.	IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon dağılımı	53
4.3.	IL-32 gen ekspresyonu dağılımı	53
4.4.	IL-21 gen ekspresyon dağılımı	54
4.5	Klinikopatolojik verilere göre IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon düzeyleri	55
4.6	IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon ortalamalarının diferansiyasyona göre dağılımı	56
4.7	IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon ortalamalarının Astler-Coller sınıflamasına göre dağılımı	58
4.8	IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon ortalamalarının patolojik T evresine göre dağılımı	60
4.9.	Metastatik lenf nodu sayısına göre IL-32 ve IL-21 ekspresyon dağılımı	62
4.10.	Vasküler invazyona göre IL-32 ve IL-21 genlerinin ekspresyon düzeyleri	64
4.11.	Perinöral invazyona göre IL-32 ve IL-21 genlerinin ekspresyon düzeyleri	66

1. GİRİŞ

Malign tümörlerin oluşumuna bir çok genetik ve epigenetik değişiklik neden olmakta ve bu değişikliklerin büyük bölümü mikroçevreden etkilenmektedir. Tümörlerin bu kendilerine özel mikroçevresi, lökosit ve lenfositlerden zengin, tümöre infiltre pek çok hücreyi içerir [1, 2]. Tümör mikroçevresinde mast hücreleri, M2 makrofajlar, miyeloid kökenli süpresör hücreler (MDSC) tümörün iç bölgelerinde yerleşirken, immatür Langerhans tipi dendritik hücreler tümör merkezinde, plazmositoid dendritik hücrelerin stromada, matür dendritik hücrelerin ise tümöre yakın lenfoid adacıklarda ve lenf nodlarında bulunduğu, NK hücrelerinin stromada, T lenfositlerin tümörün merkezinde, tümöre yakın lenf nodlarında oldukları bilinmektedir. CD8+ T lenfositlerin tümörle yakın ilişki içinde, Treg, Th17, Tfh, B hücrelerin de stromada buldukları bildirilmektedir[3],[4]. Hücrelerin aktivasyon şekilleri, stromadaki ve tümördeki konum ve ilişkileri, salgıladıkları kemokinler ve sitokinler tümörün geleceğini etkileyen faktörlerdir. İnterlökinler, büyüme faktörleri ve TNF- α sitokin grubu proteinlerdir. İmmün sistem hücrelerinden veya dokulardan salınarak, salındıkları bölgeye immün hücrelerin gelişini sağlarlar ve immün yanıtları şekillenmesine yardım eder, immün hücrelerin birbirleriyle iletişimini sağlarlar. Sitokinler, immün hücrelerin büyüme ile gelişmesi, efektör fonksiyon göstermesi ve farklılaşması, immün hücreleri aktive etmesi, antijenlere ve kanser hücrelerine karşı yanıtları geliştirmesine yardım etmesi gibi pek çok özelliğe sahiptir. Tümör mikroçevresinde salınan kemokin ve sitokinler T lenfositlerin bu çevreye gelişini sağlar kansere karşı immün yanıtların gelişmesine yardımcı olabildiği gibi bazen de kanser hücrelerine gereken uygun mikroçevrenin şekillenmesine katkıda bulunurlar [5, 6].

Kolon kanseri her yıl bir milyondan fazla yeni tanının konduğu bir kanserdir. Çoğunluğu sporadiktir ve kalıtsal bir köken taşımamaktadır. Kanserin patogenezinde, adenom oluşumunda etkili birçok genetik mutasyonun kanser dönüşümüne neden olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar epitel hücrelerinde oluşan bu genetik-epigenetik değişikliklerin yanı sıra tümörün bulunduğu mikroçevrenin, tümöre karşı oluşan

immün yanıtların, tümör stroma ilişkisinin kolon kanseri patogeneğinde oldukça önemli olduğuna işaret etmektedir. Bu çevrede tümöre karşı gelişen immün yanıtların yanı sıra tümör de bu immün yanıtlara karşı cevap olarak salgıladığı çeşitli faktörler yardımıyla stromadan yararlanır ve yeni oluşan kan damarlarını kendi lehine kullanır. İnvazif kolon kanserlerinde yapılan araştırmalar, stromada bulunan ve tümörü infiltre eden immün hücrelerin tipinin, yoğunluğunun ve buradaki inflamatuvar çevrenin hastaların prognozunda oldukça önemli olduğunu düşündürmektedir.

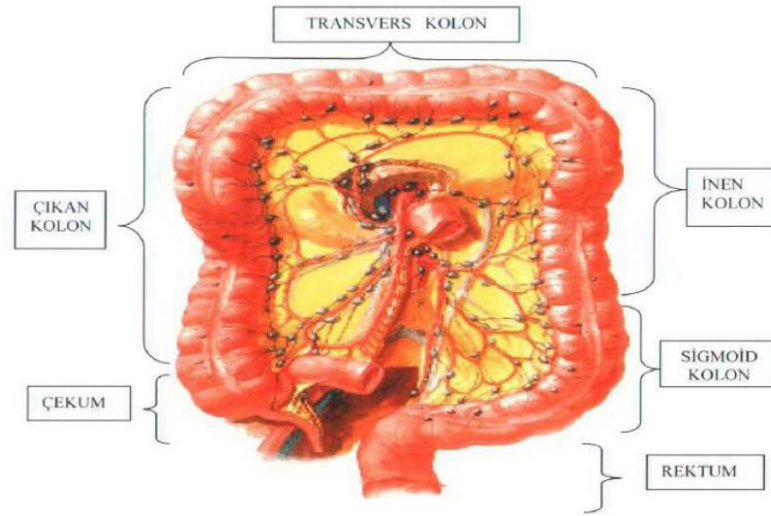
IL-21 ve IL-32 tümör mikroçevresinde bulunan immün hücrelerden salınan pro-inflamatuvar sitokinlerdir. Bu çalışma sitokinlerin ekspresyon düzeylerinin sağlıklı dokuya göre değişimini değerlendirmek ve bu değişikliğin tümör evresi, lenf nodu tutulumu, tümör diferensiyasyonu, vasküler ve perinöral invazyon gibi klinikopatolojik bulgularla ilişkisini araştırmak amacıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kolon kanseri her yıl dünya genelinde bir milyondan fazla yeni tanının konduğu önemli bir sağlık problemidir. Kadınlarda ikinci, erkeklerde ise üçüncü en sık görülen kanser türüdür. Bu kanserlerin çoğunluğu sporadiktir ve kalıtsal bir genetik mutasyon tanımlanamamıştır. Patogenezinde, adenom oluşumundan sonra gelişen bir dizi genetik mutasyonun kanser dönüşümüne neden olduğu teorisi kabul görmektedir. Daha önceleri bu olay sadece epitel hücrelerinin davranışı üzerinden açıklanmaya çalışılırken, son yıllarda mikroçevre üzerine odaklanılarak stromal hücreler ile epitel hücresi arasındaki ilişki üzerinden tartışılmaktadır. Tümör hücreleri fibroblastlar, endotel hücreleri ve immün hücrelerden oluşan kompleks bir çevrenin içinde yaşarlar. Bu mikroçevrede kendine yer açmak ve immün ataklardan kaçabilmek için sürekli savaşırken, inflamatuvar ve stromal hücrelerden salınan büyüme faktörleri ile kan damarlarının taşıdığı besinleri kendi gelişimi için kullanırlar. Kolon kanseri hastalarında, inflamatuvar mikroçevreye, tümörün yer aldığı stromaya, tümöre infiltre immün hücrelerin tiplerine ve yoğunluğuna bakılarak, hastalığın aktivitesi hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir [7-9].

2.1. Kolon Anatomisi

Kolon ileumun bitiminden anüse kadar uzanan yaklaşık 150 cm uzunluğunda bir organdır ve sindirim kanalının beşte birini oluşturmaktadır. Kalın bağırsak retroperitoneal alanda böbrek, karaciğer, dalak, mide, duodenum, ince bağırsak, üreter ve mesane gibi organlara komşuluk eder. Kolon, çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum gibi bölümlere ayrılmaktadır (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Kolon Anatomisi

2.2. Kolon Histolojisi

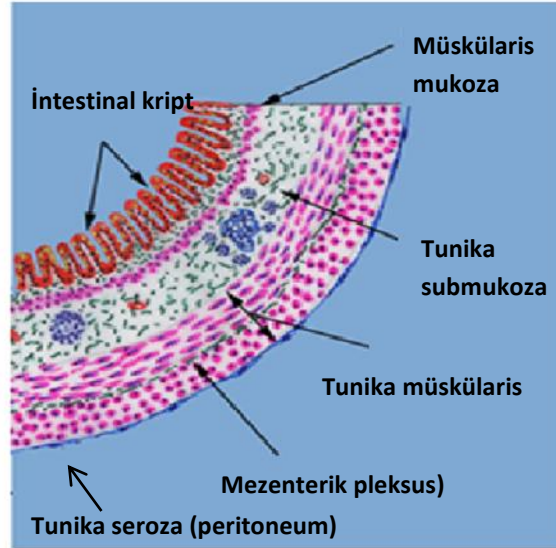
Kolon duvarı 4 tabakadan oluşur; Mukoza, submukoza, muskularis propria ve seroza (perikolik yağ dokusu).

- a. Mukoza: Mukoza epitel, lamina propria, muskularis mukoza olmak üzere 3 tabakadan oluşur.

Mukozal yüzey tek sıralı alçak kolumnar veya küboidal epitelle döşelidir ve absorpsiyon yapan hücreler ile goblet hücrelerini içerir. Buna ek olarak immatür ve indiferansiye öncül hücreler, endokrin hücreler ve Paneth hücreleri de kriptlerin bazalinde çok miktarda bulunur. Kolon mukozası ince bağırsak mukozasından daha fazla goblet hücresi içerir. Paneth hücrelerinin çok sayıda eozinofilik sekretuar granülü bulunmaktadır ve lizozim, epidermal büyüme faktörü gibi ürünler içerir. Muskularis mukoza kapillerler, lenfatiklerle sarılı kas ve sinir lifleri içerir.

- b. Submukoza: Lamina proprianın hücresel içeriğine sahip, nöral pleksusu (*Meissner* pleksusu) bulunan, gevşek bağ dokusundan oluşmuş bir tabakadır.
- c. Müskülar tabaka: İçte sirküler, dışta longitudinal kas tabakalarından oluşmuştur ve bunların arasında *Auerbach* pleksusu mevcuttur.

- d. Seroza: Tek sıralı yassı veya küboidal mezotelyal hücreler ile döşeli peritondan ve fibroelastik dokudan oluşur. Kan damarları ve lenfatikler içerir. Çekum, apendiks, transvers kolon ve sigmoid kolonu tam olarak sarar [10, 11] (Şekil 2.2).



Şekil.2.2. Kolon duvarı tabakaları Dr. Thomas Caceci- Exercise 19: Digestive System 2: Intestines ' den uyarlanmıştır [12].

2.3. Kolon Kanseri

2.3.1. Epidemiyoloji

Kolon kanseri ABD' de en sık görülen üçüncü, akciğer kanserinden sonra en çok ölüme yol açan ikinci kanser türüdür. Tanı sırasında hastaların yaklaşık %20' si 4. evrede, 1. ve 3. evrede olan hastaların da %50'den fazlasında metastaz bulunmaktadır [13]. 2012' de Avrupa' da yapılan EURO CARE konsensusunda %56' sı erkek ve %44' ü kadın olan 342.137 yeni hasta bildirilmiştir. Kolon kanser riski 50 yaşından sonra artmakta, 60-70 yaşlarında en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Kolon kanserlerinin %17'si çekum, %12' si çıkan kolonda, %13' ü transvers kolon, %4'ü inen kolon, %23'ü sigmoid kolon, %31 rekto-sigmoid bileşke ve rektum da bulunur.

Kolon kanserlerinin çevresel ve genetik faktörlerin etkisiyle geliştiği bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar diyet, yaşam şekli, kullanılan

ilaçların kanser geliştirme riskini etkilediğini göstermektedir. Aspirinin ve steroid olmayan anti- inflamatuvar ilaç kullanımının kolon kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmektedir. Tanı konulan adenomatöz poliplerin çıkarılması kolon kanser gelişimini önlemektedir [14].

2.3.2. Etiyoloji

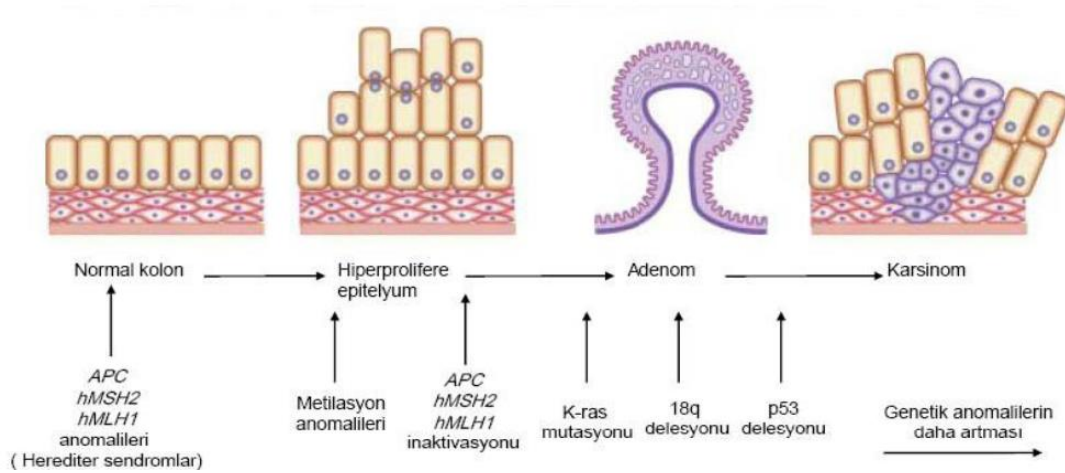
Kolon kanserinin gelişim mekanizması kesin bilinmemekle beraber kolonik mukozayı etkileyen genetik ve çevresel faktörlere ikincil olarak geliştiği düşünülmektedir. Yaş, ülseratif kolit, Crohn's hastalığı gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarının kanser gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Yüksek yağ içeriğine sahip, işlenmiş et ürünleri ve rafine karbonhidratlardan zengin diyet de hastalığın gelişme riskini arttırmaktadır. Adenom öyküsü ve sigara kullanımı yanı sıra, obezite, diyabet, akromegali gibi hastalıklar ve daha önce maruz kalınmış yüksek doz radyasyonun da kolon kanserinin gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir.

a. Diyet

Kolon kanserinin ABD ve Kanada gibi gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı yüksekken Hindistan, Güney Amerika ve Afrika gibi ülkelerde ise insidansı düşüktür. Bu farkın çevresel faktörlerle özellikle diyetle yakından ilgili olduğu bilinmektedir. İşlenmiş karbonhidrattan zengin, emilemeyen bitkisel liflerden yoksun diyet, yüksek yağ miktarı, A, C, E gibi hücre yenileyici ve anti-oksidan özelliği yüksek olan vitaminlerin az alınması kanser gelişme riskini etkilemektedir. Düşük lif içeriği dışkı hacminin azalarak bağırsakta olması gerektiğinden daha uzun kalmasına ve bağırsaktaki bakteriyel floranın değişmesine neden olmaktadır. Bakteriler tarafından parçalanmış karbonhidratlardan kaynaklı oksidatif ve toksik bileşiklerin dışkı içerisinde yüksek miktarda bulunması kolon mukozasını olumsuz etkilemektedir. Yüksek miktarda yağ tüketimi, karaciğer tarafından üretilen kolesterol ve safra asitlerinin artmasına neden olur ve bunların bir bölümü intestinal bakteriler tarafından karsinojen moleküllere dönüştürülürler [15].

b. Genetik Faktörler

Kolorektal kanserlerinin %80' i sporadik olarak, %10' dan daha az bir kısmı ise herediter bir kökenden veya inflamatuvar barsak hastalıklarından gelişir. Sporadik kolon kanserlerinde adenom-karsinom dönüşümünde mikrosatellit instabilite (*MSI*) ve kromozomal instabilite (*CIN*) önemli rol oynamaktadır. Bu yollara dahil olmayan sporadik kolorektal kanserlerin ise CpG adalarındaki metilasyon kaynaklı olabileceği bildirilmektedir [16-18]. Diğer kanserlerde de olduğu gibi hücrelerde biriken genetik değişiklikler hücrenin büyümesine ve fenotipik değişikliklere yol açarak neoplastik oluşuma neden olur. Bu hücreler zamanla büyüme sinyallerine daha hassas, apoptoza dirençli, limitsiz bölünme potansiyeline sahip, anjiyogenezini sürdürebilen, kendine yetebilen hücrelere dönüşürler. *Fearon* ve *Volgstein*, çeşitli mutasyon birikimlerinin bu süreçte önemli olduğunu göstermişlerdir. *Adenomatöz Polipozis Coli* (*APC*) genini tanımlamışlar, 18q kromozomunda bulunan p53, K-ras genlerinde oluşan mutasyonların kolorektal kanser gelişimine katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir. Kolon kanser hastalarının %10' u p53, K-ras, APC geni mutasyonlarının tümüne sahiptir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ise spesifik kromozomal değişikliklerin de kolorektal kanser gelişimine neden olabileceğini göstermektedir. Kolon kanser gelişiminde önemli olan değişimler Şekil 2.3' de görülmektedir [19-21].



Şekil 2.3. Kolon kanseri gelişiminde moleküler genetik olaylar [22].

2.3.3. Kolon Kanseri Histolojik Alt Tipleri

Kolon kanseri adenokarsinom, müsinöz adenokarsinom, taşlı-yüzük hücreli karsinom, yassı hücreli karsinom, adenoskuamöz karsinom, medüller karsinom ve diferansiye olmayan karsinom alt tiplerden oluşmaktadır.

2.3.4 Kolon Kanseri Patolojisi

Kolon tümörleri glandüler epitelden kaynaklanan adenokarsinomlardır. Makroskobik olarak polipoid, ülseratif, infiltratif veya anüler olabilirler. Sağ kolon karsinomları çoğunlukla polipoid, sol kolon karsinomları ise anüler ve skirözdür.

Tümör morfolojik olarak egzofitik (pedinküllü, sesil), endofitik (ülseratif), diffüz infiltratif olabilir. Kolorektal tümörler buldukları yerde lümeneye doğru veya derinlemesine duvar içine doğru yayılım gösterebilirler. Dokunun derinlemesine büyüme gösteren tümörlerin prognozu lümeneye doğru büyüyen tümörlere göre daha kötüdür.

Kolon kanserleri 3 gruba ayrılır: a)kalıtsal kökenli kolon kanserleri, b)inflamatuvar kökenli kolon kanserleri ve c)sporadik kolon kanserleri.

a) Kalıtsal kökenli kolon kanserleri: Herediter non-polipozis kolorektal kanser (Lynch sendromu/*HNPCC*), ailesel adenomatöz polipozis koli (*FAP*), hamartamatöz juvenil polipozis sendromu, Peutze-Jeghers sendromu kalıtsal kökenli kolon kanserleridir. Erken tanı ve tedavi bu hastalığa sahip kişilerin kanser geliştirme riskini azaltmaktadır.

FAP otozomal dominant geçişli bir hastalıktır ve kromozom 5q' da bulunan Adenomatous polipozis *coli* (*APC*) isimli tümör baskılayıcı gendeki mutasyondan kaynaklanır. *FAP* hastalarında kolon ve rektumda çok sayıda polip bulunur. Bu hastalıklara sahip kişilerin kolon kanseri geliştirme ihtimalleri çok yüksektir ve tüm kolon kanserlerinin %5-10' unu oluşturmaktadır.

HNPCC herediter kolorektal kanserlerin en sık görülen tipidir, tüm kolorektal kanserlerin %1-6' sını oluşturur. Bu sendroma sahip kişiler erken

yaşlarda kolon, mide, endometriyum, böbrek ve üretra kanserleri geliştirirler. Karakteristik olarak mismatch repair gen (MMR) bozuklukları hücre bölünmesi sırasında replikasyon hatalarına neden olmaktadır. Kromozom 2p' de MSH2, kromozom 3p' de MLH1 mutasyonları en çok görülen genetik bozukluklardır. Bunların yanı sıra tüm HNPCC hastalarının %90' ında mikrosatellit instabilitesi gözlemlenmektedir.

b) İnflamatuvar kolon kanserleri: Kolon kanserlerinin gelişiminde rol alan inflamatuvar barsak hastalıkları Chron hastalığı (*CD*) ve ülseratif Kolit' (*UC*) tir.

c) Sporadik kolon kanserleri: Tüm kolon kanserlerinin %80' ini oluşturur. Sporadik kolorektal kanserler çoğunlukla poliplerden köken alır ve hastaların birinci derece akrabalarında kolorektal kanser hikayesi bulunmamaktadır. Sporadik kolon kanseri etiyolojisi kesin bilinmemekle beraber rastgele gelişen somatik mutasyonların birikmesinin yanı sıra bir çok genetik ve çevresel faktörün bu süreçte önemli olduğu, yaş faktörünün ise bu süreci etkileyen en önemli faktör olduğu düşünülmektedir. Ayrıca immün sistemin etkisi de son yıllarda farkedilmiş ve bunun üzerine bir çok araştırma yapılmıştır.

2.3.5. Kolon Kanserinde Adenom-Karsinom Dönüşümü

Bir polipten kolorektal kanser gelişmesi için ortalama 8-10 sene gerekir ancak her polip kansere dönüşmemektedir. Kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğu adenomdan gelişmektedir. Bir polipten kümülatif kanser gelişme riski 5 yılda %2,5, 10 yılda %8, 20 yılda %24' tür. Kolorektal kanser hastalarında senkron polip olma oranı yaklaşık %30'dur; kolon ve rektumda adenom ve adenokarsinom birlikte görülme olasılığı %13-62 aralığında değişmektedir. Kolorektal karsinogenezde ilk adım *APC* gen mutasyonudur. *APC* tümör baskılayıcı bir gendir ve bu genin inaktive olması hücrelerde proliferasyon artışına sebep olur. Bu süreçte gelişen bir diğer olay da DNA hipometilasyonudur. *APC* geni inaktivasyonu ile proliferatif özelliği artan

hücrelerde CpG dinükleotidlerinin metilasyon kaybına uğramasıyla hücrelerin çoğalması artar ve adenom gelişimi desteklenir. DNA hipometilasyonu K-ras onkogenini de aktive ederek displazinin artmasına ve adenomatoz lezyon gelişimine katkıda bulunur. K-ras mutasyonu APC mutasyonu olmadan da gelişebilir. Bu durumda aberran kript odakları görülmesine karşın maligniteye öncülük etmezler. APC mutasyonu üzerine görülen K-ras mutasyonu ile küçük adenomlar orta adenomlara dönüşür. Orta adenomların ileri adenomlara dönüşümü ise 18. kromozomun uzun kolundaki genetik değişikliklerle olur ve bu duruma kolon kanseri delesyonu adı verilir. Bu değişikliklerle hücrelerin mukus üretme kapasiteleri kaybolur. Son basamak olarak 17. kromozomda p53' tümör süpresör gen işlevi kaybolur ve onkogenlerin aktivitesindeki artış ile benign özellikler malign özelliklere dönüşür. Kolon kanserinin oluşumunda rol oynayan ilgili moleküler olaylar Şekil 2.3' de verilmiştir [23].

2.3.6. Kolon Kanserinin Yayılım yolları

Kolorektal tümörler invazyon yapabilirler, transperitoneal olarak veya lenfatikler ve kan damarları yoluyla uzak organlara yayılabilirler. En sık görülen metastaz odakları lenf nodları ve karaciğerdir. Kolon duvarının tüm katlarına invazyon göstermiş tümörlerin yaklaşık yarısında lenf nodu metastazı bulunur. Bu yolla önce en yakın lenf nodlarına, sırasıyla diğer lenf nodlarına metastaz yapabilirler. Periton, akciğerler ve overler de diğer olası metastaz bölgeleridir. Santral sinir sistemi, kemik, uterus, testis ve oral kavite ise daha az sıklıkla metastaz görülen organlardır [10, 24].

2.3.7. Kolon Kanseri ve immün sistem ilişkisi

Kolonda mukozal hücreler, kommensal bakteriler ve immün hücreler birlikte bulunur. Bu çevre devamlı homeostazis halindedir. İmmün hücreler mukozal epitelde lamina propriya tabakasında bulunur. Doğal immünite hücreleri olan makrofajlar, NK hücreleri, mast hücreleri ve bakteriler ve besinlere ait antijenleri işleyip T lenfositlere sunan dendritik hücreler (DC) bu

tabakada bulunur. İmmün hücrelerin herhangi bir şekilde aktive olması çevreye TNF α , IL-1 β , Nitrik Oksit (NO), PGE2 gibi proinflamatuvar mediyatörlerin salınmasına neden olur. Antijenler lamina propriyada dendritik hücreleri aktive ederek mezenterik lenf nodlarında naif yardımcı T (Th) hücrelerin, Th2 ve regülatuvar T hücre(Treg) gibi lenfositlerin aktive olarak ortama gelmesine neden olur. Bu spesifik hücre tiplerinden salınan IL-4, IL-10, TGF β gibi sitokinler mukozal immüniteyi aktive ederek lamina propriyada bulunan B hücrelerin IgA üretmesini uyarır ve immün cevapların sistemik hale gelmesini sağlar[25].

Kolon kanseri hastalarında yapılan histolojik çalışmalar tümörü etkileyen immün değişkenlere dikkati çekmektedir. Bu çevreye infiltre olmuş hücrelerin organizasyonu oldukça heterojendir ve tümörden tümöre, kişiden kişiye değişiklik göstermektedir. Genel olarak kolon tümör mikroçevresi DC, NK, naif ve hafıza lenfositleri içermektedir. İmmün sistemin tümörün büyümesini önleme, immün yanıtlardan kaçmasını kontrol etme gibi önemli görevleri vardır. Bu çevredeki immün hücrelerin tipi, aktivasyon şekli, yoğunluğu, efektör fonksiyonları ve tümördeki lokasyonları hastalık hakkında bilgi vermektedir. Özellikle bu çevredeki CD8⁺ T hücreler, hafıza CD45RO⁺ T hücrelerin tümördeki lokalizasyonları, tümöre yakın dördüncül lenfoid organlar (TLS) ve bu hücrelerin aktivasyonlarını belirleyen faktörler oldukça önemlidir. Tümöre infiltre lenfositlerin varlığı prognostik bir belirteç olarak görülmektedir Yoğun lenfosit infiltre olan tümörlerin daha iyi immün cevaplara sahip olduğu ve iyi prognoz gösterdikleri bilinmektedir. Tümörlerinde CD8⁺ T hücreleri, hafıza CD45RO⁺ T hücreleri bulunduran hastaların bu hücreleri tümörlerinde az bulunduran veya bulundurmeyen hastalara göre 5 yıllık sağkalımlarının daha iyi olduğu bilinmektedir [26].

2.3.8. Kolon Kanseri Evrelendirmesi

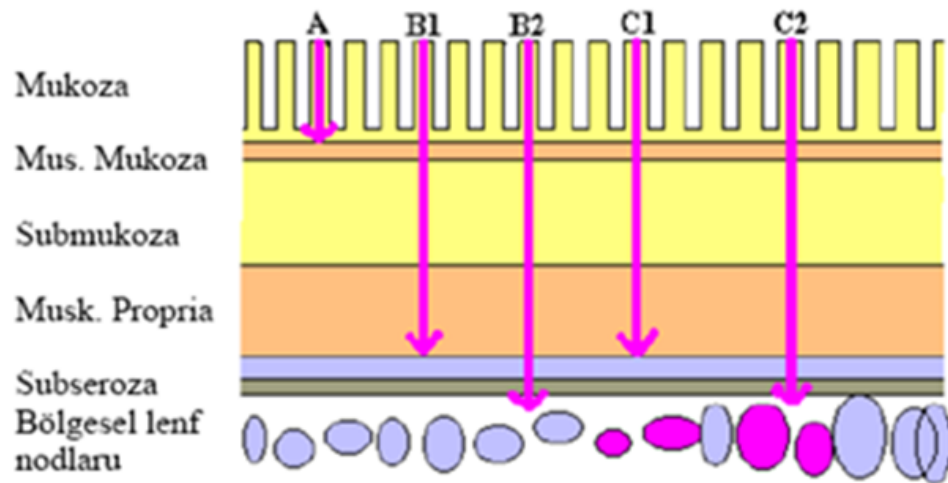
Kolon kanserleri için günümüzde 3 farklı sınıflama kullanılmaktadır.

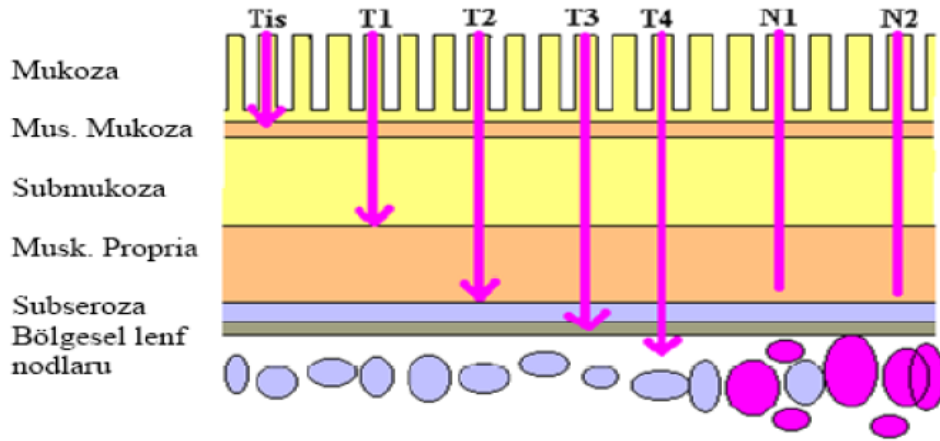
- 1)Duke' s sınıflaması
- 2)Astler–Coller sınıflaması
- 3)TNM sınıflaması

Dukes sınıflandırması tümörün derinliği ve lenf nodu tutulumuna göre A, B, C evrelerine ayrılmıştır. Astler-Coller evrelemesi temel olarak Dukes sınıflandırmasına benzemekle beraber, derinlikleri farklı olan tümörlerde lenf nodu tutulumunu da göstermesi açısından farklılık göstermektedir. Her iki sınıflamaya da uzak metastaz varlığını belirtmek için D evresi eklenmiştir (Şekil 2.4) [27]. Amerika Birleşik Devletleri Kanser Komitesi' nin (AJCC) 2003 yılında güncellediği kolon kanseri TNM sınıflandırmasına göre de 4 evre vardır. Evre 2 ve Evre 3 hastalar alt gruplara bölünerek ayrıca sınıflandırılmış, vasküler ya da lenfatik invazyonlar buna dahil edilmiştir. AJCC evreleme sistemi, tutulan lenf nodu sayısını sağkalımın önemli bir göstergesi olarak kabul etmektedir. T evresi (T) tümör boyutunun aksine bağırsak duvarına penetrasyon derinliğini tanımlamaktadır. TNM evrelemesi Tablo 2.1 ve Şekil 2.5'de görülmektedir. Makroskobik olarak diğer organ veya yapılara yapışık tümörler T4 olarak sınıflandırılır [28, 29]. Sınıflandırmaların karşılaştırması Tablo 2.2'de yapılmıştır.

Tablo 2.1 TNM Sınıflandırması

T= Primer tümör
TX: Primer tümörü bilinmeyen
T0: Primer tümörü yönünde bulgu yok
Tis: Karsinoma in situ
T1: Tümör submukozaya invaze
T2: Tümör muskularis propria'ya invaze
T3: Tümör, muskularis propria'yı subserozaya, ya da non-peritonealize perikolik dokuya kadar invaze ediyor
pT3a: Muskularis propria sınırından <1 mm öteye invazyon
pT3b: Muskularis propria sınırından 1-5 mm öteye invazyon
pT3c: Muskularis propria sınırından 5-15 mm öteye invazyon
pT3d: Muskularis propria sınırından >15 mm öteye invazyon
T4: Tümör komşu organ ya da yapılara invazyon göstermekte (pT4a) ve/veya visseral peritonu perforasyon göstermektedir (pT4b).
N= Bölgesel lenf bezleri
NX: Bölgesel lenf bezleri değerlendirilememekte
N0: Lenf bezi metastazı yok
N1: 1-3 lenf bezi metastazı mevcut
N2: 4 ya da daha fazla lenf bezi metastazı mevcut
M= Uzak metastaz
MX: Uzak metastaz değerlendirilememekte
M0: Uzak metastaz yok
M1: Uzak metastaz mevcut

**Şekil 2.4.** Astler-Coller Sınıflandırması[30]



Şekil 2.5. TNM Sınıflandırması [30]

Tablo 2.2 TNM, Dukes ve Astler-Coller sınıflandırmalarının karşılaştırması [22]

TNM evre	TNM kriteri	Dukes	Astler-Coller
Evre 0	Tis, N0, M0		
Evre I	T1, N0, M0	A	A
	T2, N0, M0	A	B1
Evre II A	T3, N0, M0	B	B1
Evre II B	T4, N0, M0	B	B2
Evre III A	T1-2, N1, M0	C	C1
Evre III B	T3-4, N1, M0	C	C2/C3
Evre III C	Herhangi T, N2, M0	C	C1/C2/C3
Evre IV	Herhangi T, Herhangi N, M0	D	

Lenfovasküler invazyon; endotel ile çevrili damarda tümör hücrelerinin görülmesini tanımlamaktadır. Kötü prognozla ilişkili bir histolojik bulgudur.

Lenfovasküler invazyonun rekürrens riskini 2,8 kat artırdığı gösterilmiştir, T ve N evresi ile vasküler invazyonun kombine edilmesi prognozu belirlemede standart TNM sistemine göre daha iyi performans göstermektedir.

2.3.9 Tümör Diferansiyasyonu

Tümörlerin diferansiyasyon derecesi “grade” olarak adlandırılmaktadır. Kolon kanseri hastalarının % 15-20’ si grade 1 (iyi diferansiye). % 60-70 grade 2 (orta diferansiye) ve %15-20’ si grade 3 (az diferansiye) olarak bildirilmektedir.

Grade 1: Karsinomlar mikroskopik olarak adenoma epiteline benzer. Hücreler uniform görünümde, polarite kaybı yok veya minimaldir.

Grade 2: Tümörlerde tübüler yapılar basit olabileceği gibi kompleks ve hafif düzensiz şekilli olabilir. Çekirdek polaritesinde hafif-orta düzeyde kayıp vardır.

Grade 3: Tümörlerde glandüler-tübüler yapı tümüyle ortadan kalkmıştır. Çekirdek polaritesi tümüyle bozulmuştur. Hücrelerde pleomorfizm belirgindir. Diferansiyasyon derecesinin sağkalım üzerine etkili olduğu belirlenmiştir [31, 32].

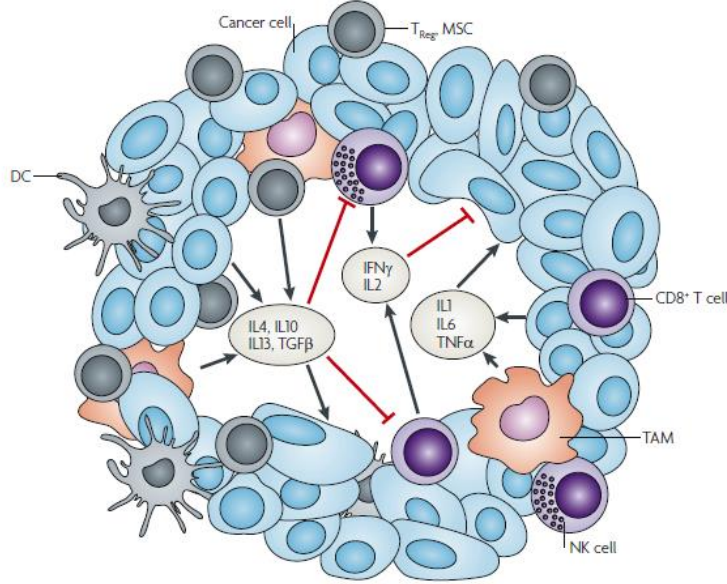
2.4. Tümör mikroçevresi

Bir çok malign tümörün oluşumundan birden fazla genetik-epigenetik değişikliğin birikimi sorumludur. Tümörün içinde geliştiği tümöre özel mikroçevre de bu değişikliklerin oluşumuna katkıda bulunabilir ve inflamatuvar özellikte, lökosit popülasyonundan zengin, tümöre infiltre bir çok immün hücre içerir [1, 2]. İmmün sistem hücrelerinin tümöre infiltre olması tümör gelişimini baskılayabilmektedir [33, 34]. Tümöre infiltre olan hücreler ve bu hücrelerin yoğunluğu tümörden tümöre, hastadan hastaya değişiklik gösterebilmektedir [35]. Tümör mikroçevresinde genellikle mast hücreleri, miyeloid kökenli süpresör hücreler (*MDSC*), nötrofiller ve M2 fenotipte makrofajlar tümörün iç bölgelerinde bulunurlar. İmmatür Langerhans tipi dendritik hücrelerin tümör merkezinde, immatür interstisyel dendritik hücrelerin ve plazmositoid dendritik hücrelerin stromada bulunduğu gözlemlenmiştir. Matür dendritik hücrelerin ise daha çok tümöre yakın lenfoid adacıklarda ve yakın lenf nodlarında olduğu görülmektedir [36]. NK hücreleri genellikle stromada, tümör sınırında yer alırlar. Renal hücreli kanserlerde ise

tümör hücreleri ile yakın kontakta oldukları bildirilmektedir [37, 38]. T lenfositler tümör merkezinde ve tümöre yakın lenfoid adacıklarda bulunmaktadır. CD8⁺T hücrelerin tümörle yakından ilişki içinde olduğu, Treg, Th17, foliküler yardımcı T (Tfh) hücrelerin ve B lenfositlerin ise daha çok tümör stromasında buldukları bilinmektedir [3, 4, 39, 40].

Tümör çevresinde bulunan immün sistem hücreleri ve salgıladıkları immün regülatuar faktörler tümörün kaderini belirleyen en önemli unsurlardandır. İnterlökinler, TNF- α , büyüme faktörleri ve farklılaşma faktörleri sitokin grubu proteinlerdir. İmmün hücrelerden ve diğer somatik hücrelerden salınabilirler. Doğal ve adaptif immünitede, hematopoezde görev alırlar, immün sistemin hücreleri arasındaki iletişimi sağlarlar. Sitokinlere bağlı olarak oluşan sinyaller hücre büyüme ve gelişmesini regüle eder, hücre farklılaşmasını sağlar, immün hücreleri aktive ederek enfeksiyon ajanlarına, antijenlere ve kanser hücrelerine karşı immün cevapların oluşmasını regüle ederler. Bazen de kanser hücrelerinin yaşayabilmesi için gereken uygun mikroçevrenin oluşumuna yardımcı olurlar. Ayrıca bir çok hastalığın patogeneğinde rol aldıkları da düşünülmektedir. Kanserlerin yaklaşık %20 'lik bir bölümü enfeksiyon, kronik inflamasyon alanından meydana gelir. Tümör mikroçevresinde yüksek miktarda inflamatuvar sitokin ekspresyonu vardır. Tümör mikroçevresini oluşturan hücreler ve diğer bileşenler Şekil 2.6' da gösterilmiştir. Proinflamatuvar sitokinlerin pre-malign hücrelerin büyümesini desteklediği, anjiyogenezi indükleyerek, metastaza ve tümöre yardımcı bir mikroçevre gelişimine neden olduğu bildirilmiştir [41-44]. Sitokinler tümör hücrelerinin apoptoza karşı direnç kazanmalarına da neden olabilirler [5, 6]. Örneğin TNF- α ve IL-6 tümörün başlangıç, gelişim, promosyon, metastaz gibi tüm aşamalarını etkileyen proinflamatuvar sitokinlerdir [45, 46]. IL-6 kolorektal kanserde intestinal epitelde proliferasyon artışına neden olmakta, hastaların serum IL-6 düzeyleri ile tümör yükü arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır [47, 48]. *In vitro* çalışmalar IL-6' nın kolon karsinoma hücrelerinde doza bağlı olarak koloni oluşturma yeteneğini arttırdığını göstermiştir. *In vivo* olarak IL-6 ekspresyonu bloke edildiğinde kolon kanseri gelişimi baskılanmaktadır [49, 50]. Bu nedenle pro-inflamatuvar sitokinler

hastalıkların patogenezi anlama ve hastalığın prognozunu belirlemede önemlidir.



Şekil 2.6. Sitokinlerin tümör mikroçevresindeki önemi.

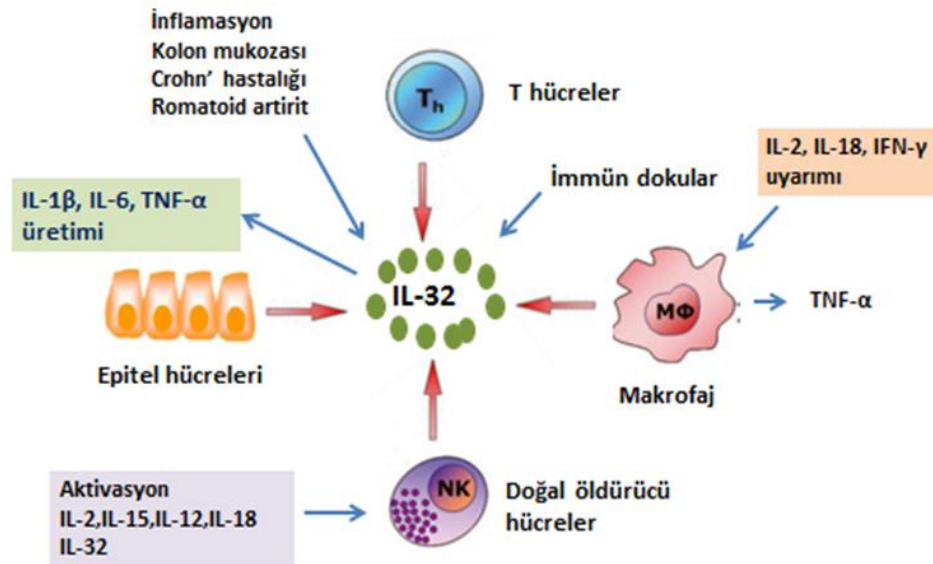
Tümör mikroçevresinde kanser hücreleri ve immün hücreler beraber bulunur. TAM, Treg hücreleri saldııkları immün süpresif sitokinlerle (IL-4, IL-10, IL-13) Th2 tipinde immünitinin gelişimini desteklerler ve TGF- β anti kanser immüniteyi baskılar. NK, CD8⁺ T hücreler ise salgıladıkları proinflamatuvar sitokinler (IL-2, IFN- γ) ile anti tümör immün yanıtların gelişmesini sağlar. Bu immün süpresif mikroçevrede doğal immün sistem hücrelerince salınan çeşitli sitokinler kanser hücrelerine büyüme ve yaşama avantajı sağlayabilir [51].

Kanser ve hasta sağ kalımı ile ilgili yapılan çalışmalarda, dolaşımdaki sitokin seviyelerinin hastalık sırasında ve tümör rezeksiyonu sonrasındaki seviyeleri dikkat çekicidir. Örneğin böbrek kanseri hastalarında hastalığın teşhisi sırasında IL-6 ve IL-10 düzeylerinin tümörün rezeksiyonu sonrasındaki düzeye ve sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür. *Vardy* ve arkadaşları meme ve kolon kanseri hastaları ile yaptıkları çalışmada proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin seviyelerini hastalığın teşhisinden itibaren 5 yıl boyunca, sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğunu göstermişlerdir [52]. Buraya kadar anlatılanlardan anlaşılacağı gibi sitokinlerin ekspresyon düzeyleri dokudan dokuya, tümörden tümöre, tümörün etkileştiği stromaya göre değişiklik göstermekte ve tümörün davranışını etkilemektedir.

2.5. İnterlökin 32 (IL-32)

IL-32, IL-2 ile aktive olan NK hücreleri ve T lenfositlerden salgılanan ve ilk bulunduğu NK4 transkript olarak tanımlanmış proinflamatuvar bir sitokindir. IL-32 ilk olarak yüksek dozda IL-2 tedavisi alan malign melanom hastalarının, periferik kan mononükleer hücrelerinde yüksek miktarda görülmüş, fakat kesin aktivitesinin ne olduğu tam olarak anlaşılamamıştır [53]. IL-18' in indüklediği proinflamatuvar genler insan akciğer epitelyal hücre hattında araştırılırken proinflamatuvar özellikte bir molekül tanımlamışlar ve bu moleküle NK4 transkript adını vermişlerdir. 1992 yılında *Dahl* ve arkadaşları tarafından bu proinflamatuvar molekülün ismi IL-32 olarak değiştirilmiştir [54-57].

IL-32 epitel hücrelerinden (kolon, mide, akciğer), meme, beyin, pankreas gibi endotel kökenli hücrelerden, IL-2, IL-18, IFN- γ ile uyarılmış monositlerden, aktive doğal öldürücü (NK) hücreler ve T lenfositlerden salınan çok fonksiyonlu proinflamatuvar bir sitokindir [54, 58, 59].



Şekil 2.7. IL-32' nin işlevi: IL-32 immün ve epitel kökenli hücreleri etkiler, bir çok proinflamatuvar sitokin salınımını sağlar.

IL-32 geni insan genomunun 16p13.3 kromozomunda kodlanır ve 8 ekzon içerir. IL-32 α , IL-32 β , IL-32 γ , IL-32 δ , IL-32 ϵ ve IL-32 ξ olmak üzere 6 tane varyantı vardır ve oluşan proteinler 14,9-26,7 kD büyüklüğündedir [60, 61]. IL-32 α en çok bulunan izoformdur [62]. IL-32 γ ilk keşfedilen, NK4 transkript olarak bilinen izoformdur ve izoformların en büyüğü, biyolojik olarak en aktif olanıdır. IL-32, hücre sitozolünde ve çekirdekte bulunabilir, salgılanan miktar sitoplazmada bulunan miktara göre oldukça azdır. IL-32'nin hücre içinde endoplazmik retikulumla beraber lokalize olduğu bilgisi bu sitokinin hücre içi bir protein olduğu yönündedir [63, 64]. IL-32'nin spesifik reseptörü henüz keşfedilememiştir.

Tablo 2.3. IL-32 ve IL-21 sitokinlerinin özellikleri

	IL-21	IL-32
Sitokin grubu	Proinflamatuvar	Proinflamatuvar
Eksprese Olduğu Hücreler	NKT, Th17, Tfh, Th	NK, Th hücreler, Makrofaj, Epitel hücreler
Etkilediği hücreler	NKT, Th17, Tfh, Th, NK, DC, B, CTL, Treg, Makrofaj	NK, Th1 hücreleri, TH17, MDSC
Protein	17kDa	14,9-26,7 kDa
Reseptör	Yc Reseptör Kompleksi	Henüz keşfedilmemiş

IL-32 γ immün sistem için önemli olan TNF- α , MIP-2 gibi sitokinlerin salınımını indükler. Kolon kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe etmesi ve çeşitli sitokinlerin salınım seviyelerini etkilemesi nedeniyle de kolon kanseri açısından önem taşımaktadır [65]. Rekombinant IL-32 α' nın Raw264.7 makrofaj hücre hattında, yüksek miktarda TNF- α ve MIP-2 üretimine neden olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda insan prostat dokusunda düşük, timus, ince bağırsak ve kolonda orta, dalak ve periferik kan lökositlerinde yüksek seviyede IL-32 mRNA ekspresyonu gözlemlenmiştir [54]. Dendritik hücre matürasyonunu ve aktivasyonunu sağladığı, bu hücrelerden IL-6 ve IL-12 üretimini uyardığı, Th1 ve Th17 farklılaşmasını sağladığı bilinmektedir [66].

IL-32' nin ilişkili olduğu sinyal yolları immün cevaplarla yakından ilişkilidir. IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 gibi proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salınmasını uyarır, NF- κ B ve p38 MAPK yollarını aktive eder [54].

IL-32 ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde sağlıklı dokuya göre mide kanserinde %41, akciğer kanserinde %71 oranında daha fazla eksprese olduğu gözlemlenmiştir. Romatoid artrit, inflamatuvar barsak hastalığı, Crohn hastalığı gibi inflamatuvar hastalıklarda, rinosinüzitte, *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonunda IL-32 'nin ekspresyonu incelendiğinde ise hastalık patogeneğinde önemli bir bileşen olduğu anlaşılmıştır [67-69].

IL-32, NK hücrelerini stimüle ederek, kolon kanseri ve prostat kanseri hücrelerinde DR3 ligand (APO3 ligand) ve kaspaz-3 ekspresyonuna neden olur. Bu sayede kanser hücre büyümesini inhibe ederek NK hücrelerinin efektör fonksiyonların artışı sağladığı bilinmektedir. Bu nedenle IL-32' nin pro-inflamatuvar bir sitokin olmasının yanı sıra antitümör etkisi ile kanser tedavisinde yarar sağlayabileceği düşünülmektedir [70]. IL-32' nin prognostik faktör olabileceği düşüncesiyle çeşitli hastalıklardaki ekspresyonu ve hastalık ilişkisi değerlendirilmektedir; örneğin berrak hücreli böbrek kanserinde (BHBK) IL-32 protein ekspresyonu immünohistokimyasal olarak incelenmiş ve hastaların klinikopatolojik bulgularıyla olan ilişkisine bakılmıştır. IL-32 ekspresyonunun fazla olduğu grupta 5 yıllık hastalıksız sağkalım ve tüm sağkalım oranlarının azaldığı görülmüştür. Yüksek IL-32 ekspresyonunun rekürrens sıklığını arttırdığı ve bunun hastalık için bir prognostik faktör olabileceği ileri sürülmüştür [71].

İnflamasyon ile gastrointestinal sistem arasında yakın bir ilişki olduğu bilinmektedir. IL-32' nin pro-inflamatuvar bir sitokin olması ve NF- κ B aktivasyonunda önemli bir indükleyici olması mide kanserindeki ekspresyonunu önemli kılmaktadır. IL-1, IL-6 pro-inflamatuvar sitokinleri ve IL-10 mide kanserinde prognozu belirleyen oldukça önemli sitokinlerdir. IL-32' nin immünsüpresif immünositleri (MDSC gibi) ve stromal hücrelerden salgılanan TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 sitokinleri arttırdığı bilinmektedir [63, 64]. Gastrik kanserin ilerleyen evrelerinde IL-32 ekspresyonu hastalığı daha

agresif hale getirmekte, IL-32' nin monositlerden salgılanması IL-1 β ' nin salgılanmasına neden olmaktadır [72]. Yapılan bir çalışmada IL-32' yi yüksek seviyede eksprese eden hasta grubunda IL-32' yi eksprese etmeyen gruba göre önemli ölçüde tümör volümünün arttığı, daha fazla sayıda lenf nodu tutulumunun olduğu görülmüştür. Tümör histolojisi ile bir ilişki tespit edilememiştir. Lenf nodu metastazı ve tümör derinliği gibi parametrelere ek olarak IL-32 ekspresyon düzeyinin de mide kanseri için bağımsız bir prognostik faktör olabileceği ileri sürülmüştür [73].

IL-32' nin ekspresyonunun önemli olduğu bir diğer kanser de hepatoselüler kanserdir (*HSK*). IL-32 sağlıklı karaciğer dokusunda eksprese olmakta, akut hepatit, kronik hepatit, siroz ve kanserde hastalığın evresine göre hasta serum örneklerinde ekspresyonu artmaktadır. IL-32, *HSK* dokusundaki tümör hücrelerinde hem sitoplazmada hem de çekirdekte tespit edilmiştir. NF- κ B sitokin ilişkili kanser gelişiminden sorumlu, aynı zamanda *HSK* için de önemli bir moleküldür. IL-32 α ' nın hepatoselüler kanser hücrelerinde baskılanması durumunda kanser hücrelerinin büyümesinin inhibe olduğu, kanser hücresinde Bcl-2 ve NF- κ B sinyal yollarının inaktive olarak, kaspaz-9 ve kaspaz-3 üzerinden apoptozun uyarıldığı tespit edilmiştir. IL-32 Bcl-2 inaktivasyonunu sağlamaktadır [74]. *Zhou* ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sağlıklı kontrol dokularına kıyasla *HSK*' li hasta dokularında oldukça fazla IL-32 α eksprese olduğu gösterilmiştir. Lenfatik damarlarda IL-32 eksprese eden tümör hücrelerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu nedenle IL-32' nin hepatoselüler kanserlerin metastatik gelişimini gösteren ve hastalığın progresyonu hakkında bilgi verebilen bir belirteç olabileceği düşünülmektedir [75, 76].

Yosif ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IL-32' nin özofagus tümör dokularında immünohistokimyasal olarak kuvvetli boyandığı sağlıklı dokudaki ekspresyonunun ise çok az olduğu tespit edilmiştir [77]. Özofagus tümörlerindeki IL-32' nin aşırı ekspresyonu NF- κ B ve p-p38MAPK artmasına sebep olmaktadır. Malign özofagus kanserinde IL-6, IL-1 β , TNF- α ekspresyonlarının IL-32 yüksek ekspresyonu ile ilişki içinde olduğu gözlemlenmiştir [78, 79].

İnflamasyon akciğer kanserinin gelişiminde anahtar rol oynayan faktörlerdendir. Bu yüzden inflamasyonla ilişkili etmenler özellikle de sitokinler akciğer kanseri için önemli bir yere sahiptir. IL-32 ekspresyon düzeyi akciğer kanserinin histolojik alt tipine göre değişmektedir. Histolojik alt tipler hastalığın patogenezinde önemlidir ve seçilecek kemoterapi buna göre belirlenmektedir. Lenf nodu metastazlarının IL-32 eksprese eden histolojilerde daha sık olduğu gözlenmiştir. Bu grupta IL-32' nin kaynağı CD68⁺ makrofajlar, CD4⁺T lenfositler, DC-SIGN⁺ dendritik hücrelerdir. Özellikle adeno kanser ve skuamoz kanserlerde IL-32 ekspresyonu sağlıklı dokuya göre artmakta, IL-32'nin eksprese eden tümör infiltrate lenfositlerin (TIL), IL-6, IL-8, VEGF ekspresyonunu, mikrovasküler dansiteyi artırdığı ve bunun hastalık için kötü bir prognostik faktör olduğu düşünülmektedir. IL-32 ekspresyon düzeyi metastatik küçük hücreli akciğer kanseri (*KHAK*), küçük hücreli dışı akciğer kanseri (*KHDAK*) ve skuamoz hücreli akciğer kanseri (*SHAK*) hücrelerinde farklıdır. Hastalara ait normal doku ve tümör doku IL-32 ekspresyonları incelendiğinde SHAK hücrelerinde bronşiyal epitele göre 4 kat daha az IL-32 ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı dokulara göre adenokanserde 15 kat, büyük hücreli akciğer kanserinde (*BHAK*) 12 kat, küçük hücreli akciğer kanserinde ise 13 kat daha fazla IL-32 ekspresyonu olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, IL-32 ekspresyonu akciğer kanseri alt tiplerine göre değişmekte, bunu erken lezyon veya geç lezyon olması da etkilemektedir. Tüm metastatik KHAK tümörleri IL-32 eksprese etmekte, KHDAK altiplerin de ise IL-32 ekspresyonu en çok adeno kanser alt tipinde gözlenmektedir. IL-32 negatif tümörlerin metastatik odaklarında IL-32 ekspresyonunun görülmesi IL-32 ekspresyon artışını akciğer kanseri için metastatik bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir [80].

Sağlıklı pankreas duktal hücreleri IL-32' yi az miktarda eksprese etmesine karşın kronik pankreatitte ve pankreas kanserinde duktal hücrelerde IL-32 ekspresyonunun yüksek olduğu görülmüştür. Pankreas kanserinde IL-32' nin tümör büyümesini ve sağkalımı etkilediği düşünülmektedir. *Nishida* ve arkadaşları yaptıkları çalışmada pankreas

kanseri hücrelerinde IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ ' nın IL-32 mRNA ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir [59].

Sağlıklı bir kişide serviks dokusunda immünohistokimyasal olarak IL-32 ekspresyonunun olmadığı, yüksek riskli HPV-16 ile enfekte hastalarda yapılan çalışmada ise HPV-16 E7 onkogeninin, servikste IL-32 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. HPV-16 E7 onkogenine cevap olarak COX-2 IL-32' yi stimüle etmekte ve böylelikle aşırı eksprese olan IL-32, kansere karşı inflamatuvar cevapların başlamasını sağlamaktadır [81].

Hattori ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TNF- α melanoma hücrelerinde de p38-MAPK yolağını aktive ederek, hücre siklusunun durması ve kaspaz ilişkili apoptozu desteklemektedir [82].

2.5.1. Kolon Kanseri IL-32 ilişkisi

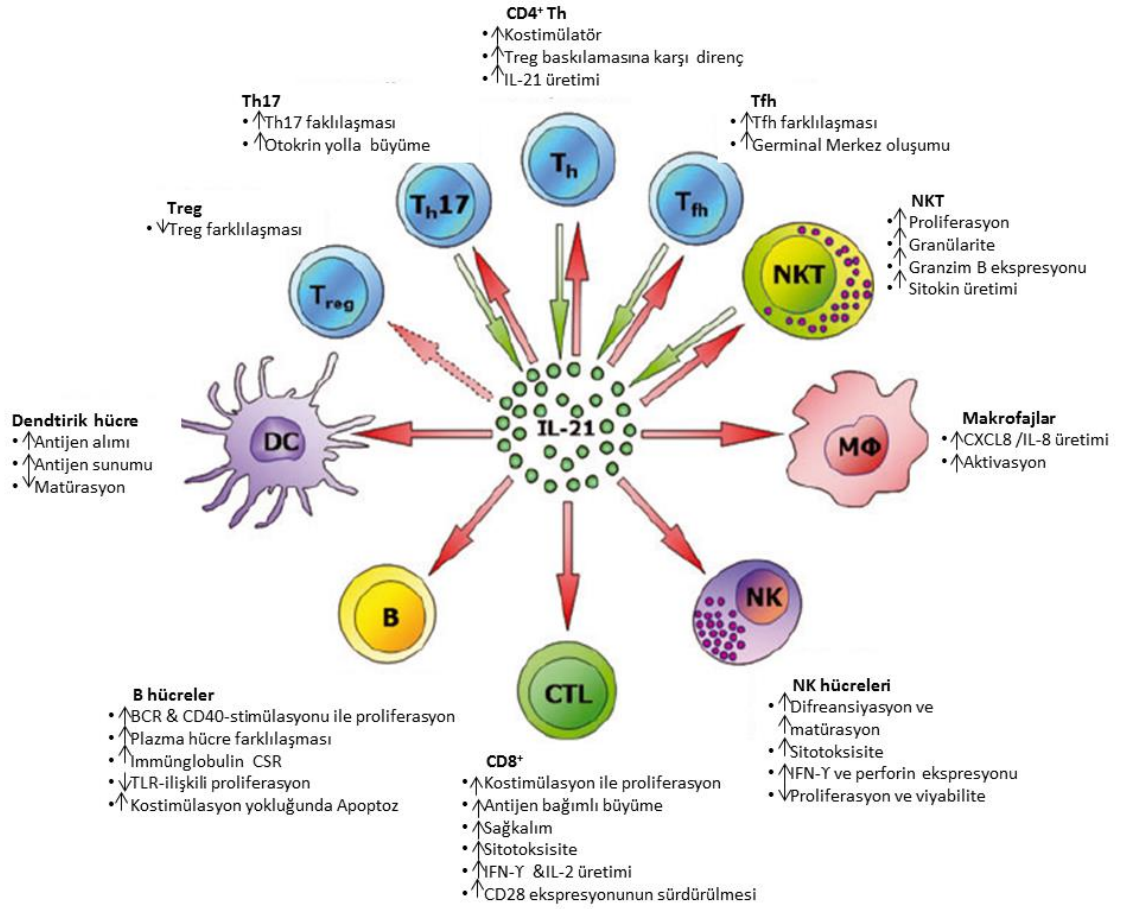
Normal kolon mukoza hücrelerinde IL-32 α ekspresyonu oldukça düşük görülmüştür. IL-32 α inflamatuvar barsak hastalığında ise yüksek düzeyde eksprese olmaktadır. HT-29, Caco-2 ve T84 hücre hatlarında herhangi bir stimülasyon olmaksızın IL-32 mRNA ekspresyonu çok düşüktür. Bu hücre hatları TNF- α , IFN- γ , IL-1 β ile uyarıldıklarında ise IL-32 mRNA ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiş, bu sitokinlerden özellikle TNF- α ' nın HT-29, T84 için oldukça güçlü bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. İntestinal epitelde IL-1 β ve TNF- α uyarımı yapıldığında NF- κ B yolağı üzerinden IL-32 α ' nın üretiminin tetiklendiği gözlemlenmiştir, inflamasyon durumunda intestinal epiteldeki IL-32 α aşırı ekspresyonu inflamatuvar bağırsak hastalığının (*İBH*) patofizyolojisi için oldukça önemlidir, hasarlı epitel hücrelerinin apoptoza gitmelerini uyararak bağırsak mukozal homeostazisini koruduğu düşünülmektedir [62].

2.6. İnterlökin 21 (IL-21)

IL-21, IL-2 sitokin ailesinin bir üyesidir. IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 ve IL-15 bu ailenin diğer üyeleridir. Bu sitokinler reseptörlerinde "Y_c reseptör kompleksi" bulundurur. IL-21 geni insan kromozomunda 4q26- q27' de, IL-2

geninden 180 kb uzaklıktadır. Matür IL-21 polipeptidi 131 aminoasit içerir ve en çok IL-15 ile benzerlik gösterir. IL-21, yardımcı T hücreler, foliküler T hücreler, Th17 ve doğal öldürücü T (NKT) hücrelerinden eksprese olur.

T hücre reseptörü (TCR) ile stimüle olmuş T hücreler IL-21' in ana kaynağı hücrelerdir. Bu hücrelerin TCR stimülasyonu IL-21R ekspresyonunu uyarır ve otokrin yolla da etki göstermesini sağlar. IL-21, T hücrelerde FoxP3 ekspresyonunu engelleyerek T Reg oluşumunu bloke eder, Th17 dönüşümünü artırır, Th17 hücrelerinden proinflamatuvar IL-6 ve IL-21 üretimini uyarır. IL-21 kendi otokrin üretimini STAT3 aktivasyonu ile sağlamaktadır T hücreler üzerinde mitojenik etki aktiviteye (proliferasyon ve efektör fonksiyon kazanması) sahiptir, [70]. Treg hücrelerinin IL-21 salgıladığına dair bir kanıt bulunmamaktadır. IL-21, B hücre kostimülasyonu ve farklılaşmasını, B hücrelerden Ig üretimini indükler fakat B hücre proliferasyonu üzerine etkisi yoktur. NK hücrelerini stimüle eder, CD⁸ T hücrelerin sitotoksik etkisini artırır, Treg hücre diferansiyasyonunu kısıtlar, epitel ve fibroblastlardan inflamatuvar mediyatörlerin salınımını indükler.



Şekil 2.8. IL-21 ve görevleri. H. Søndergaard ve K. Skak' dan uyarlanmıştır [83].

İnterlökin 21 reseptörü (IL-21R), tip 1 sitokin reseptörleri ailesindedir. IL-21R ve ortak gama zincir (γ_c , CD132) heterodimerik bir kompleks oluşturur. Ortak gama zincir, IL-2 sitokin ailesinin bütün üyelerinin reseptörlerinde bulunur. IL-21R/ γ_c kompleksi tirozin kinaz özelliği taşımaktadır. IL-21 reseptörü, IL-21 etkileşiminin ardından ailenin diğer üyeleri gibi hareket ederek JAK1 ve JAK3' ü aktive eder, ardından STAT3 aktive olur. Bunun yanı sıra STAT1 aktivasyonu ile geçici STAT5a ve STAT5b aktivasyonu söz konusu olabilir. PI-3K yolağı da IL-21 sinyali ile aktive olabilmektedir. IL-21 sinyali hücre siklusu progresyonunu, hücreyel aktivasyonu, hücre sağ kalımını artırıcı yönde katkıda bulunur. Kendisinin regülasyonunu sağlayacak siklin A/B/E, GRANZİM A/B, IFN- γ , CXCR3, CXCR6, Bcl-3, JAK-3, IL-21 ve IL-21R genlerini aktive eder [84, 85].

T hücrelerde IL-21-R' ü timositler double CD4⁺ ve CD8⁺ oluncaya kadar eksprese olmaz. IL-21-R' ü CD4⁺ ve CD8⁺ matür hücrelerde düşük seviyede bulunur, T hücre reseptörü stimülasyonu ile IL-21 reseptörünün ekspresyonu artar. NKT hücreleri ise ek bir aktivasyona gerek duymaksızın bu reseptörü eksprese eder. B hücrelerde IL-21-R' ün ilk görüldüğü aşama pre-B hücrelerdir, matür foliküler B hücreler, T hücrelere kıyasla yüksek düzeyde bu reseptörü eksprese eder, B hücre aktivasyonu ile de sayısı giderek artar.

Matür marjinal zon B hücreler IL-21R' ünü foliküler B hücrelere göre daha az miktarda eksprese eder, plazma hücreleri ise IL-21R' ünü çok az düzeyde eksprese eder. Genel olarak IL-21R aktive lenfositlerde yüksek düzeyde eksprese olur ve IL21 bu hücreler için kostimulan etki göstermektedir [86].

IL-21R olmayan farede IgG serum seviyeleri düşük, IgE seviyeleri yüksek görülmektedir. IL-21 kostimilasyonu B hücreler için güçlü bir matürasyon indükleyici protein olan *B lymphocyte induced maturation protein-1' i* (BLIMP-1) indükler, terminal farklılaşma ile plazma hücre dönüşümünü sağlar. IL-21 Bcl-6' yı indükleyerek germinal merkez B hücrelerinin, hafıza B hücrelere dönüşümünü de düzenler.

IL-21 CD4⁺ hücrelerden salınır, yardımcı foliküler T hücre (Tfh) gelişimini indükler ve germinal merkez oluşumunu uyarır. CD4⁺T hücrelerin proliferasyonunu uyarır, sağkalım avantajı ve T hücre farklılaşmasını sağlar.

CD8⁺ T hücreler, B hücrelerden sonra IL-21' e cevap veren ana hücre grubudur. TCR stimülasyonu CD8⁺ lerde de IL-21R ekspresyonunu uyarır(aktive olmuş hücrelerde etkilidir). IL-21, IL-15 ile stimüle olmuş CD8⁺ hücrelerde IFN- γ , IL-2 üretimini sağlar. Antijen bağımlı veya bağımsız uyarımlarda IL-21, proliferasyon kapasitesini sağkalımı, büyümeyi, sitotoksik aktiviteyi artırır. IL-21, IL-15 ile sinerjik olarak çalışabilir, antijen spesifik CD8⁺ T hücrelerde antijen spesifik hücre cevaplarını *in vivo* ve *in vitro* olarak artırır, TCR/CD3 kompleksi yardımıyla IL-2 ve IFN- γ üretimini uyarır [87, 88].

Dinlenme halindeki NK hücreleri IL-21R' ü oldukça düşük düzeyde eksprese eder, aktivasyonun ardından prekürsör ve matür NK hücrelerinde

IL-21 reseptörü eksprese olur. NK hücrelerinin viral partiküllerle, IL-2 veya IL-15 uyarılması NK hücresinin IL-21' e olan cevabını arttırır. IL-21 ile NK hücreleri geniş granüler fenotipe değişir ve sitotoksik aktivitesi artar ve IFN- γ üretimi ve perforin ekspresyonunu teşvik eder [89]. IL-21 NK matürasyon sürecini hızlandıran bir sitokin olmasına rağmen önceden IL-2 ve IL-15 ile stimüle olmuş NK hücrelerinin matüre olmalarını teşvik ederken proliferasyon yeteneğini kısıtlayarak apoptoza gitmelerine neden olur [83].

NKT hücreleri de IL-21' i üreten önemli bir kaynaktır. IL-21 aynı zamanda bu hücrelerde sağkalım ve proliferasyonu uyarır. IL-21 kostimülasyonu bu hücrelerin granüler morfoloji göstermelerini sağlar, granzim-B üretimini indükler ve sitokin üretimine neden olur [90].

IL-21 dendritik hücreler üzerine genel olarak inhibitör etki göstermektedir. IL-21 kemikiliği kökenli dendritik hücrelerin immatür kalmalarına neden olur, fagositik aktivitelerini arttırır fakat dendritik hücrelerin antijen sunumu yapmalarının azalmasına neden olur. Bu etkisi sebebiyle antijen spesifik T hücre cevaplarını kısıtlayarak, spesifik bir immünite gelişimini baskılanmasına neden olmaktadır [91-93].

Makrofajlar üzerinde ise proinflamatuvar etki göstererek, makrofajların CXCL8/ IL-8 üretimini indükler ve fagositik aktivitelerini arttırır [94, 95].

2.6.1.Kanser tedavisinde IL-21

Yapılan *invivo* ve *invitro* çalışmalar IL-21' in anti-tümör immün yanıtların gelişmesine yardımcı olduğunu göstermektedir. IL-21 geni ile transfekte hücre hattı kullanılarak farede oluşturulan fare kolorektal kanser modelinde, tümör hücrelerinden salınan IL-21' in tümör büyümesini azalttığı ve tümörün reddine sebep olduğu gösterilmiştir. Bu etkinin özellikle NK ve CD8⁺T hücrelerinden salınan IFN- γ ve perforin ile gerçekleştiği. CD4⁺ hücrelerinin potansiyel bir rolü bulunmadığı bildirilmiştir [96].

Transfeksiyon ile IL-21 eksprese etmesi sağlanan Melanoma ve MCA 205 fibrosarkom hücre hatları ile yapılan çalışmalarda IL-21' in anti-tümör etkisinin ortaya çıkmasında NK hücrelerinin önemli olduğu tespit edilmiştir.

CD8⁺ T' lerin ise daha az etkili oldukları, CD4⁺T' lerin ise hiçbir rolü olmadığı gözlemlenmiştir [97].

OVA-eksprese eden lenfoma modeli ile yapılan bir çalışmada ise rekombinant IL-21' in intraperitoneal enjeksiyonunun tümör büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmiş, sağkalım süresi artmıştır. IL-21' in OVA-spesifik CD8⁺ T hücrelerin sayı ve sitotoksik fonksiyonlarında artışa neden olarak IL-2 ve IL-15 ile yapılan benzer çalışmalara kıyasla daha uzun süreli bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanısıra IL-21'in tümör inokülasyonunun erken döneminde ve geç döneminde uygulanmasına göre anti-tümör immün yanıtlar araştırılmış ve IL-21 enjeksiyonunun erken dönemde tümöre karşı olan anti-tümör immün yanıtları azaltıcı etkisi olduğu görülmüştür [98].

In vivo çalışmalarda, B16 melanomalar ve renal hücreli karsinomlarda IL-21' in subkutan uygulamasının önemli ölçüde tümör büyümesini inhibe ettiği ve tümöre infiltre CD8⁺T hücre sayısını artırdığı görülmüştür [99].

Ex-vivo, CD8⁺T hücrelerin antijen spesifik olarak üretilmesi ile yapılan çalışmada IL-21 ile önceden uyarılmış CD8⁺T' hücrelerin farklılaşarak tümöre karşı yüksek seviyede aktivite göstermeleri sağlanabilirken, bu etkinin IL-2 ve IL-15 ile elde edilemediği görülmüştür [100].

IL-2, IL-21 ile aynı aileden bir sitokin olup malign melanom ve renal karsinomda klinikte kullanılan bir sitokindir, fakat IL-2' nin yan etkileri klinikte kullanımını kısıtlamaktadır [101]. Yapılan Faz 1 çalışmalarda IL-21' in yan etkileri malign melanom ve renal karsinom hastalarında araştırılmış ve IL-21' in iyi tolere edildiği görülmüştür. NK ve CD8⁺T hücrelerde granzim, perforin, IFN- γ , CXCR3 mRNA ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir [102, 103].

Ülseratif kolit, kolon ilişkili inflamatuvar hastalıkların büyük bir bölümünü oluşturur ve bu hastalığa sahip kişilerin kolon kanseri geliştirme riskleri oldukça yüksektir. Bu hastaların kanser geliştirme riskini inflamasyonun süresi, derecesi ve ciddiyeti belirler. Hastalığa sebep olan neoplastik transformasyon kesin anlaşılammış olmakla beraber tümörü infiltre eden immün hücreler ve bu hücrelerin ürettiği tümör destekleyici sitokinlerin kolon kanseri gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. *Manteleone* ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ülseratif kolitli

hastaların kolon mukozalarında IL-21' in yüksek düzeyde eksprese olduğu görülmüş, bunun Th17 cevaplarını pozitif regüle ettiği gözlemlenmiştir. İnflamatuvar barsak hastalarında yapılan çalışmalar, tümör mikroçevresinde Th17 hücrelerinin çoğunlukta olduğunu, bu hücre grubunun özellikle IFN- γ salgısı ile karakterize Th1 hücre grubunu baskılayarak, IL-12 salınımını önlediğini göstermiştir. İnflamatuvar bağırsak hastalığında hastalardan ve farede alınan bağırsak biyopsilerinde yüksek IL-21 ekspresyonu gözlenmiş, bu hastalarda görülen aşırı inflamatuvar cevapların IL-21 ile arttığı, IL-21 ekspresyonu önlendiğinde ise farede ise intestinal kolitin gelişmediği bildirilmiştir [104-107]. *Jouch* ve arkadaşlarının farede yaptıkları *invivo* çalışmada IL-21' in intestinal karsinogenezi uyardığı, bulunduğu çevrede sitokin salınım profilini Th17 yönünde değiştirdiği gösterilmiştir. Tümör destekleyici mikroçevrenin de IL-21 etkisi ile oluştuğu gözlemlenmiştir [108] [109].

IL-6, IL-23, IL-17A sitokinleri Th-17 farklılaşmasına neden olur, tümör sağ kalımı ve anjiyogenezini arttırabilir [110].

Farelerle yapılan *invivo* çalışmada IL-21 transfeksiyonu yapılmış kolon kanseri hücreleri kullanılmış, IL-21 eksprese eden tümörlerin T ve NK hücrelerini stimüle ederek anti-tümör immün yanıtların gelişimine neden oldukları gösterilmiştir [96].

Buraya kadar anlatılanlardan anlaşılacağı gibi IL-21 ve IL-32, tümör mikroçevresinde bulunan immün hücrelerden ve dokudan eksprese olurlar. Bu sitokinleri eksprese eden hücrelerin dansitesi, dolayısıyla immün reaksiyonun derecesi hakkında bilgi vermeleri açısından ve etki ettikleri immün hücrelerin tümör ile yürütülen savaşta görevleri açısından önem taşımaktadırlar. IL-21 ve IL-32 sitokinlerinin tümör dokusundaki gen ekspresyon düzeylerinin, tümörsüz dokuya göre nasıl değiştiği ise bilinmemektedir.

Kolon kanserli hastaların tümörlü ve normal dokularında bu sitokinlerin ekspresyonlarındaki değişikliğin ne yönde olduğunu saptamak ve bunun tümör evresi, diferansiyasyon, lenf nodu tutulumu, vasküler ve perinöral

invazyon ve uzak metastaz gibi klinikopatolojik parametrelerle olan ilişkisini araştırmak amacıyla bu tez çalışması planlanmıştır.

3. HASTALAR VE YÖNTEMLER

Bu araştırma için gerekli hasta doku örnekleri, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniğinde kolon kanseri tanısı ile ameliyatına karar verilen hastalardan alınmıştır. Deneysel çalışmalar ise Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Araştırmamız Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu tarafından 28-11-2012 tarih ve LUT 12/160-37 karar no ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

3.1. Hastalar

Çalışmada kolon kanseri nedeniyle opere edilen 50 hastadan alınan tümörlü ve tümörsüz kolon dokusu RNA örnekleri kullanıldı.

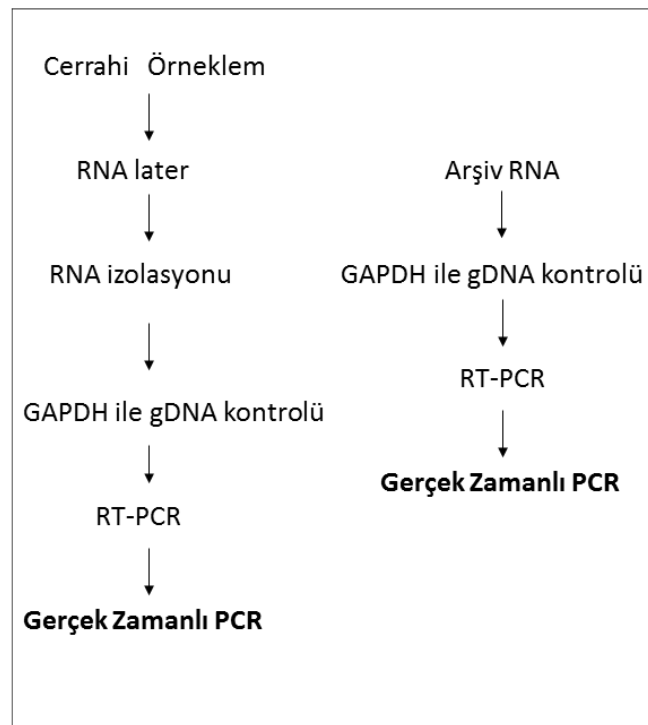
Elde edilen RNA kalitesi ve miktarı dikkate alınarak, 19 hasta değerlendirme dışı bırakıldı, yaş ortalaması 60,8 (26-79) yıl olan 31(17K) hasta IL-32, IL-21 gen ekspresyon düzeyine bakılmak üzere çalışmaya dahil edildi. Ancak bu hastalardan 3'ünde stok RNA tükendiği için IL-21 düzeyi çalışılamadı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların tümünden imzalı bilgilendirilmiş onam formları alındı. Ameliyatların tümü aynı cerrahın kontrolünde aynı ekiplerce yapıldı. Hazırlanan protokol gereği hastalardan alınan 1 cm³ doku örneği 2 ml RNAlater (*Ambion, ABD*) içinde soğuk zincire uygun olarak Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji AD'na transfer edildi.

3.2. Doku Lizisi ve Homojenizasyonu

Çalışma protokolüne (Şekil 3.1) uygun olarak alınan ve – 80°C de saklanan doku örnekleri, RNA izolasyonu için parçalanarak homojenize edildi. Bunun için Mini Bead-Beater 8 (*Biospect, ABD*) doku lizis cihazı kullanıldı. Kapağı vidalı 2,5 ml hacmindeki tüpler yarıya kadar steril zirkonyum bilyeler (*Biospect, ABD*) ile dolduruldu. Üzerine RNeasy Midi Kit (*Qiagen, ABD*) içinde bulunan lizis tamponu eklendi. Daha sonra RNAlater

içinde saklanan doku 250 mg olacak şekilde tartılarak bistüri ile küçük parçalara ayrıldı ve tüplere ilave edildi. Mini Bead-beater 8 cihazı ile homojenizasyon modunda 30 sn işlem gördükten sonra tüpler 5000rpm'de 5 dk santirüj edildi. Üst tarafta toplanan şeffaf kısım 15ml'lik tüplere aktarıldı ve bu işlem ilk tartımdaki dokunun miktarı göz önünde tutularak 2-3 kez tekrarlandı (firma önerisi 250 mg doku için 4ml lizis buffer). En son 15 ml tüp ve doku lizatının hepsi bilyeleriyle birlikte 20 °C'de 5000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Bundan sonraki tüm sanrifüjler 20 °C sıcaklıkta yapıldı.



Şekil 3.1 Çalışma protokolü

3.3. RNA İzolasyonu

Doku homojenizasyonundan sonra bilye ve doku parçalarının üzerinde kalan berrak sıvı 15 ml'lik yeni bir tüpe alındı ve RNA izolasyonuna geçildi. İzolasyon RNeasy Midi Kit (*Qiagen, ABD*) talimatlarına uyularak yapıldı.

- Lizat miktarı kadar %70' lik etanol tüpe ilave edilerek 5 saniye boyunca vorteks cihazında karıştırıldı. Bu karışım kitin içinden çıkan özel

silika membranlı tüplere aktarıldı, 5000 rpm 5 dk santrifüj edildi. Membrandan geçip toplama tüpüne sızan kısım atıldı.

-2ml RW1 tamponu kolona eklendi. 5000 rpm 'de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlemde sonra izole edilecek RNA' lardaki olası DNA kontaminasyonunu gidermek ve daha kaliteli RNA elde etmek için ara basamak DNase I işlemi uygulandı. Bunun için RNase-Free DNase Set (*Qiagen, ABD*) kullanıldı. Her kolona; 10 µl DNase I stok solüsyon (*Qiagen, ABD*) ve 70µl RDD buffer (*Qiagen, ABD*) olacak şekilde eklendi.

-DNase I ve RDD buffer kolon sayısına göre hazırlandı, yavaşça pipetlenerek karışımın homojen olması sağlandı.

- 80 µl DNase I inkübasyon karışımı direkt silika membranın üzerine eklendi, 15 dk oda sıcaklığında beklendi.

-2 ml RW1 buffer tüplere eklendi, 5 dk beklendi. Sonra 5 dk 5000 rpm'de santrifüj edildi, alta geçen kısım atıldı.

-2,5ml RPE buffer ile 2 dk 5000rpm'de santrifüj edildi. 2,5 ml RPE buffer ile 5 dk 5000 rpm'de santrifüj edildi.

-Son basamakta kolonlar yeni RNase-free toplama tüplerine alınarak numaralandırıldı. İzolasyona başlanan dokunun ağırlığına göre RNase-free su miktarı kit önerilerine uygun olarak ayarlandı ve silika membranın üzerine bırakılıp 5 dk beklendi. Sonra 5000 rpm 'de 3 dk santrifüj edildi.

3.4. RNA Konsantrasyonu Ölçümü

RNA kalitesinin belirlenmesi ve miktarının ölçülmesi için NanoDrop 1000 (*Thermo, ABD*) cihazı kullanıldı. UV-spektrofotometrik olarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarında optik dansite ölçümleri yapıldı. Ölçüm için 1,5 µl RNA kullanıldı. Kalite standartı olarak A_{260}/A_{280} oranının 1,9-2 olmasına dikkat edildi ve kantitasyon değeri ng/µl olarak verildi.

3.5. RNA Örneklerinde Genomik DNA (gDNA) Kontrolü

Tüm eski stok ve yeni stok RNA' larda genomik DNA kontaminasyonu olup olmadığı araştırıldı. Bunun için GAPDH geni kullanılarak konvansiyonel

polimeraz zincir reaksiyonu (PZR, PCR) yapıldı. GAPDH PCR koşulları optimize olduğu için hemen uygulamaya geçildi. PCR' da DNA yerine RNA kullanıldı. Buradaki amaç RNA ile birlikte izole edilen gDNA' yı tesbit etmektir. GAPDH genine ait PCR bileşenleri ve koşulları tablo 3.1 ve tablo 3.2 de verilmiştir.

Tablo 3.1 gDNA kontaminasyon kontrolü için GAPDH konvansiyonel PCR bileşenleri.

Bileşenler	Miktar	Son konsantrasyon
Taq Buffer 10X	2,5 µl	1X
MgCl₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 µM
dNTP (2 mM)	2,5 µl	0,2 mM
Primer F (2,5 µM)	2 µl	0,2 µM
Primer R (2,5 µM)	2 µl	0,2 µM
ddH₂O	11 µl	
Taq DNA Polimeraz (5u/ ul)	0,5 µl	0,1 unite
RNA	2 µl	
Toplam	25 µl	

Tablo 3.2. GAPDH konvansiyonel PCR koşulları.

İlk Denatürasyon	95 ⁰ C	5 dk	
Denatürasyon	95 ⁰ C	30 sn	} 40 döngü
Bağlanma (annealing)	60 ⁰ C		
Uzama (extension)	72 ⁰ C	30 sn	
Son uzama	72 ⁰ C	10 dk	

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerini görüntülemek için %2' lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz (*Sigma, ABD*) 1 gr tartıldı ve üzerine 1X TBE (Triss Borate EDTA) tampon çözeltisi 50 ml eklendi. Mikrodalga fırında 800 W, 2 dk kaynatıldı, agarozun tamamen çözünmesi sağlandı. DNA, cDNA gibi moleküllerin ultraviyole (UV) altında görünür hale gelmesini sağlayacak olan 5 mg/ml konsantrasyondaki

etidyum bromür (*Sigma, ABD*) solüsyonundan agaroz jele 3 µl eklendi. Agaroz jel, tarakları takılan jel tabağına döküldü ve donması bekledi. Jel tamamen donduktan sonra taraklar ve sınır bantları çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünlerinden 20 µl alındı ve 6x yükleme tamponu (*MBI Fermentas, ABD*) ile son konsantrasyon 1x olacak şekilde karıştırıldı. Daha sonra da jelde bulunan kuyulara yüklendi. DNA büyüklüğünü baz çifti (bp) olarak gösteren, 50 bp DNA ladder da (*MBI Fermentas, ABD*) jele yüklendikten sonra 120 v sabit akımda 30 dk elektroforez yapıldı. Elektroforez işlemi bittikten sonra UV translüminatör (*Macrovue, LKB, ABD*) kullanılarak jelin fotoğrafı çekildi. GAPDH pozitif bant veren RNA örnekleri gDNA kontamine kabul edilerek temizlenmek üzere ayrıldılar.

Solüsyonlar:

1x TBE:

tris base	54 gr	(Sigma,ABD)
Borik asit	27,5 gr	(Merck,Almanya)
0,5M EDTA	20 ml	(Sigma,ABD) karıştırılarak ddH ₂ O ile 1 lt' ye tamamlanır.

6x DNA ladder:

DNA ladder	1 µl
6x yükleme tamponu	1 µl
ddH ₂ O	4 µl

3.7. gDNA ile Kontamine RNA Örneklerinin Temizlenmesi İşlemi

Gerçek zamanlı PCR'da kullanılacak RNA örneklerinin saf ve yüksek kalitede olması sağlıklı sonuçlar elde edilmesi açısından önemlidir. RNA'nın gDNA içermesi gen ekspresyon düzeylerinin gerçekte olduğundan daha yüksek çıkmasına neden olabilir.

Bu nedenle gDNA kontaminasyonu tesbit edilen RNA örneklerinin DNase I enzimi kullanılarak temizlenmesi gerekir. Bizde DNA-Free RNA Kit (Zymo Research, USA) kullanılarak RNA örneklerimizi gDNA'dan temizledik. Bu

sırada konsantrasyonu düşük olan RNA örnekleri de kitin özelliğinden yararlanılarak konsantre edildi. Aynı zamanda bu işlemler sırasında RNA'lar organik madde içeriğinden de temizlenmiş oldu ve kaliteleri arttı. İşlem optimizasyonu sırasında kitin önerdiğinden daha fazla DNase I enzimi kullanılmak zorunda kalındı ve kitin içeriğindeki enzime ek olarak RNase free-DNase I (*Ambion, Life Technologies, ABD*) ve Zymo Resarch DNase I (*Zymo Research, USA*) enzimleri satın alındı.

İşlem basamakları:

- Total RNA miktarı 5000 ng' ı geçmeyecek şekilde her örneğe göre değişen miktarlarda RNA hazırlandı ve aşağıda belirtilen reaktiflerle karışım hazırlandı.

RNA	20 µl
DNase I enzim	6 µl
10 x DNase I buffer	8 µl
RNase free ddH ₂ O	5 µl
Toplam	49 µl

- Karışım tüpleri çok yavaş 2 sn vortekslendi ve önceden hazırlanmış su banyosunda 37°C' de 50 dk inkübe edildi.

- İnkübasyon bittikten sonra 100 µl RNA binding buffer ve 150 µl %95 etil alkol her bir mix tüpüne eklenerek 5 saniye vortekslendi.

-Karışım kit içinden çıkan Zymo-spin kolonlara aktarıldı ve 9000 rpm'de 1,5 dk santrifüj edildi. Altta toplanan kısım atıldı.

-400 µl RNA prep buffer eklendi, 9000rpm'de 1,5dk santrifüj edildi. Altta toplanan kısım atıldı.

-800 µl RNA wash buffer eklendi, 9000rpm' de 30 sn santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı kısım atıldı.

-400 µl RNA wash buffer eklendi 1,5 dk santrifüj edildi.

-Kolon temiz bir tüpe alınıp hiç bir şey eklenmeden 9000 rpm' de 2,5 dk santrifüj edildi, bu tüp atıldı.

-Yeni bir 1,5 ml' lik tüpe kolon geçirildi, üzerine başlangıçta ölçülen RNA miktarına uygun RNase-free su ilave edildi. Başlangıç RNA miktarı 5000 ng olan tüpler için 23 µl, başlangıç miktarı 1000-2500 olan RNA için 12-15 µl ddH₂O kullanıldı. Suyun eklenmesinden sonra membranın her bölgesine suyun homojen ulaşabilmesi için 5 dk oda sıcaklığında beklendi ve 8100 rpm de 1dk santrifüj edildi. Tüpte toplanan RNA, tekrar kolona konulup son işlem tekrar edildi.

-RNA konsantrasyonu, 1,5 µl RNA ile Nano Drop 1000 (*Thermo, ABD*) cihazında ölçüldü.

3.8. DNase I İşlemi Sonrası gDNA Kontrolü

DNase I işlemi yapılmış RNA örneklerinde gDNA kontaminasyonu, tekrar konvansiyonel PCR yapılarak kontrol edildi. PCR ürünleri jel elektroforezi yardımıyla görüntülenerek, temizliği yapılan RNA örneklerinin gDNA kontaminasyon durumu test edildi. GAPDH primerlerii kullanıldı. Kontamine çıkanlar tekrar temizlenmek üzere ayrıldı.

Çalışmaya başladığımız 50 hasta RNA' sının 44' ü gDNA kontamineydi. Stok RNA' ların büyük çoğunluğu tek seferde temizlenemedi, bazı RNA stokları 6 defa yukarıdaki protokol ile işlem gördükten sonra kaliteli ve çalışmaya katılabilecek hale geldi. Bu işlemler sırasında bazı hastaların ana stok RNA' ları çok azaldı, bitti veya optimum sayıda cDNA çıkamayacak durumda olduğu için çalışma dışı kaldı. Temizlenen RNA ve ölçümleri yapılmış RNA'lardan bundan sonraki aşamada yöntemi cDNA sentezi yapıldı.

3.9. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Projede çalışılacak genlerin ekspresyon düzeylerini saptayabilmek amacıyla RNA' lar cDNA' ya çevrildi. RT-PCR için Revert Aid First Strand cDNA Syntesis kit (*Thermo, ABD*) kullanıldı. Her örnek için total 800 ng RNA kullanılarak cDNA elde edildi. RNA örneklerinin her birinden 4 tüp cDNA çevrimi yapıldı. RT-PCR için kullanılan bileşenler ve işlemler aşağıda verilmiştir.

1.aşama

Bileşen	Miktar	Son konsantrasyon
RNA	800 ng	0,04 µg/µl
Oligo (dt)	1 µl	0,5µM
ddH ₂ O	12 µl' ye tamamlandı.	

Koşullar her bir tüp için tek tek hazırlandı, 70⁰ de 5 dk inkübe edildi.

2.aşama

Reaksiyon buffer (5X)	4 µl	1X
dNTP (10mM)	2 µl	1mM
Ribonükleaz inhibitör (20u/ul)	1 µl	1u/ul
Reverse Transkriptaz (200u/ µl)	1 µl	10u/ul
<hr/>		
Toplam	20 µl	

Karışım toplam tüp sayısı göz önünde bulundurularak hazırlanıp her bir tüpe 8 µl eklendi. 42⁰C' de 60 dk, 70⁰ C' de 10dk inkübe edildi, elde edilen cDNA' lar kullanılıncaya kadar -20⁰ C'de buzdolabında saklandı.

3.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları için öncelikle IL-32 ve IL-21 için primer tasarımı yapıldı (Tablo 3.3). Bu primerler IL-21 ve IL-32 genlerine ait primerlerin optimizasyonu öncelikle konvansiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile yapıldı. En iyi PCR ürünü elde edilinceye kadar denemeler yapıldı. IL-32 ve IL-21 geninin bağlanma (annealing) sıcaklığı **61⁰C** olarak bulundu. GAPDH geninin bağlanma derecesinin **60⁰C** olduğu daha önceki araştırmadan bilindiği için optimizasyona gerek duyulmadı.

Tablo 3.3. IL-21, IL-32, GAPDH genlerine ait primer dizileri

Gen	Primer baz dizilimleri (5'-3')	Kromozom	PCR ürünü	Gen ID No.
GAPDH	F: GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT R: CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA	12p13	143 bp	NM_021803.3
IL-32	F: GAGCTGGAGGACTTCAAAGAG R: ATCCGGGACAGGGGATCTGTTG	16p13.3	141 bp	NM_002046.5
IL-21	F: CAAACTGTAAGTGGTCAGCT R: CTGCATTTGTGGAAGGTGGT	4q26- q27	132 bp	NM_001012631.1

PCR bileşenleri olarak 10X buffer, MgCl₂ (MBI Fermentas, ABD), Taq polimeraz (MBI Fermentas, ABD) ve IL-32, IL-21, GAPDH genlerine ait Forward (F) ve Reverse (R) primerler kullanıldı. Bu bileşenlerden uygun miktarda kullanılarak örnek sayısına yetecek miktarda karışım hazırlandı ve her tüpe 20 µl dağıtıldı. Tüplere 5 µl DNA eklenerek termal cykler da PCR reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo 3.4 ve Tablo 3.5)

Primerlere ait uygun bağlanma sıcaklıkları bulunduktan sonra gerçek zamanlı PCR'da optimizasyon deneylerine devam edildi.

Tablo 3.4 IL-32 ve GAPDH konvansiyonel PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar	Son konsantrasyon
Taq Buffer 10X	2,5 µl	1X
MgCl₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (2 mM)	2,5 µl	0,2 mM
Primer F (2,5 µM)	2 µl	0,2 µM
Primer R (2,5 µM)	2 µl	0,2 µM
ddH₂O	8 µl	
Taq DNA Polimeraz (5u/ ul)	0,5 µl	0,1 ünite
Kalıp DNA	5 µl	
Toplam	25 µl	

IL-21 geni için kullanılan primerlerde sıkıntı yaşandı. İlk gelen primer degrade olduğu için ürün amplifikasyonu olmadı. İkinci gelen primer ile

yapılan optimizasyon çalışmalarında primer dimerin yok edilememesi nedeniyle ve 3. primer tasarımı yapıldı. Bu primer optimiz edildi ve çalışmaya bununla devam edildi.

Her üç gene ait PCR koşulları gerçek zamanlı PCR' da kullanılanlar ile aynıydı (Tablo 3.8 ve Tablo 3.9).

Tablo 3.5. IL-21 konvansiyonel PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar	Son konsantrasyon
Taq Buffer 10X	2,5 µl	1X
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (2 mM)	2,5 µl	0,2 mM
Primer F (2,5 µM)	1,5 µl	0,15 µM
Primer R (2,5 µM)	1,5 µl	0,15 µM
ddH ₂ O	8 µl	
Taq DNA Polimeraz (5u/ ul)	0,5 µl	0,1 ünite
<u>cDNA</u>	<u>5 µl</u>	<u>0,2mM</u>
Toplam	25 µl	

3.11. Gerçek-Zamanlı PCR (*Real Time PCR*, qPCR)

Primerlerin bağlanma sıcaklıkları bulunduktan sonra gerçek zamanlı PCR aşamasına geçildi. Gen ekspresyon düzeylerini ölçmek için tümörlü ve normal dokulardan izole edilmiş olan RNA' lardan elde edilen cDNA' lar kullanıldı. Herbir gen için eşit miktarda cDNA kullanılarak qPCR yapıldı. Florasan boya olarak Sybr-green I kullanıldı. Light Cycler-DNA Master SYBR–GreenI (*Roche Diagnostics, Almanya*) kiti kullanıldı. PCR reaksiyon bileşenleri karışım hazırlanmadan önce vortekslendi, santrifüj edildi. Her üç gene ait gerçek-zamanlı PCR bileşenleri Tablo 3.6 ve Tablo 3.7' de görülmektedir.

Tablo 3.6. IL-32 ve GAPDH genleri için gerçek zamanlı PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar	Son konsantrasyon
DNA Master Sybr (10x)	2 µl	1X
MgCl₂ (25mM)	0,8 µl	2mM
Primer F (2,5 µM)	1,5 µl	0,1875 µM
Primer R (2,5 µM)	1,5 µl	0,1875 µM
ddH₂O	10,2 µl	
cDNA	4 µl	
Toplam	20 µl	

*Master mix 1mM MgCl₂ içermektedir.

Tablo 3.7 IL-21 geni için gerçek zamanlı PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
DNA Master Sybr (10x)	2 µl	1X
MgCl₂ (25mM)	0,8 µl	2mM
Primer F (2,5 µM)	1 µl	0,125 µM
Primer R (2,5 µM)	1 µl	0,125 µM
ddH₂O	11,2 µl	
cDNA	4 µl	
Toplam	20 µl	

*Master mix 1mM MgCl₂ içermektedir.

cDNA dışında kalan PCR bileşenleri ile örnek sayısına uygun olarak bir karışım hazırlandı. Her bir tüpe bu karışımdan 16 µl kondu. Daha sonra her bir tüpe 4 µl cDNA örneği eklendi. Rotor-Gene Corbet 6000 (ABD) kullanılarak gerçek zamanlı PCR yapıldı. Genler için optimize edilmiş sıcaklıklarda çalıştırıldı. IL-21, IL-32 ve GAPDH genlerine ait PCR koşulları Tablo 3.8 ve 3,9' da verilmiştir.

Tablo 3.8 GAPDH ve IL-21 genleri için gerçek zamanlı PCR koşulları

İlk Denatürasyon:	95°C	10 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	} 45 döngü
Bağlanma (annealing)	60°C	30 sn	
Uzama (extension)	72°C	30 sn	
Son uzama	72°C	10 dk	

Tablo 3.9 IL-32 için gerçek zamanlı PCR koşulları

İlk Denatürasyon:	95°C	10 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	} 45 döngü
Bağlanma (annealing)	61°C	30 sn	
Uzama (extension)	72°C	15sn	
Son uzama	72°C	10 dk	

Ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak semi-kantitatif olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar, tümörlü dokuda gen ekspresyonunun tümörsüz dokuya göre (rölatif) kaç kat değiştiğini ifade etmektedir [111]. Normalizasyon için GAPDH housekeeping geni kullanıldı. Gerçek zamanlı PCR sırasında her örneğin amplifikasyonunun eksponansiyel faza geçtiği an 'eşik siklus' (*threshold cycle*, *Ct*) değeri olarak alındı ve formüldeki yerine konularak hesaplamalar yapıldı. Hastaların her dokusuna ait örneklerden, her gen için iki tekrar olacak şekilde çalışıldı.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{hedef}} - \Delta Ct_{\text{kontrol}})}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct_{\text{hedef}} - Ct_{\text{referans}}) - (Ct_{\text{kontrol}} - Ct_{\text{referans}})]}$$

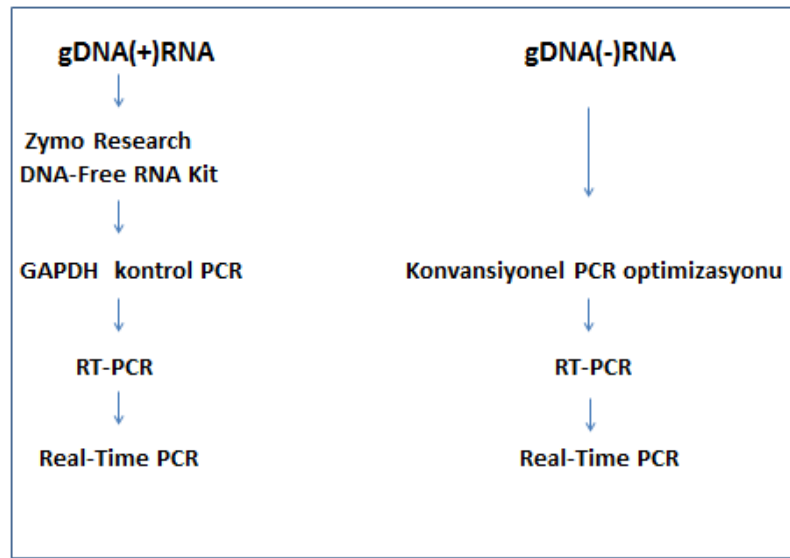
3.12. İstatistik Analiz

Hastalardan ve laboratuvar çalışmalarından elde edilen tüm veriler SPSS 18 for Windows programı (*SPSS, Chicago, USA*) kullanılarak analiz edildi. Tanımlayıcı veriler ortanca (range) kullanılarak ifade edildi. Tamamlayıcı veriler ile IL-32, IL-21 arası ilişki Fisher Exact Probability test kullanılarak değerlendirildi. Her iki genin de ekspresyon düzeylerinin dağılımı normal olmadığından değerlendirme nonparametrik testler kullanılarak yapıldı. Klinikopatolojik özellikler ve gen ekspresyon düzeyleri arasındaki karşılaştırmalar yerine göre Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis testleri kullanılarak yapıldı. Klinikopatolojik değişkenler ile IL-32, IL-21 gen ekspresyon düzeyleri arası korelasyon Spearman Correlation Coefficients kullanılarak değerlendirildi. P değerinin 0.05 in altında olması ($p < 0.05$) durumunda sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

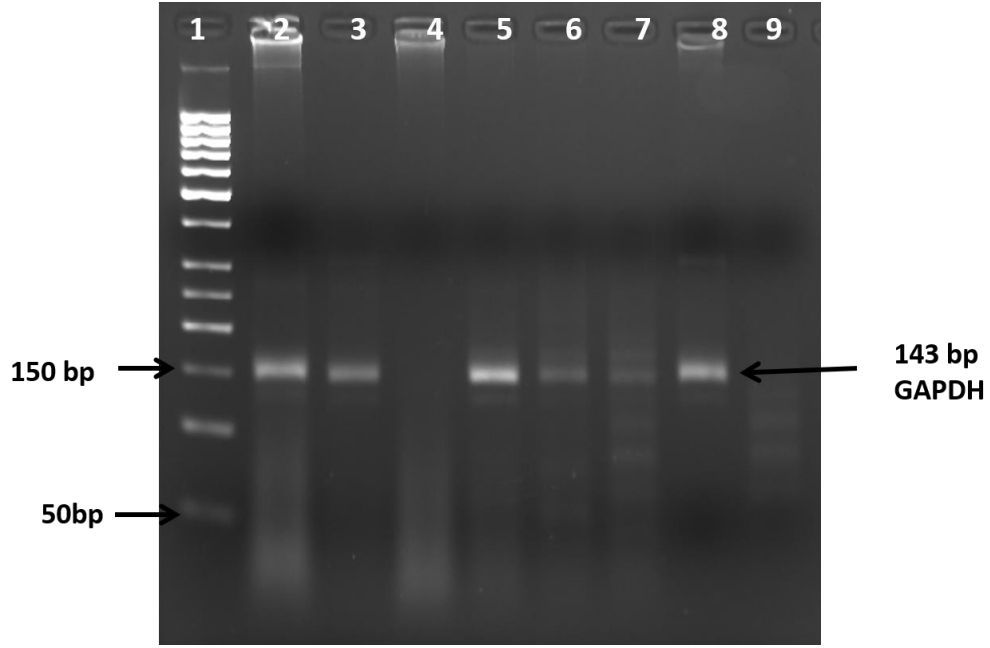
4.1. RNA Örneklerinde genomik DNA (gDNA) Kontaminasyon Kontrolü

Tümörlü ve tümörsüz dokudan elde edilen RNA örnekleri daha önceki bölümde anlatıldığı şekilde PCR yapılarak RNA' larda gDNA kontaminasyonu test edildi. RNA stoklarının kontaminasyon durumlarına göre Şekil 4.1. deki basamaklar izlendi.



Şekil 4.1. RNA izolasyonu sonrası deney akışı

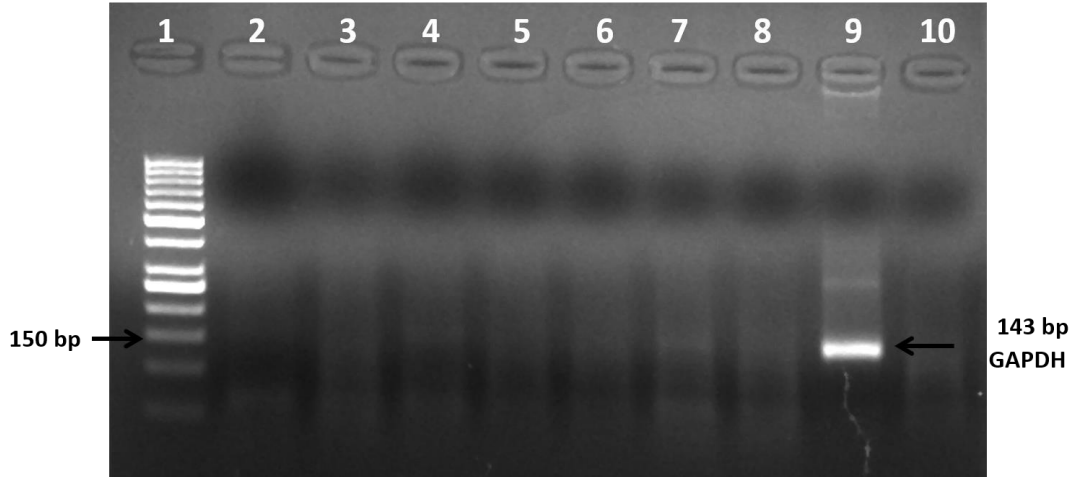
Çalışmaya başladığımız 50 hasta RNA örneğinin 44' ünde gDNA kontaminasyonu vardı. Diğer 6 tanesi gDNA bakımından temizdi (Şekil 4.2). Stok RNA'ların büyük çoğunluğu tek seferde Dnase I ile işlem gördükten sonra çalışmaya katılabilecek hale geldi.



1) Ladder (50bp), 2-3-5-6-7) gDNA kontamine RNA, 4)Temiz RNA, 8) pozitif kontrol 9) Negatif kontrol, bp: baz çifti.

Şekil 4.2 gDNA ile kontamine olan RNA örneklerinin jel görüntüsü

RNA örneklerinin bir bölümü cDNA çevrimine yetecek RNA konsantrasyonuna sahip olmamaları , gDNA ile kontamine olmaları veya kalitelerinin çalışılmayacak kadar düşük olması nedeniyle temizlenip konsantre edildi. Bu işlemler sırasında bazı hastaların ana stok RNA' ları çok azaldı, bitti veya cDNA elde edilemeyecek durumda olduğu için çalışma dışı bırakıldı. Zymo DNA- free RNA kit ile işlem gören RNA' nın , kontaminasyon açısından değerlendirilebilmesi için tekrar PCR yapıldıktan sonra jel lektroforezi ile kontrolü yapıldı. Jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.3' de görülmektedir.



- 1) Ladder, 2-8) gDNA'dan temizlenen RNA örnekleri, 9) Pozitif kontrol, 10) Negatif kontrol, bp: baz çifti.

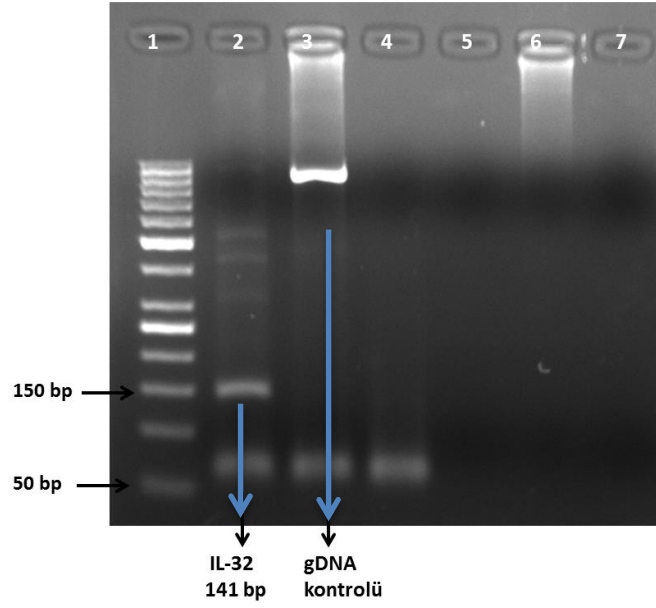
Şekil 4.3. Genomik DNA temizliği yapılmış RNA örnekleri.

4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Optimizasyonları (PZR, PCR)

IL-21 ve IL-32 genleri için primer tasarımı yapıldı. IL-32 için tasarlanan primerler çalıştı ve 61°C bağlanma (annealing) sıcaklığı konvansiyonel PCR ile bulundu. IL-21 için tasarlanan ilk primer fabrika çıkışı hatalı olarak geldi, çalışmadığı için tekrar primer tasarlandı. İkinci primer çalışmasına rağmen primer dimerden kurtulamadığımız için optimizasyon üçüncü primer tasarlanarak yapıldı. Gerçek-zamanlı PCR' a bu primer ile devam edildi. Gerçek-zamanlı PCR (qPCR) aşamasına geçmeden önce konvansiyonel PCR' da GAPDH, IL-32, IL-21 primerlerin çalışıp çalışmadığı test edildi. Primerlerin annealing derecesi optimizasyonu, MgCl₂ titrasyonu ve primer titrasyonları her gen için ayrı ayrı yapıldı.

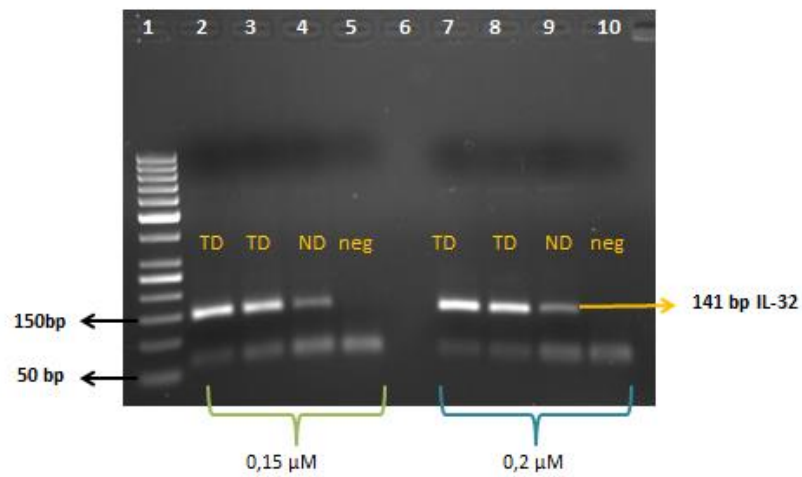
4.2.1. IL-32 optimizasyonu

Öncelikle konvansiyonel PCR ile primerin bağlanma sıcaklığı tesbit edildi. 61 °C 'de PCR ürünü olduğu tesbit edildi (Şekil 4.4). Primer titrasyonu yapıldı (Şekil 4.5).



1) Ladder, 2) IL-32 PCR ürünü 3) gDNA örneği 4) Negatif kontrol, bp: baz çifti.

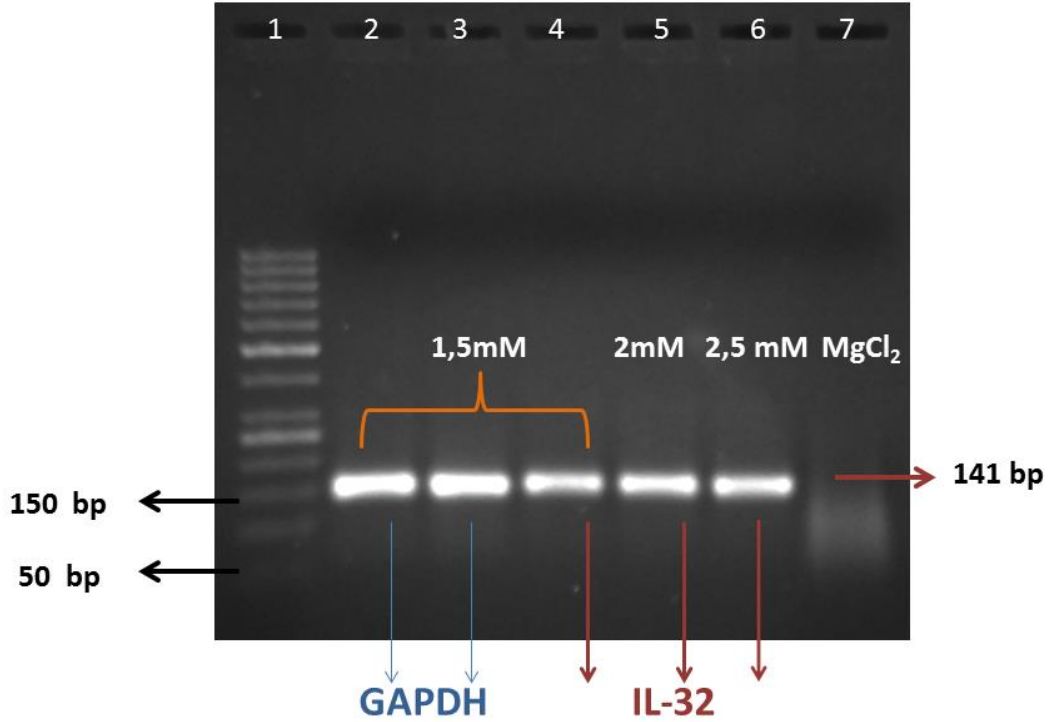
Şekil 4.4. IL-32 gen optimizasyonunda konvansiyonel PCR jel görüntüsü.



1) Ladder, 2-4) 1,75 pmol primer, 5) Negatif kontrol, 7-9) 1,5pmol primer 10) Negatif kontrol
TD:Tümör dokusu ND: Normal doku, bp: baz çifti.

Şekil 4.5. IL-32 konvansiyonel PCR primer titrasyonu.

PCR ürünün maksimum elde edildiği koşullarda gerçek-zamanlı PCR optimizasyonuna geçildi. Primer-dimerin bulunmadığı ve maksimum ürünlerin elde edildiği koşullar tespit edildi (Şekil 4.6).

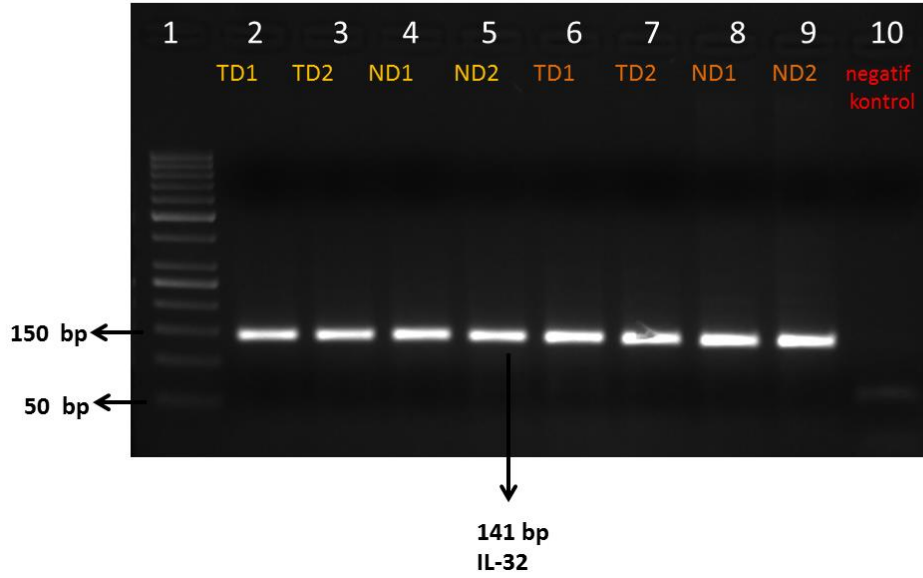


1) Ladder 2-3) GAPDH primeri-1,5 mM MgCl₂ 4) IL-32 primeri-1,5mM MgCl₂ IL-32 5) IL-32 primeri-2mM MgCl₂ 6)2,5mM MgCl₂ IL-32, 7) Negatif kontrol, bp: baz çifti

Şekil 4.6. qPCR'da GAPDH ve IL-32 primerleri ile MgCl₂ titrasyonu.

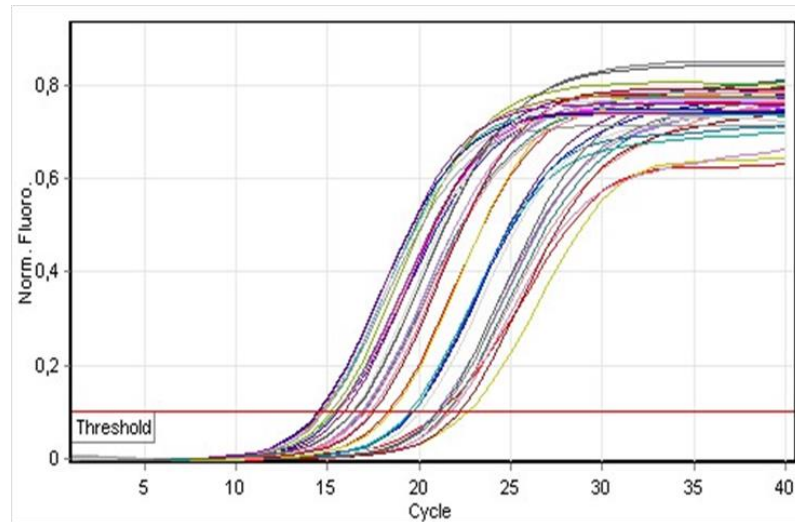
IL-32 optimizasyonları tamamlandıktan sonra cDNA' ları elde edilen hastaların qPCR reaksiyonları yapıldı. Her doku için birden fazla cDNA elde edildi ve çift örnekle gerçek-zamanlı PCR yapıldı.

Reaksiyonların sonunda, reaksiyondan seçilen hastalar ve reaksiyonun negatif kontrolü primer-dimer açısından jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 4.7).



1) Ladder, 2-3) 1.hasta tümör dokusu 4-5) 1.hasta normal doku 6-7) 2. hasta tümör dokusu 8-9) 2. Hasta normal doku, 10)Negatif kontrol. TD:Tümör dokusu, ND: Normal doku, bp: baz çifti

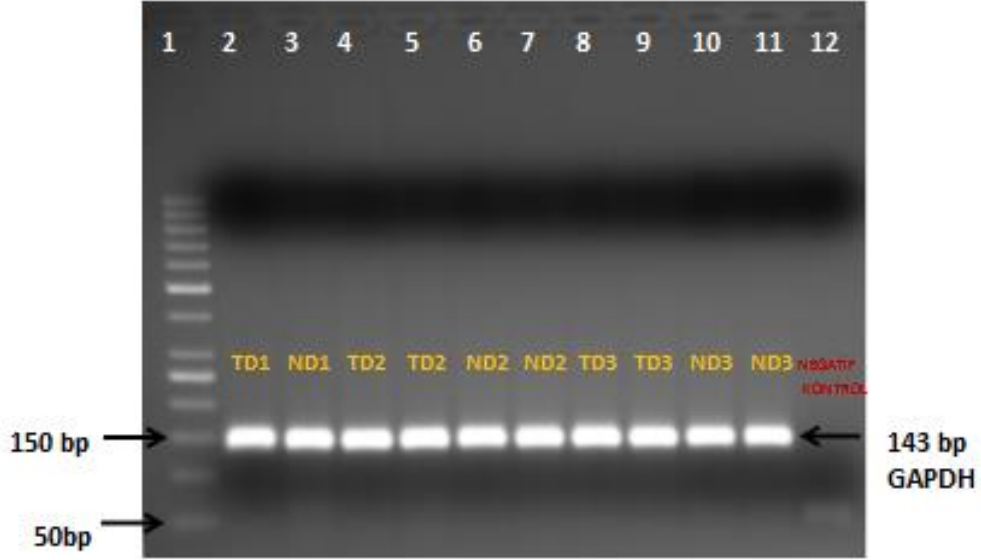
Şekil 4.7. qPCR sonrası IL-32 ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 4.8. qPCR da PCR ürünü eğrileri

4.2.2. GAPDH Optimizasyonu

GAPDH daha önce yapılan araştırmalarda kullanılan ve optimize bir primerdi. Hasta cDNA örnekleri hazırlandıktan sonra hemen qPCR'ları yapılarak ekspresyon düzeyleri hesaplandı.

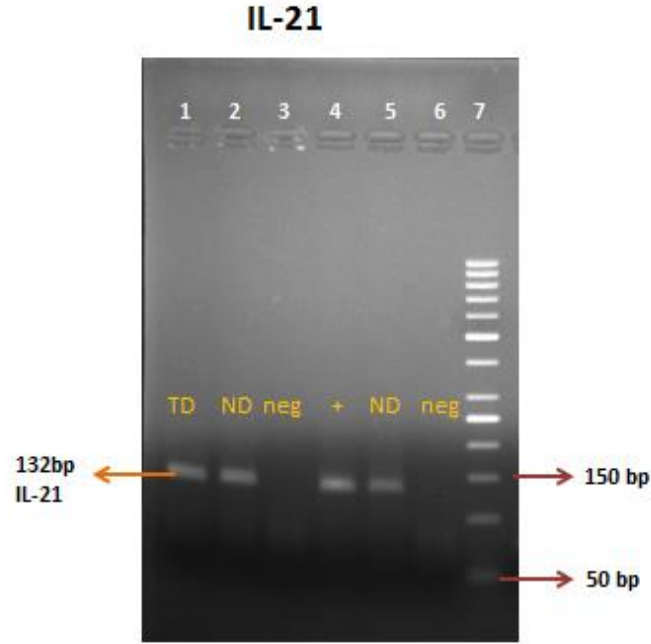


1) Ladder, 2-4-5-8-9) Tümör doku örnekleri, 3-6-7-10-11) Normal doku örnekleri, 12) Negatif kontrol. TD: Tümör dokusu, ND: Normal, bp: baz çifti

Şekil 4.9. qPCR sonrası GAPDH PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü

4.2.3. IL-21 Optimizasyonu

IL-21 geninin PCR optimizasyonları da aynı aşamalardan geçilerek tamamlandı. Primer-dimersiz PCR ürünü elde edildikten sonra hasta örneklerinin qPCR'ları yapıldı.



1) Hasta Tümör doku örneği 4) Pozitif kontrol, 5) Normal doku örneği 3-6) Negatif kontrol 7) Ladder. TD: Tümör dokusu ND: Normal doku, bp: baz çifti

Şekil 4.10. qPCR sonrası IL-21 PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü.

Her üç genin eşit miktarda cDNA örneği kullanılarak yapılan qPCR ürünleri jel elektroforezinden sonra görüntülendiğinde IL-32 ve IL-21 ekspresyon düzeyleri arasında gözle görülür bir fark vardı. IL-32 gen ekspresyon düzeyi kolon dokusunda IL-21 ekspresyonundan daha fazlaydı.

4.3. Doku örneklerinde IL-21 ve IL-32 Gen Ekspresyonu Düzeyleri

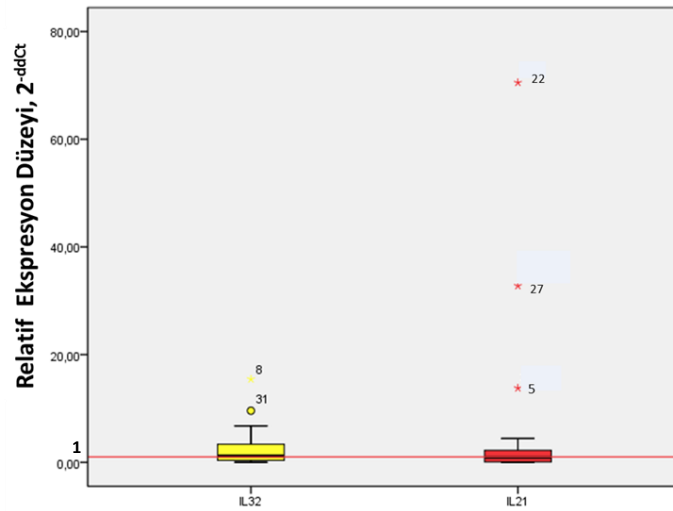
Çalışmaya 50 hastaya ait doku örnekleriyle başlamamıza karşın bazılarında kaliteli RNA elde edilememesi veya RNA stoklarının tükenmesi nedeniyle her bir sitokin için farklı sayıda hasta çalışmaya dahil edildi. IL-32 sitokini, 31 hasta (17K) ile çalışıldı. Bu hastaların yaş ortalaması 60,8 (26-79) olarak bulundu. IL-21 sitokini ile çalışırken 3 hastanın RNA stoklarının bitmesi sebebiyle 28 hasta ile çalışma tamamlandı. Hastalarda tümörlü dokudaki sitokin gen ekspresyon düzeyi aynı hastanın tümörsüz dokusundaki gen ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar tümörlü dokuda gen ekspresyon düzeyinin, tümörsüz dokuya göre kaç kat

arttığını göstermektedir. $2^{-\Delta\Delta CT} > 1$ olması tümörlü dokuda gen ekspresyonunun arttığını, $2^{-\Delta\Delta CT} < 1$ olması ise tümörlü dokuda gen ekspresyonunun tümörsüz dokuya göre azalmış olduğunu gösterir. $2^{-\Delta\Delta CT} = 1$ ise gen ekspresyonunun tümörlü ve tümörsüz dokuda eşit olarak bulunduğunu ifade eder.

Tablo 4.1 Hastaların gruplara göre dağılımı.

	IL-32		IL-21	
	n	Ortalama Yaş	n	Ortalama Yaş
Kadın	17	59,5 (26-76)	15	58,6 (26-76)
Erkek	14	62,5 (51-79)	13	61,9 (51-79)
Toplam	31	60,8 (26-79)	28	60,1 (26-79)

Yapılan analiz sonucunda, IL-32 gen ekspresyonunun tümörlü dokuda tümörsüz dokuya göre arttığı tespit edildi (ortanca: 1,16) Hastaların %51,6' sında IL-32 gen ekspresyonu artmış, %48,4'ünde ise azalmış olarak bulundu. IL-21 gen ekspresyonunun ortanca değeri (ortanca: 0,911) tümörlü dokuda tümörsüz dokuya göre azalmış olarak bulundu. Fakat bu değer 1'e oldukça yakındı. Ekspresyon düzeyine göre hastaların dağılımına bakıldığında ise, IL-21 gen ekspresyonu hastaların %50' sinde artmış, %50' sinde ise azalmış olarak bulundu (Şekil 4.11 ve Tablo 4.2)

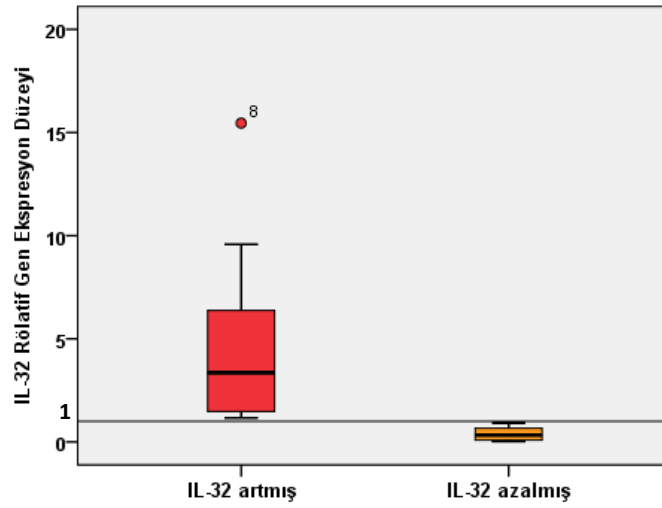


Şekil 4.11. IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon dağılımı

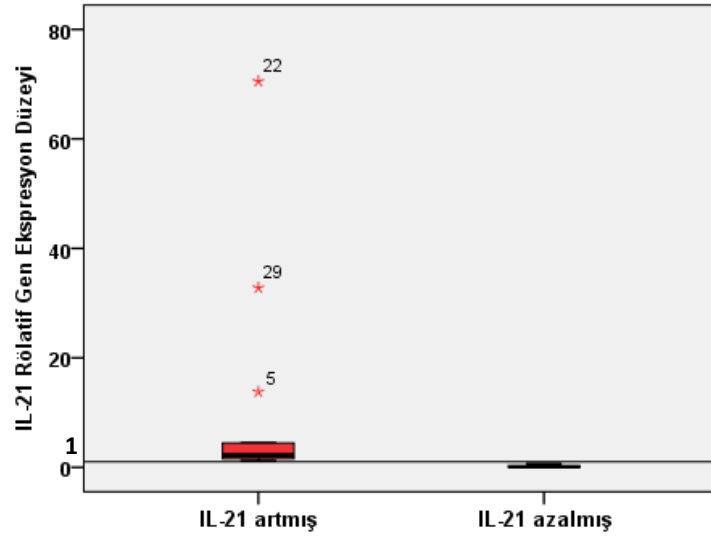
Tablo 4.2. IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon dağılımı

	Hasta sayısı	Ekspresyonu Artan Hasta Sayısı (%)	Ekspresyonu Azalan Hasta Sayısı (%)	Ortanca
IL-32	31	16 (51,6)	15 (48,4)	1,16
IL-21	28	14 (50)	14 (50)	0,911

IL-21 ve IL-32 ekspresyon düzeyleri arasında Spearman Korelasyon testine göre herhangi bir ilişki tesbit edilemedi.

**Şekil 4.12.** IL-32 gen ekspresyonu dağılımı**Tablo 4.3.** IL-32 gen ekspresyonu dağılımı

IL-32 Gen Ekspresyonu	Hasta sayısı	Ortalama	Ortanca	Ekspresyon Aralığı
Artmış	16	4,492	3,360	1,160-15,454
Azalmış	15	0,393	0,335	0,019-0,929



Şekil 4.13. IL-21 gen ekspresyon dağılımı

Tablo 4.4. IL-21 gen ekspresyon dağılımı

IL-21 Gen Ekspresyonu	Hasta sayısı (n)	Ortalama	Ortanca	Ekspresyon Aralığı
Artmış	14	10.191	2,236	1,160-70,52
Azalmış	14	0,168	0,068	0,003-0,625

Daha sonra hastaların IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon düzeylerindeki değişim tümörün volümüne, diferansiyasyonuna, patolojik T (pT) evresine, Astler-Coller sınıflandırmasına, lenf nodu metastazına, vasküler, perinöral, nöral invazyon ve metastaz varlığına göre değerlendirildi.

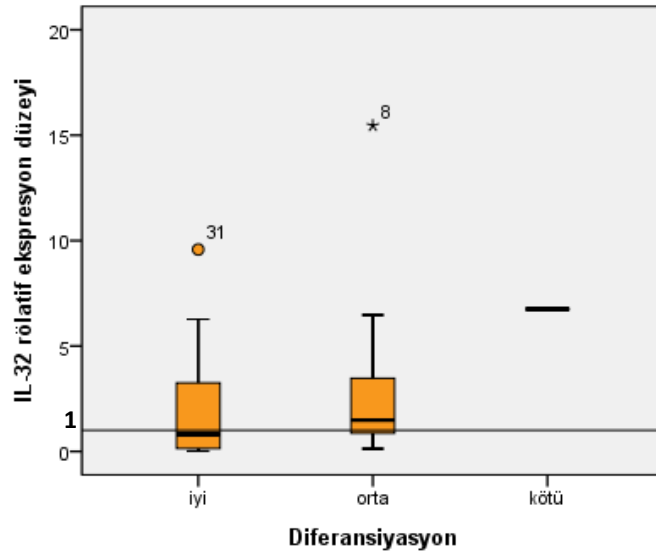
Tablo 4.5 Klinikopatolojik verilere göre IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon düzeyleri

	n	IL-32 Ortalama Ekspresyon	n	IL-21 Ortalama Ekspresyon
T Evresi (pT)				
T2	6	3,37 (0,051-9,58)	4	9,71 (0,027-32,79)
T3	11	4,33 (0,142-15,45)	10	2,84 (0,007-13,784)
T4	14	1,02 (0,019-4,169)	14	5,64 (0,003-70,520)
	31	P> 0,05	28	P> 0,05
Diferansiyasyon				
Grade 1 (iyi)	18	1,96 (0,019-9,579)	17	1,77 (0,008-13,784)
Grade 2 (orta)	10	3,28 (0,127-15,454)	8	5,22 (0,007-32,785)
Grade 3 (kötü)	1	6,75 (6,75)	1	2,62 (2,62)
	29	P> 0,05	26	P> 0,05
Astler Coller Sınıflaması				
Dukes A	1	0,58 (0,58)	1	4,44 (4,438)
Dukes B1	3	3,14 (0,929-6,475)	1	32,79 (32,785)
Dukes B2	13	3,76 (0,031-15,454)	13	2,42 (0,007-13,784)
Dukes C2	13	1,44 (0,19-6,75)	12	6,35 (0,003-70,520)
Dukes D	1	0,64 (0,639)	1	0,049
	31	P> 0,05	28	P> 0,05
Lenf Nodu Metastazı				
PLN Yok	16	3,233 (0,031-15,454)	14	4,61 (0,007-32,785)
PLN≤ 3	7	2,978 (0,858-6,750)	6	1,21 (0,017-3,784)
PLN >3	7	0,668 (0,019)	7	1,448 (0,005-1,851)
	30	P> 0,05*	27	P> 0,05
Vasküler İnvazyon				
Var	7	4,180 (0,019-15,454)	6	13,494 (0,625-70,520)
Yok	20	2,25 (0,024-9,579)	18	2,58 (0,003-32,785)
Bilinmiyor	4	0,85 (0,168-1,328)	4	4,42 (0,049-13,784)
	31	P> 0,05	28	P=0.023
Perinöral İnvazyon				
Var	6	1,524 (0,019-6,475)	5	3,50 (0,075-13,784)
Yok	22	3,021 (0,024-15,454)	20	6,18 (0,003-70,520)
Bilinmiyor	3	0,711 (0,168-1,328)	3	1,30 (0,49-3,784)
	28	P> 0,05	28	P> 0,05

(*)PLN>3 olan olgular için p=0.013

4.4 Diferansiyasyona Göre IL-32 ve IL-21 Ekspresyon Düzeyleri

IL-32 ekspresyon düzeylerinin dağılımına bakıldığında diferansiyasyon derecesi ile ekspresyon düzeyleri arasında bir ilişki tespit edilemedi. Uç değere sahip hasta hesaplamalara dahil edilmediğinde ekspresyon değerlerinin birbirine çok yakın olduğu gözlemlendi. Kötü diferansiye grupta bir tane hasta olması da sağlıklı bir analiz yapılmasını zorlaştırmaktaydı. Kötü diferansiye olan hastanın klinik evresi Dukes C2 idi ve bir adet patolojik lenf nodu bulunmaktaydı (Şekil 4.14).

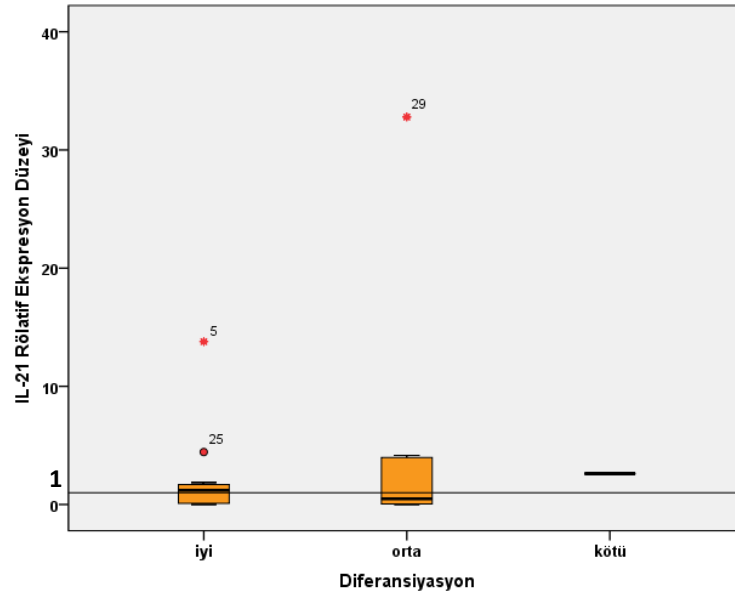


Şekil 4.14. IL-32 gen ekspresyonunun diferansiyasyona göre dağılımı

Tablo 4.6 IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon ortalamalarının diferansiyasyona göre dağılımı

Diferansiyasyon	n	IL-32	n	IL-21
Grade 1 (iyi)	18	1,96 (0,019-9,579)	17	1,77 (0,008-13,784)
Grade 2 (orta)	10	3,28 (0,127-15,454)	8	5,22 (0,007-32,785)
Grade 3 (kötü)	1	6,75 (6,75)	1	2,62 (2,62)
	29	P> 0,05	26	P> 0,05

IL-21 gen ekspresyon ortalamalarının, diferansiyasyon derecelerine göre dağılımına bakıldığında ise; iyi diferansiye grupta ekspresyonun tümörsüz dokuya göre çok fazla artış göstermediği, orta diferansiye grupta yaklaşık 5 kat artışın söz konusu olduğu gözlemlendi. Fakat buradada bir adet çok yüksek değere sahip hasta vardı ve ortalama sapmaya neden olmaktadır. Bu sonuç çıkarıldığında Grade 1 ile benzer sonuçlar gözlemlendi. Kötü diferansiye grupta bir adet hasta vardı ve 2,5 kat kadar artış tespit edildi. Diferansiyasyona göre IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon değişimine bakıldığında genel olarak diferansiyasyonla ekspresyon düzeylerinin değişmediği gözlemlendi ($p>0,05$) (Tablo 4.6).



Şekil 4.15. IL-21 gen ekspresyonunun diferansiyasyona göre dağılımı

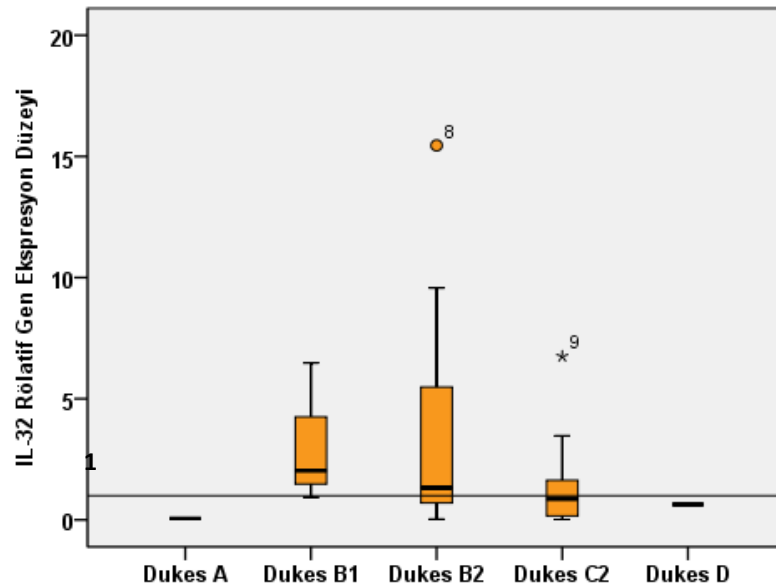
4.5. Tümör evresine göre IL-32 ve IL-21 Gen Ekspresyonlarının Dağılımı

Patoloji raporlarına göre tümörün Astler-Coller sınıflandırması yapıldıktan sonra IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı değerlendirildi. IL-32' ye bakıldığında tümör mukozada iken (Dukes A) ekspresyon düzeyinin normal dokuya göre azaldığı, tümör mukozayı taşıdıktan sonra ise Dukes B1 ve B2'de ekspresyonun arttığı izlendi. Dukes C2 evresinde lenf nodu tutulumu ile beraber ise ekspresyon düzeylerinin

yarı yarıya düştüğü tespit edildi. Duker D evresinde ise normal dokuya göre yine azalma göstermekle birlikte, Duker A'da olduğu kadar bir azalma görülmemektedir. Fakat Duker A ve Duker D evresinde birer hasta olması bu evreler hakkında yorum yapmayı güçleştirmektedir. Evreler arası karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilemedi ($p > 0.05$). Toplam hasta sayısının az olması, evrelere göre hastaların eşit dağılım göstermemesi bunda etkili olmuş olabilir.

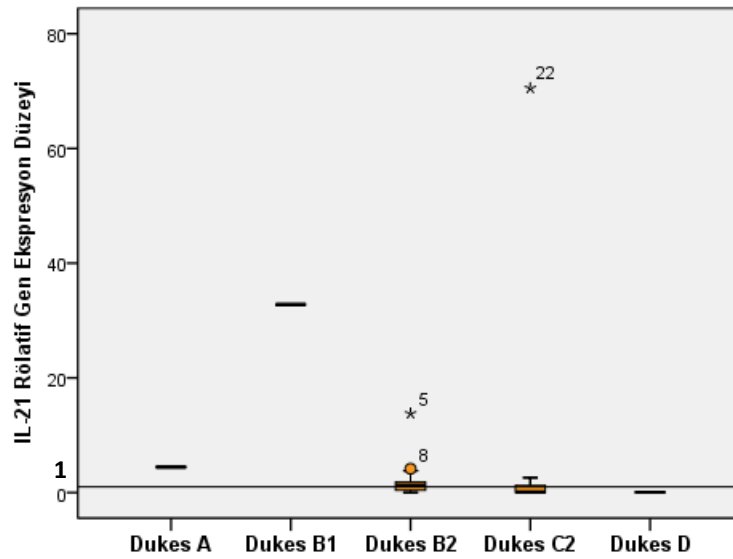
Tablo 4.7 IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon ortalamalarının Astler-Coller sınıflamasına göre dağılımı

Astler Coller Sınıflaması	n	IL-32	n	IL-21
Dukes A	1	0,58 (0,58)	1	4,44 (4,438)
Dukes B1	3	3,14 (0,929-6,475)	1	32,79 (32,785)
Dukes B2	13	3,76 (0,031-15,454)	13	2,42 (0,007-13,784)
Dukes C2	13	1,44 (0,19-6,75)	12	6,35 (0,003-70,520)
Dukes D	1	0,64 (0,639)	1	0,049
	31	$P > 0,05$	28	$P > 0,05$



Şekil 4.16. Astler-Coller sınıflandırmasına göre IL-32 gen ekspresyonu dağılımı

IL-21 ekspresyonunun da Astler-Coller evrelemesine göre dağılımı değerlendirildi. Evre ilerledikçe ekspresyonun düşme eğiliminde olduğu gözlemlendi. Zaten daha düşük ekspresyonu olan IL-21 ekspresyonu IL-32 ekspresyonundan daha erken evrede düşüş göstermektedir (Şekil 4.17). Fakat evre Duker A, Duker B2 ve Duker D’de birer hastanın bulunması sağlıklı bir değerlendirmeyi zorlaştırmaktadır ($p>0.05$).



Şekil 4.17. Astler-Coller sınıflandırmasına göre IL-21 gen ekspresyonu dağılımı

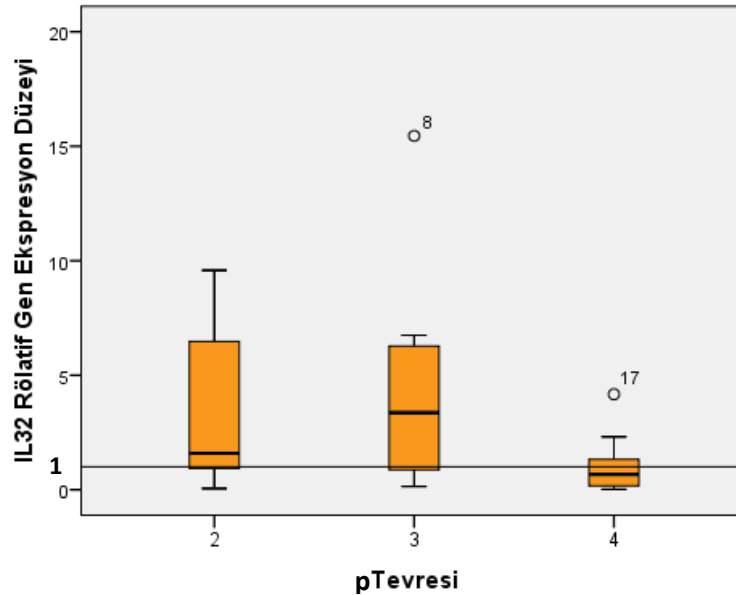
4.6. Tümör invazyonuna göre IL-32 ve IL-21 Gen Ekspresyonlarının Dağılımı

Patolojik T (pT) evrelemesi, TNM sınıflamasına göre tümörün dokuya invazyonunu değerlendirmektedir. Patolojik T evresine göre IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon değişimine bakıldığında, Astler-Coller sınıflandırmasına benzer bulgular elde edildi. IL-32 gen ekspresyonunun T2 evresinde, T3 evresine göre daha düşük düzeyde olduğu gözlemlenmiş fakat genel olarak normal dokuya göre arttığı izlenmiştir Şekil.4.18. Tümör serozayı aşmış invazyona gittiğinde ise ekspresyon düzeyleri genel olarak diğer evrede görülen ekspresyon düzeylerine göre düşüş göstermektedir. Dağılımın

dışında kalan hastaların ekspresyon düzeyleri göz ardı edildiğinde ise T4 evresinde ekspresyonun tümörsüz dokuya göre de azaldığı saptanmıştır ($p > 0,05$) Tablo.4.8.

Tablo 4.8 IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon ortalamalarının patolojik T evresine göre dağılımı

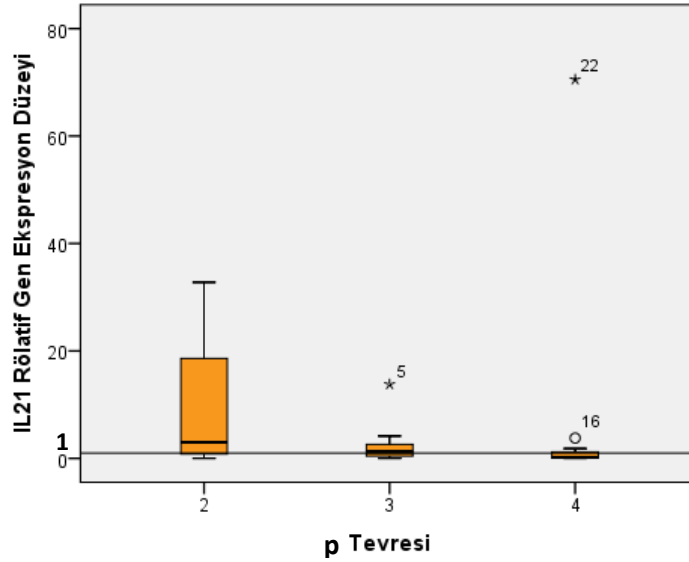
T Evresi (pT)	n	IL-32	n	IL-21
T 2	6	3,37 (0,051-9,58)	4	9,71 (0,027-32,79)
T 3	11	4,33 (0,142-15,45)	10	2,84 (0,007-13,784)
T 4	14	1,02 (0,019-4,169)	14	5,64 (0,003-70,520)
	31	$P > 0,05$	28	$P > 0,05$



Şekil 4.18 pT evresine göre IL-32 gen ekspresyonu dağılımı

IL-21 mRNA düzeyleri ise T2 evresinde yani tümör muskularis propriyada iken diğer evrelere göre daha yüksek olarak bulunmuş, serozaya ulaştığı veya taşıdığı zaman yani T3 ve T4 evresinde ise ekspresyon düzeyleri oldukça azalmıştır. IL-21 gen ekspresyon düzeyleri hastaların tümörlü ve tümörsüz dokularında IL-32 geni kadar yüksek düzeylerde değildi. Her iki genin Ct değerleri ve jel görüntülerinde ekspresyon düzeyleri arasındaki

gözle görülememekteydi. Dokuda zaten az eksprese edilen bir sitokin olan IL-21'in ekspresyon düzeyinde, evre artışı ile beraber görülen keskin düşüş dikkat çekmekteydi (Şekil 4.19).



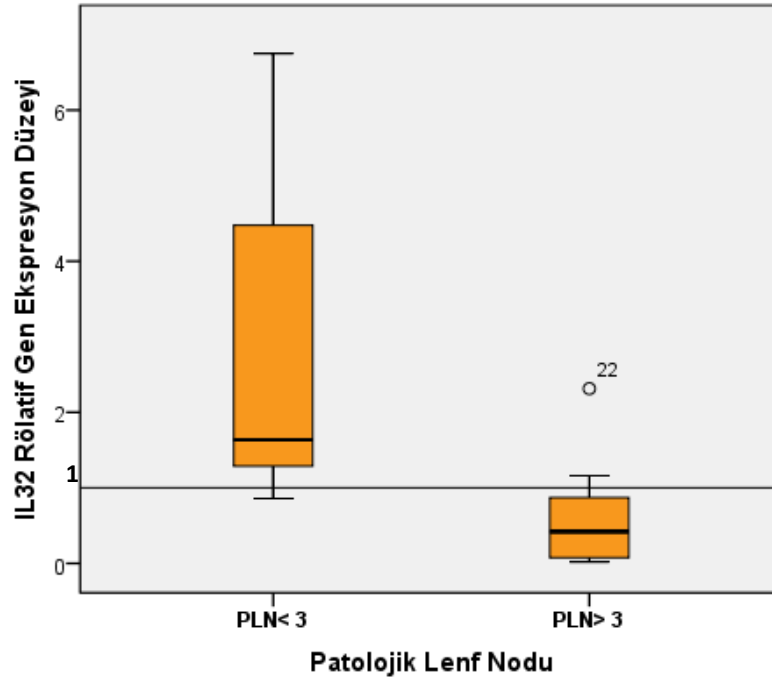
Şekil 4.19. pT evresine göre IL-21 gen ekspresyonu dağılımı

4.7. Lenf Nodu Metastazına göre IL-32 ve IL-21 Gen ekspresyon Dağılımı

Tümörün lenf noduna metastazının olup olmasına göre IL-32 ve IL-21 ekspresyon düzeylerine bakıldığı zaman gen ekspresyon düzeylerinde gruplar arası bir fark izlenmedi (Tablo 4.5). Fakat tutulan lenf nodu sayısına göre ekspresyon düzeyleri arasındaki farka baktığımızda daha anlamlı sonuçlar gözlemlendi. IL-32 geni, metastaz bulunan lenf nodu sayısı 3 ve altında iken ($PLN \leq 3$) yüksek düzeyde eksprese olmakta, lenf nodu sayısı 3'ün üzerine ($PLN > 3$) çıktığında ise ekspresyon azalma göstermekteydi (Şekil 4.20). Bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 4.9). Bunun nedeni immün kaçışını tamamlamış ve güçlenmiş tümöre, invaze olabilen immün hücre sayısının azalması olabilir. Ayrıca tümör hücrelerinin lenf nodlarını istila etmesi bölgeye gelen immün hücre sayısının azalmasına da neden olmuş olabilir.

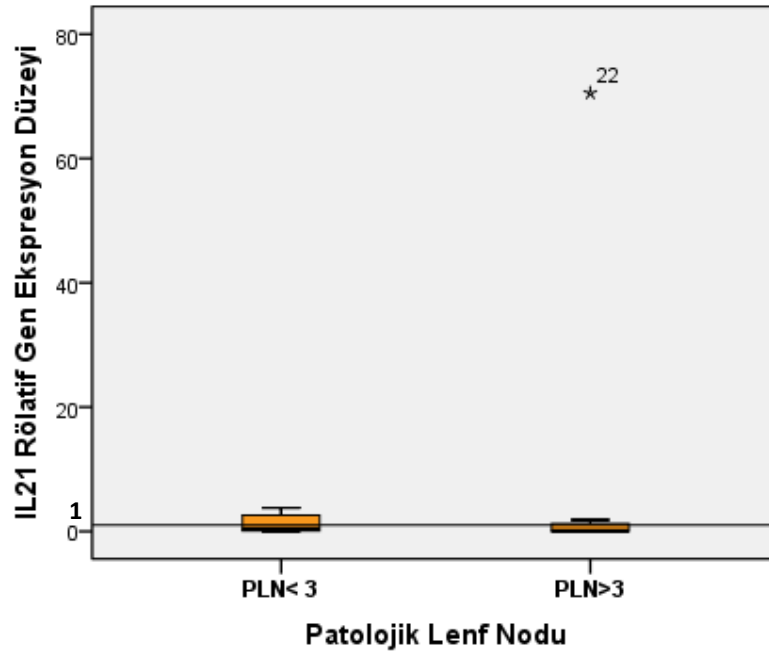
Tablo 4.9. Metastatik lenf nodu sayısına göre IL-32 ve IL-21 ekspresyon dağılımı

Metastatik Lenf Nodu	n	IL-32	n	IL-21
PLN ≤3	7	2,971 (0,858-6,750)	6	1,21 (0,017-3,784)
PLN >3	7	0,66 (0,19-2,313)	7	10,44 (0,003-70,520)
	14	P<0.05	13	P>0,05



Şekil 4.20. Metastatik lenf nodu sayısına göre IL-32 gen ekspresyonu

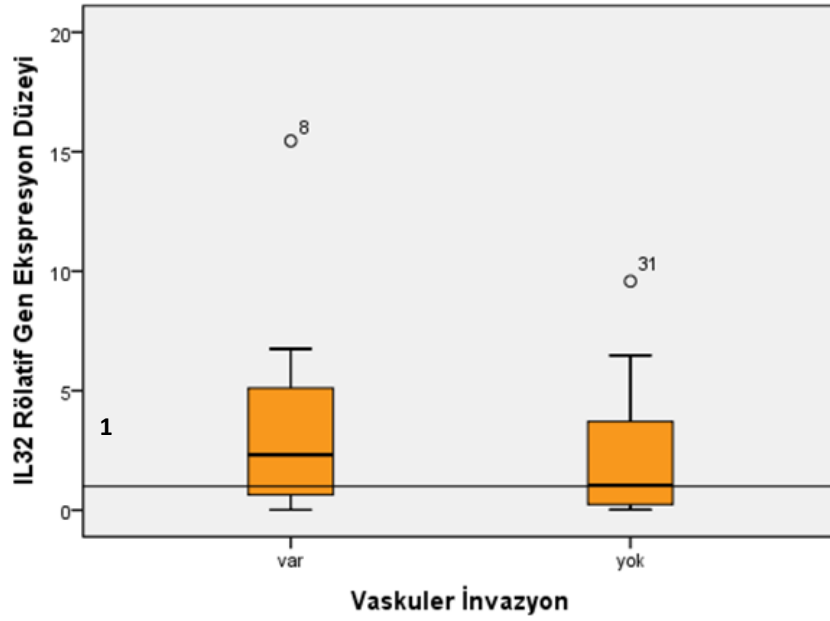
IL-21 gen ekspresyonunda ise gruplar arasında anlamlı bir değişim izlenmedi. Ekspresyon düzeyi çok yüksek olan hastanın sonucu dışarıda bırakılarak yapılan değerlendirmelerde de istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilemedi. Patolojik lenf nodu sayısı 3' ün üstünde veya altında olduğunda IL-21 gen ekspresyonu benzer düzeylereydi (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Metastatik lenf nodu sayısına göre IL-21 gen ekspresyonu

4.8. Vasküler invazyona göre IL-32 ve IL-21 Gen ekspresyon düzeyleri

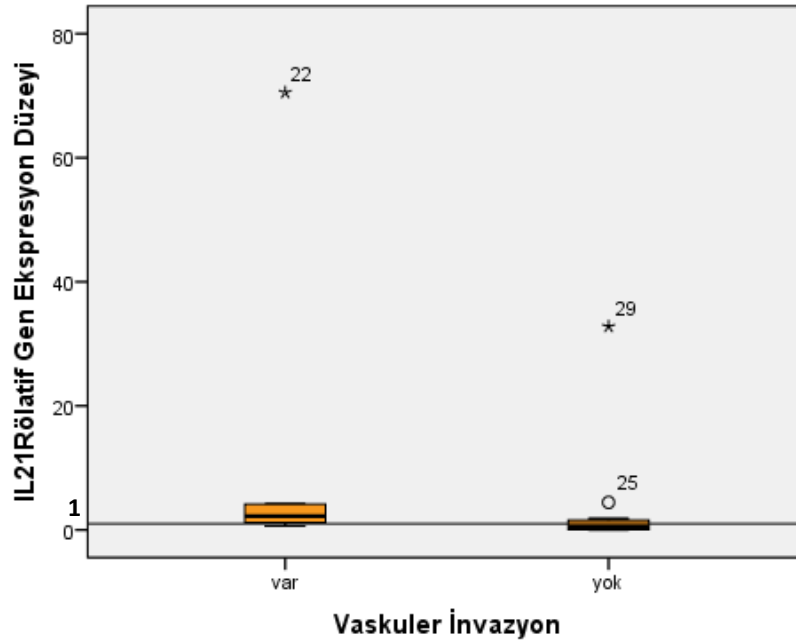
Vasküler invazyonun varlığına göre gen ekspresyon düzeylerine bakıldığında , vasküler invazyonu pozitif olan hasta sayısının çok az olduğu görüldü (n=7). Hem IL-32 hem de IL-21 gen ekspresyonu, vasküler invazyonu olan hastalarda, olmayan hastalara göre artış göstermekteydi. IL-21 gen ekspresyon düzeyindeki ortalama artış invazyonu olmayanlara göre yaklaşık dört kat daha fazlaydı(p=0.023). Fakat gruplar arası hasta dağılımının çok farklı olması yorum yapabilmemizi güçleştirmekteydi. Bu sonuçların hasta sağ kalım süreleri ile beraber değerlendirilmesi daha anlamlı olabilir.



Şekil 4.22. Vasküler invazyona göre IL-32 gen ekspresyonu dağılımı

Tablo 4.10. Vasküler invazyona göre IL-32 ve IL-21 genlerinin ekspresyon düzeyleri

Vasküler İnvazyon	n	IL-32	n	IL-21
Var	7	4,180 (0,019-15,454)	6	13,494 (0,625-70,520)
Yok	20	2,25 (0,024-9,579)	18	2,58 (0,003-32,785)
Bilinmiyor	4	0,85 (0,168-1,328)	4	4,42 (0,049-13,784)
	31	P> 0,05	28	P=0.023



Şekil 4.23. Vasküler invazyona göre IL-21 gen ekspresyonu dağılımı

4.9. Perinöral invazyon ve Uzak Metastaza Göre IL-32 ve IL-21 Ekspresyon Düzeyleri

Her iki genin ekspresyon düzeylerinin perinöral invazyonla olan ilişkisine bakıldığında herhangi bir özellik tespit edilemedi. Ekspresyon düzeyi çok yüksek veya çok düşük olan hastalar değerlendirildiğinde de öne çıkan bir bulguya rastlanmadı.

Çalışmaya alınan hastalar içerisinde uzak metastazı bulunan bir tane hasta vardı. Bu hastanın IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon düzeyleri normal dokuya göre azalmış olarak bulundu. Daha fazla sayıda uzak organ metastazı olan hasta ile çalışılabilirse metastatik lenf nodu sayısı sonuçları ile korelasyonuna bakılabileceği sonucuna varıldı.

Tablo 4.11. Perinöral invazyona göre IL-32 ve IL-21 genlerinin ekspresyon düzeyleri

Perinöral İnvazyon	n	IL-32	n	IL-21
Var	6	1,524 (0,019-6,475)	5	3,50 (0,075-13,784)
Yok	22	3,021 (0,024-15,454)	20	6,18 (0.003-70,520)
Bilinmiyor	3	0,711 (0,168-1,328)	3	1,30 (0,49-3,784)
	28	P> 0,05	28	P> 0,05

Biz bu çalışmada tümör mikroçevresinde immün reaksiyonun veya metastazın belirteçi olabileceği düşüncesiyle tümör dokusundaki ekspresyon düzeylerini araştırdığımız IL-32 ve IL-21 sitokinlerinin tümör dokusunda gen ekspresyon düzeylerinin tümörsüz dokuya göre değiştiğini ve kişinin immün sistem yapılanmasından etkilendiğini gösterdik.

5. TARTIŞMA

Kanser gibi mltifaktryel hastalıkların seyrini ve tedaviye verecekleri yanıtları belirlemek zordur. Bugüne kadar kanser hastalarının prognozunu belirleyebilmek için birçok biyobelirteç ve metod tanımlanmış fakat henüz bunların çok azı kliniĒe yansiyabilmiştir. Son zamanlarda tümör gelişimini etkileyen mikroçevre üzerine yoĒunlařılarak hastaların seyri ve tedaviye yanıtı hakkında daha fazla bilgi verebilecek prognostik belirteçler araştırılmaktadır.

Tümör hücrelerinin mikroçevrede yerleşebilmesi ve proliferasyonu için endotel hücreleri, fibroblastlar, kan damarları, lenf damarları, immün sistem hücreleri, sitokinler, kemokinler ve hücrelerin metabolik ürünleri ile etkileşim içerisinde olması gerekir [26]. İmmün sistem tümör progresinde etkili olan en önemli faktörlerden birisidir. Zamana ve yere göre tümörü destekleyebilir veya süprese eder. DoĒal immünite inflamatuvar mediyatörlerin mutasyonu, anjiyogenezi ve apopitoz direncini uyarak tümör oluşumunu, proliferasyonunu ve metastazını desteklerken adaptif immünite 'immün gözetim' sayesinde kişiye tümör gelişiminden koruyabilir. İmmün yetmezliĒi olan farelerde karsinojene baĒlı veya spontan kanser gelişiminin artması, doĒal ve adaptif immünitenin tümör gelişimindeki kontrolünü ortaya koymaktadır. T lenfositlerin farelere transferi onları kanserden korurken, CD8⁺ T hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması antitümör etkileri ortadan kaldıracılabilmektedir. Tümöre karşı gelişen immünite, yaptıĒı immün şekillendirme sırasında tümör hücrelerinin immnijenisitesini azaltarak, kontrolsüz büyümesine de yol açabilmektedir [3, 112]. İmmün gözetimin, tümör eliminasyonu aşamasından tümörü destekler duruma geçmesi kompleks bir süreçtir ve birçok sinyal yolaĒını içerir. Bu süreç tümör hücreleri, immün hücreler ve çevredeki kanser olmayan hücrelerden (epitel hücreleri, kanser asosiye fibroblastlar) eksprese olan sitokinlerden etkilenir. İmmün şekillenme (*immuno-editing*) sırasında oluşan sitokin sinyal aĒı, süprese olmuş bir tümörün proliferasyonuna neden olabileceĒi gibi tam tersi bir durum da söz konusu olabilir [113]. Bu birbiriyle antagonistik, sinerjistik, aditiv etki gösterebilen ve mikroçevrede heterojen bir hücre popülasyonu

üzerinde etkili olan sitokin ağını çözmek tümör oluşumu ve proliferasyonunu anlamak açısından oldukça önemlidir. Sitokinler aynı zamanda tümöre infiltre olan immün hücrelerin de birer göstergesidirler [113]. Bu immün hücrelerin lokalizasyonu, dansitesi ve davranışları tümör evresine göre farklılık gösterebilmektedir. Histopatolojik bulgulara göre yapılan sınıflandırmalarda, hastalar aynı tümör evresine sahip olsalar bile prognozlarının birbirinden çok farklı olabildiği bilinmektedir. İleri evre bir hasta yıllarca stabil kalabilmekte, büyük metastatik lezyonları olan hastalar spontan regresyon gösterebilmektedir. Buna örnek birçok vaka bildirilmiştir. Buna karşın erken evre bir hasta geride mikro düzeyde hastalık kalmayacak şekilde opere edilse bile hızlı relaps ve ölüm ile karşı karşıya kalabilmektedir. Çünkü bu klasik sınıflandırmada sadece tümör hücresi değerlendirilmekte, mikroçevresindeki hücreler özellikle de immün hücreler gözardı edilmektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar bu hipotezi destekler niteliktedir [114]. İmmün sistem hücreleri stromanın en kritik komponentlerinden biridir ve ortama optimal sitokin ve inflamatuvar desteği sağlarlar.

Histopatolojik analizler tümörlerin doğal ve adaptif immünite hücreleri tarafından infiltre edildiğini göstermektedir. Makrofajlar sıklıkla stromada bulunurlar ve fibrozis ile ilişkilidirler. Mast hücreleri, miyeloid derive süpresör hücreler (MDSC) ve nötrofiller ise intratümöral alanı istila ederler. Dendritik hücreler (DC) tümörün farklı lokalizasyonlarında saptanmışlardır. Langerhans tipi DC' ler tümörün merkezinde bulunur ve tümör hücreleri ile yakın temastadırlar. İmmatür intertisiyel DC ve plasmasitoid DC hücreler ise stromada yerleşirler. Matür DC'ler tümör merkezine komşu lenfoid adalarında ve lenf nodlarında yoğunlaşırlar. Lenfosit hücre dağılımı da tümörün yapısına bağlı olarak farklılık gösterir. NK hücreleri birçok tümörde stromada bulunurken renal hücreli karsinomada (RCC) tumor hücreleri ile yakın temas halindedir [115]. T hücreleri, tümörün merkezinde de invaziv sınırdaki da bulunabilirler. Naif T hücreleri genellikle tümöre komşu lenfoid adacıklarında yerleşirler. CD8⁺ T hücrelerin bir kısmı malign hücrelerle yakın temas halindeyken bir kısmı da stromada bulunur. FoxP3⁺ T hücreleri, folliküler yardımcı T hücreleri (Tfh), Th17 ve B lenfositler stromada ve lenfoid

adalarında yoğunlaşırlar. Bu hücre dağılımları tümörden tümöre, hastadan hastaya değişmekte ve prognozu belirlemektedir. Yapılan çalışmalar NK, CD8⁺ T hücreler, Th1, M1, Dendritik hücrelerin iyi prognoz belirteci olduğunu söylemesine karşın CD4⁺CD25⁺, FOXP3⁺ Treg, Th2 MDSC' lerin, M2 makrofajların kötü prognozla ilişkili olduğunu bildirmektedir. Yoğun lenfosit infiltrasyonu güçlü bir antitümör yanıtı göstermektedir. Baş-boyun, over, mesane, meme, kolorektal, renal, prostat, akciğer kanserleri ve malign melanom ile yapılan araştırmalarda tümöre infiltre immün hücre sayısı ile klinik sonuçlar arasındaki ilişki net bir şekilde gösterilmiştir. Bu çalışmaların çoğunluğunda CD3⁺T hücre, CD8⁺T hücre ve CD45RO⁺ hafıza T hücre dansite artışı uzamış hastaliksız sağkalım (DFS) ve tüm sağkalım (OS) süreleri ile ilişkiliydi [26, 116]. *Bindea* ve arkadaşları kolon kanserinde Tfh ve B hücrelerin önemine dikkat çekmiş rekürrens ve uzamış sağkalımla ilişkilerini göstermişlerdir. İmmün yapılanmanın en iyi göstergelerinden birisi de sitokinlerdir.

Biz bu çalışmada doğal ve adaptif immünite hücreleri tarafından eksprese edilen, immün yapılanma hakkında bilgi verebilecek olan IL-32 ve IL-21 proinflamatuvar sitokinlerinin kolon kanserli hastalardaki gen ekspresyon düzeylerini inceledik. Ayrıca hastanın prognozunu belirleyen diferansiyasyon, evre, tümörün patolojik evresi ve volümü, lenf nodu metastazı, vasküler, lenfatik ve perinöral tutulum gibi parametrelerle olan ilişkisini araştırdık.

Tümörlü dokuda IL-32 gen ekspresyon düzeyi, tümörsüz dokuya göre artmış olarak bulundu (medyan: 1,16) fakat hastaların % 48'inde ekspresyon düzeyi azalmıştı. IL-21 ekspresyonu ise hastaların %50 sinde artış, %50 sinde azalma göstermekteydi (medyan: 0, 911). Hasta sayısının az olması yorum yapmamızı güçleştirse de, IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon düzeylerinin arttığı ve azaldığı gruplarda ekspresyon düzeyinin hastadan hastaya çok fazla değişmesi immün sistem yapılanmasında bireysel farklılıkların önemli bir göstergesidir. Bu konu *Angell* ve arkadaşları tarafından vurgulanmıştır [26]. Ayrıca tümörlü doku örneklerinin sadece tümör merkezinden yapılmış olması immün hücrelerin tümör dokusundaki dağılımı göz önünde

bulundurulduğunda mikroçevredeki immün reaksiyonun sadece bir kısmının göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmaya dahil edilen hastalar takip edilerek, IL-32 ve IL-21'in hastaların sağkalım süreleri ile olan ilişkilerine bakılabilirse yorum yapabilmek için daha fazla bilgiye ulaşılabilecektir. Bazı kanser gruplarında yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda IL-32 ekspresyon düzeylerinin arttığı ve kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir fakat taradığımız veri tabanlarında kolon kanserinde IL-32 ve IL-21 gen ekspresyon düzeylerini gösterir bir araştırmaya rastlanmamıştır [71] [73].

Ekspresyon düzeylerine T evresine göre bakıldığında IL-32' nin mRNA düzeyleri T2 ve T3 evresinde yüksek, T4 evresinde düşme eğilimi gösterirken, IL-21 ise sadece T2 evresinde yüksek T3 ve T4 evresinde ise düşük olarak seyretmekteydi. *Milecnik B.* ve arkadaşları yaptıkları araştırmada CD8⁺ hücre dansitesinin, tümör invazyon evresi arttıkça azaldığını (Tins/T1 ve T4) gösterdiler. Aynı zamanda hafıza T hücreleri (CD45RO⁺) ve sitotoksik efektör hücrelerin (GRZMB⁺) de T evresi arttıkça dansiteleri azalmaktaydı [117]. Bu bulgularla bizim çalışmamızda aynı grup hücreden eksprese olan IL-32 ve IL-21 mRNA düzeylerinin T evresine göre değişimi paralellik göstermekteydi.

Galon ve arkadaşları kolorektal kanserlerde immün komponenti genotipik ve fenotipik analizlerle incelemiş ve tümör yayılımı üzerine etkisini araştırmışlardır. Metastatik invazyonun erken göstergelerinden olan lenfovasküler ve perinöral tümör embolisi ile immün reaksiyon arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir. Özellikle kolorektal kanserlerde tümör embolisi yoksa immün hücre infiltrasyonun daha fazla olduğunu ve Th1 ve efektör T hücreyi tanımlayan belirteçlerin mRNA düzeylerinin arttığını gözlemlemişlerdir. Bunlar arasında CD8, T-box transkripsiyon faktör-21 (T-bet), IFN regülatuar faktör-1 (IRF-1), IFN- γ , granülizin, granzim bulunmakta, T hücre alt grupları tümör emboli varlığına göre çok farklılık göstermekteydi. T hücre belirteçlerinin hiyerarşik kümelenmesi, T hücre migrasyonunun, aktivasyonunun ve diferansiyasyonunun da metastaz bulguları olmadan önce arttığına işaret etmekteydi. Özellikle de efektör hafıza (memory) CD8⁺ T hücreleri artmaktaydı [3, 4]. Bizim çalışmamızda da lenf nodu tulumu

bulunmayan Duker B1 ve B2 evresinde IL-32 mRNA düzeylerini artmış olarak bulduk. Lenf nodu tutulumu olan Duker C2 de ise ekspresyon düzeyi düşmekteydi. Özellikle Th ve NK hücrelerinden salgılanan bu sitokin immün reaksiyonun bir göstergesi olabilir. Erken ve ileri evrede yeterince hasta sayımızın olmaması ve gruplar arasında hasta dağılımının eşit olmaması yorum yapmamızı zorlaştırmaktadır. Hasta sayısı artırılarak ve hastaların sağkalım süreleri de izlenerek yapılacak yorumlar tartışmaya katkı sağlayabilir. Lenf nodu metastazı olan ve olmayan hastalarda IL-21 ve IL-32 ekspresyon düzeylerini karşılaştırdığımızda anlamlı bir farklılık bulamadık. Fakat patolojik lenf nodu sayısı 3'den az ve 3'den fazla olan hastalarda ekspresyon düzeyini karşılaştırdığımızda, patolojik lenf nodu sayısı > 3 olan hastalarda ekspresyon düzeyinin düştüğünü gördük ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). *Milenick* ve arkadaşlarının 599 kolon kanseri doku örneği ile yaptığı çalışmada da lenf nodu tutulumu ile beraber immün hücre dansitesinin azaldığı tespit edilmiştir [117]. Tümör metastazı ile beraber IL-32 düzeylerindeki azalma gitgide artan bir immün kaçışın göstergesi olabilir. Bu bulgular tümörün erken evrelerinde mikroçevrede gelişen immün reaksiyonun tümör gelişimini kontrol altında tutan en önemli etmenlerden biri olabileceğini düşündürmektedir.

IL-32 gen ekspresyon düzeyinin belirlenmesi kolon kanserlerinde tümör mikroçevresindeki immün reaksiyonun ve patolojik lenf nodu sayısının bir göstergesi olabilir. Bunu destekleyecek yeni çalışmalara gereksinim vardır. IL-21 in folliküler T hücrelerinden salınarak tümör mikroçevresinde Th1, hafıza T hücre, sitotoksik T hücre yanıtlarını şekillendiriyor olması ve hastaların sağkalım süreleri ve rekürrens ile doğrudan ilişkili olması önemini artırmaktadır [118]. Tümör mikroçevresindeki immün hücrelerin tipine, lokalizasyonuna ve dansitesine bakılarak yapılan immün skorlamanın TNM sınıflamasından bağımsız, hasta yaşam süreleri ve relapsa dair daha güvenilir bilgiler verdiği gösterilmiştir. Bu nedenle TNM sınıflandırımından daha üstün bir prognostik faktör olduğu belirtilmektedir [35]. Fakat bu yaklaşım yanıt bekleyen bazı soruları da beraberinde getirmektedir. Tümöre infiltre hangi immün hücre alt grubu, değişim geçirerek tümör progresyonuna

eşlik etmekte, hangi hücreler kritik olarak sağ kalım süreleri ile rekürrensi etkilemekte ve hangi mekanizmalar intratümöral immün hücre dansitesini değiştirmekte bilinmemektedir. Bu soruların yanıtları verilebildiğinde immün reaksiyon dinamikleri anlaşılabilir, tümör tipine ve evresine uygun, daha etkin immünoteröpatik yaklaşımlar kullanılabilir. Vasküler invazyon varlığında anlamlı ölçüde artmış olarak bulunan IL 21 düzeyleri ve beraberinde PLN sayısına paralel olarak artmış olan IL 21 düzeyleri (istatistiksel olarak anlamlı olmasa da) de, tümörün lokal kontrolden çıkması ile birlikte adaptif immün sistemin Tfh hücrelerin ürettiği IL-21 ve CXCL3 aracılığı ile mikroçevreye daha fazla hafıza T hücre, sitotoksik T ve Th hücre çağırmasının göstergesi olabilir (114).

Sonuç olarak kolon kanseri mikroçevresinde eksprese olan IL-21 ve IL-32' ye ilişkin bulgularımız, bu sitokinlerin diferansiyasyon, perinöral invazyon ve uzak metastaz ile doğrudan ilişkili olmadığına ancak IL-32'nin tümörün lenf noduna metastazı açısından, IL 21' in de vasküler invazyon açısından önemli olabileceğine işaret etmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- IL-32 gen ekspresyonu genel olarak tümörlü dokuda, tümörsüz dokuya göre artış göstermekteydi (med: 1.16). Hastaların %51.6' sında artmış, %48.4' ünde ise azalmış değerler bulundu.
- IL-21 gen ekspresyon düzeyi tümör dokusunda azalma eğiliminde (med 0.911) olmasına karşın hastaların %50' sinde artmış, %50' sinde ise azalmıştı.
- IL-32 gen ekspresyonunun, erken evre kanserlerde düşük düzeyde olduğu, orta evrede arttığı, ileri evre tümörlerde ise tekrar düşüş gösterdiği gözlemlendi ($p>0,05$).
- IL-32 gen ekspresyonunun T2 evresinde, T3 evresine göre daha düşük düzeyde olduğu gözlemlenmiş fakat genel olarak normal dokuya göre arttığı izlenmiştir. Tümörün serozayı aşip invazyona gittiği T4 evresinde ise ekspresyon düzeyleri genel olarak diğer evrede bulunan hastalara göre düşüş göstermektedir.
- IL-32 gen ekspresyonu, metastaz olan lenf nodu sayısı (PLN) 3' ün altında iken ekspresyon düzeyi yüksek seyrederken, metastazik lenf nodu sayısı 3' ün üzerine çıktığında ekspresyonu azalma gösteriyordu. Bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p< 0.05$).
- Vasküler invazyonu olan hastalarda IL-21 gen ekspresyonu artmaktadır ($p=0,023$).
- IL-32 gen ekspresyonu ile diferansiyasyon derecesi (grade) arasında ilişki tespit edilemedi. Birbirine yakın ekspresyon düzeyleri vardı.
- IL-21 gen ekspresyonu ile evre arasında ilişki bulunamadı.
- T evresine göre IL-21 ekspresyonuna bakıldığında ise tümörün invazyon derecesi yani evre arttıkça ekspresyonun düştüğü gözlemlendi.
- Lenf nodu metastazının varlığı veya sayısı IL-21 ekspresyon düzeyinden etkilenmiyordu.
- Diferansiyasyonun farklı olması IL-21 ekspresyon düzeylerini etkilemiyordu.
- Perinöral invazyon ve uzak metastaz ile IL-21 ve IL-32 ekspresyon düzeyleri arasında bir ilişki tesbit edilemedi.

Bu sonuçlara açıklaması ve destek olması amacıyla;

- İmmünohistokimyasal yöntemle parafin bloklarda IL-21 ve IL-32 protein ekspresyon düzeylerine bakılabilir.
- IL-21 ve IL -32 üreten NK hücreleri, CD4⁺T ve CD8⁺ T hücreleri, CD45⁺R0 hafıza T hücreleri, Tfh hücreleri parafin bloklarda immünohistokimyasal yöntemle boyanarak immün skorlama yapılabilir ve bu sitokinlerin ekspresyon düzeyleri ile olan ilişkisine bakılabilir.
- Tümör merkezi ile tümör sınırından yapılacak doku örneklemelerinde ekspresyon düzeylerine bakılacak yeni bir araştırma yapılabilir.
- Hastalar 3 veya 5yıl takip edilerek sağkalım süreleri ile IL-21 ve IL-32 ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki araştırılabilir.
- Evre ve gruplarda hasta sayısının eşit olacağı ve daha fazla sayıda hastayı içeren bir araştırmada ekspresyon düzeylerine bakılabilir.
- Western blot tekniği ile bu sitokinlerin ekspresyon düzeyleri gösterilebilir, gen ekspresyonu ile korelasyonu var mı bakılabilir.
- Evrelere göre sitokin array yapılarak, evreler arası değişim gösteren sitokinler saptanabilir.
- Hastalığı tekrar eden hastalardan alınacak yeni ameliyat materyali tekrar incelenebilir. Böylece ileri evre ile geç evre arasında aynı hastada bu sitokinler için nasıl bir fark oluştuğu gözlenebilir.
- Kolon kanseri hücre hatlarında bu sitokinlerin hücre ölümü, proliferasyon, migrasyon üzerine etkileri incelenebilir.

KAYNAKLAR

1. Caceci, D.T., <http://www.vetmed.vt.edu/education/curriculum/vm8054/Labs/Lab19/Lab19.htm>. 2014.
2. Seruga, B., H. Zhang, L.J. Bernstein, and I.F. Tannock, *Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. Nat Rev Cancer*, 2008. 8(11): p. 887-99.
3. Macarthur, M., G.L. Hold, and E.M. El-Omar, *Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. 286(4): p. G515-20.
4. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammatory cells and cancer: think different! J Exp Med*, 2001. 193(6): p. F23-6.
5. Galon, J., W.H. Fridman, and F. Pages, *The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. Cancer Res*, 2007. 67(5): p. 1883-6.
6. Pages, F., A. Berger, M. Camus, F. Sanchez-Cabo, A. Costes, R. Molidor, B. Mlecnik, A. Kirilovsky, M. Nilsson, D. Damotte, T. Meatchi, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, and J. Galon, *Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N Engl J Med*, 2005. 353(25): p. 2654-66.
7. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nat Rev Cancer*, 2004. 4(1): p. 11-22.
8. Smyth, M.J., E. Cretney, M.H. Kershaw, and Y. Hayakawa, *Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. Immunol Rev*, 2004. 202: p. 275-93.
9. McLean, M.H., G.I. Murray, K.N. Stewart, G. Norrie, C. Mayer, G.L. Hold, J. Thomson, N. Fyfe, M. Hope, N.A. Mowat, J.E. Drew, and E.M. El-Omar, *The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. PLoS One*, 2011. 6(1): p. e15366.
10. Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, and F. Pages, *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science*, 2006. 313(5795): p. 1960-4.
11. Mantovani, A., P. Romero, A.K. Palucka, and F.M. Marincola, *Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. Lancet*, 2008. 371(9614): p. 771-83.

12. Crawford JM, K.V., *Robbins Temel Patoloji*. 2010.
13. U, Ç., . *Ağız Boşluğu Gastrointestinal Sistem*. 7. ed, . 2003.
14. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. *CA Cancer J Clin*, 2012. 62(1): p. 10-29.
15. Thun, M.J., M.M. Namboodiri, and C.W. Heath, Jr., *Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer*. *N Engl J Med*, 1991. 325(23): p. 1593-6.
16. Potter, J.D., M.L. Slattery, R.M. Bostick, and S.M. Gapstur, *Colon cancer: a review of the epidemiology*. *Epidemiol Rev*, 1993. 15(2): p. 499-545.
17. Soreide, K., E.A. Janssen, H. Soiland, H. Korner, and J.P. Baak, *Microsatellite instability in colorectal cancer*. *Br J Surg*, 2006. 93(4): p. 395-406.
18. Baker, K., P. Raut, and J.R. Jass, *Microsatellite unstable colorectal cancer cell lines with truncating TGFbetaRII mutations remain sensitive to endogenous TGFbeta*. *J Pathol*, 2007. 213(3): p. 257-65.
19. Goel, A., T. Nagasaka, C.N. Arnold, T. Inoue, C. Hamilton, D. Niedzwiecki, C. Compton, R.J. Mayer, R. Goldberg, M.M. Bertagnolli, and C.R. Boland, *The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer*. *Gastroenterology*, 2007. 132(1): p. 127-38.
20. Leslie, A., N.R. Pratt, K. Gillespie, M. Sales, N.M. Kernohan, G. Smith, C.R. Wolf, F.A. Carey, and R.J. Steele, *Mutations of APC, K-ras, and p53 are associated with specific chromosomal aberrations in colorectal adenocarcinomas*. *Cancer Res*, 2003. 63(15): p. 4656-61.
21. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*, 1990. 61(5): p. 759-67.
22. Smith, G., F.A. Carey, J. Beattie, M.J. Wilkie, T.J. Lightfoot, J. Coxhead, R.C. Garner, R.J. Steele, and C.R. Wolf, *Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(14): p. 9433-8.
23. Tezi, B.A.B.U., *Cerrahi Tedavi Sonrası Adjuvan Kemoterapi Alan ve Almayan evre II Kolon Kanserli Hastaların Klinik ve Patolojik Özelliklerinin ve Sağkalımlarının Karşılaştırılması Uzmanlık Tezi-Baskent Üniversitesi*. 2010.
24. Fearon, E.R., *Molecular genetics of colorectal cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2011. 6: p. 479-507.

25. Özmen, F., *Gastrointestinal sistem tümörlerinde LYVE-1, VEGFR-3, CD-44 ekspresyon düzeyleri ve metastaz arasındaki ilişki Doktora Tezi*. 2008.
26. Abul.K. Abbas, A.H.L., Shiv Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*. 2012.
27. Angell, H. and J. Galon, *From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. Curr Opin Immunol*, 2013. 25(2): p. 261-7.
28. Terrazas, J.M., J.F. Val-Bernal, and L. Buelta, *Staging of carcinoma of the colon and rectum. Surg Gynecol Obstet*, 1987. 165(3): p. 255-9.
29. J., R.a.A.s.S.P.I.R., *Gastrointestinal Tract, Large Bowel. Vol 1. 9 th ed: Mosby*. 2004.
30. Harpaz N, S.R.M.S.P.I.W.N., Cote RJ, Suster S, Weiss LM. *Gastrointestinal Tract, Large Intestine. Vol 1, 1 st ed: Saunders, , Gastrointestinal Tract, Large Intestine*. 2003.
31. Finan, P., *Integrating Staging of Colorectal Cancer John Goligher Colorectal Unit Leeds General/ www.ncin.org.uk/view?rid=855*.
32. Bacon, H.E. and S.W. Eisenberg, *Papillary adenoma or villous tumor of the rectum and colon. Ann Surg*, 1971. 174(6): p. 1002-8.
33. Küpeliöğlu AA. *Kolorektal Kanserde Histopatoloji, K.Ö.S.T.K.J.o.S.-. Kolorektal Kanserde Histopatoloji, Kolorektal Özel Sayısı. Türkiye Klinikleri Journal of Surgery 2004; 9: 25- 7*. 2004.
34. Clemente, C.G., M.C. Mihm, Jr., R. Bufalino, S. Zurrida, P. Collini, and N. Cascinelli, *Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. Cancer*, 1996. 77(7): p. 1303-10.
35. Naito, Y., K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura, and H. Ohtani, *CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. Cancer Res*, 1998. 58(16): p. 3491-4.
36. Galon, J., F. Pages, F.M. Marincola, M. Thurin, G. Trinchieri, B.A. Fox, T.F. Gajewski, and P.A. Ascierto, *The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. J Transl Med*, 2012. 10: p. 1.
37. Sautes-Fridman, C., J. Cherfils-Vicini, D. Damotte, S. Fisson, W.H. Fridman, I. Cremer, and M.C. Dieu-Nosjean, *Tumor microenvironment is multifaceted. Cancer Metastasis Rev*, 2011. 30(1): p. 13-25.
38. Platonova, S., J. Cherfils-Vicini, D. Damotte, L. Crozet, V. Vieillard, P. Validire, P. Andre, M.C. Dieu-Nosjean, M. Alifano, J.F. Regnard, W.H.

- Fridman, C. Sautes-Fridman, and I. Cremer, *Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma*. *Cancer Res*, 2011. 71(16): p. 5412-22.
39. Donskov, F. and H. von der Maase, *Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma*. *J Clin Oncol*, 2006. 24(13): p. 1997-2005.
 40. Dieu-Nosjean, M.C., M. Antoine, C. Danel, D. Heudes, M. Wislez, V. Poulot, N. Rabbe, L. Laurans, E. Tartour, L. de Chaisemartin, S. Lebecque, W.H. Fridman, and J. Cadranet, *Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures*. *J Clin Oncol*, 2008. 26(27): p. 4410-7.
 41. de Chaisemartin, L., J. Goc, D. Damotte, P. Validire, P. Magdeleinat, M. Alifano, I. Cremer, W.H. Fridman, C. Sautes-Fridman, and M.C. Dieu-Nosjean, *Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer*. *Cancer Res*, 2011. 71(20): p. 6391-9.
 42. Lin, W.W. and M. Karin, *A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer*. *J Clin Invest*, 2007. 117(5): p. 1175-83.
 43. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. *Cell*, 2010. 140(6): p. 883-99.
 44. Grivennikov, S.I. and M. Karin, *Inflammation and oncogenesis: a vicious connection*. *Curr Opin Genet Dev*, 2010. 20(1): p. 65-71.
 45. Karin, M. and F.R. Greten, *NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression*. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(10): p. 749-59.
 46. Grivennikov, S.I. and M. Karin, *Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. 21(1): p. 11-9.
 47. Aggarwal, B.B., R.V. Vijayalekshmi, and B. Sung, *Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe*. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(2): p. 425-30.
 48. Tebbutt, N.C., A.S. Giraud, M. Inglese, B. Jenkins, P. Waring, F.J. Clay, S. Malki, B.M. Alderman, D. Grail, F. Hollande, J.K. Heath, and M. Ernst, *Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice*. *Nat Med*, 2002. 8(10): p. 1089-97.

49. Huang, S.Y., R.B. Tang, S.J. Chen, and R.L. Chung, *Serum interleukin-6 level as a diagnostic test in children with sepsis. J Chin Med Assoc*, 2003. 66(9): p. 523-7.
50. Schneider, M.R., A. Hoeflich, J.R. Fischer, E. Wolf, B. Sordat, and H. Lahm, *Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. Cancer Lett*, 2000. 151(1): p. 31-8.
51. Becker, C., M.C. Fantini, C. Schramm, H.A. Lehr, S. Wirtz, A. Nikolaev, J. Burg, S. Strand, R. Kiesslich, S. Huber, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, P.R. Galle, M. Blessing, S. Rose-John, and M.F. Neurath, *TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. Immunity*, 2004. 21(4): p. 491-501.
52. Vardy, J., S. Rourke, and I.F. Tannock, *Evaluation of cognitive function associated with chemotherapy: a review of published studies and recommendations for future research. J Clin Oncol*, 2007. 25(17): p. 2455-63.
53. Panelli, M.C., E. Wang, G. Phan, M. Puhlmann, L. Miller, G.A. Ohnmacht, H.G. Klein, and F.M. Marincola, *Gene-expression profiling of the response of peripheral blood mononuclear cells and melanoma metastases to systemic IL-2 administration. Genome Biol*, 2002. 3(7): p. RESEARCH0035.
54. Kim, S.H., S.Y. Han, T. Azam, D.Y. Yoon, and C.A. Dinarello, *Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha. Immunity*, 2005. 22(1): p. 131-42.
55. Dahl, C.A., R.P. Schall, H.L. He, and J.S. Cairns, *Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells. J Immunol*, 1992. 148(2): p. 597-603.
56. Azam, T., D. Novick, P. Bufler, D.Y. Yoon, M. Rubinstein, C.A. Dinarello, and S.H. Kim, *Identification of a critical Ig-like domain in IL-18 receptor alpha and characterization of a functional IL-18 receptor complex. J Immunol*, 2003. 171(12): p. 6574-80.
57. Debets, R., J.C. Timans, T. Churakowa, S. Zurawski, R. de Waal Malefyt, K.W. Moore, J.S. Abrams, A. O'Garra, J.F. Bazan, and R.A. Kastelein, *IL-18 receptors, their role in ligand binding and function: anti-IL-1RAcPL antibody, a potent antagonist of IL-18. J Immunol*, 2000. 165(9): p. 4950-6.
58. Kobayashi, H. and P.C. Lin, *Molecular characterization of IL-32 in human endothelial cells. Cytokine*, 2009. 46(3): p. 351-8.

59. Nishida, A., A. Andoh, O. Inatomi, and Y. Fujiyama, *Interleukin-32 expression in the pancreas. J Biol Chem*, 2009. 284(26): p. 17868-76.
60. Chen, Q., H.P. Carroll, and M. Gadina, *The newest interleukins: recent additions to the ever-growing cytokine family. Vitam Horm*, 2006. 74: p. 207-28.
61. Nold-Petry, C.A., M.F. Nold, J.A. Zepp, S.H. Kim, N.F. Voelkel, and C.A. Dinarello, *IL-32-dependent effects of IL-1beta on endothelial cell functions. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(10): p. 3883-8.
62. Shioya, M., A. Nishida, Y. Yagi, A. Ogawa, T. Tsujikawa, S. Kim-Mitsuyama, A. Takayanagi, N. Shimizu, Y. Fujiyama, and A. Andoh, *Epithelial overexpression of interleukin-32alpha in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol*, 2007. 149(3): p. 480-6.
63. Calabrese, F., S. Baraldo, E. Bazzan, F. Lunardi, F. Rea, P. Maestrelli, G. Turato, K. Lokar-Oliani, A. Papi, R. Zuin, P. Sfriso, E. Balestro, C.A. Dinarello, and M. Saetta, *IL-32, a novel proinflammatory cytokine in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med*, 2008. 178(9): p. 894-901.
64. Conti, P., P. Youinou, and T.C. Theoharides, *Modulation of autoimmunity by the latest interleukins (with special emphasis on IL-32). Autoimmun Rev*, 2007. 6(3): p. 131-7.
65. Jeong, H.J., S.Y. Shin, H.A. Oh, M.H. Kim, J.S. Cho, and H.M. Kim, *IL-32 up-regulation is associated with inflammatory cytokine production in allergic rhinitis. J Pathol*, 2011. 224(4): p. 553-63.
66. Jung, M.Y., M.H. Son, S.H. Kim, D. Cho, and T.S. Kim, *IL-32gamma induces the maturation of dendritic cells with Th1- and Th17-polarizing ability through enhanced IL-12 and IL-6 production. J Immunol*, 2011. 186(12): p. 6848-59.
67. Joosten, L.A., M.G. Netea, S.H. Kim, D.Y. Yoon, B. Oppers-Walgreen, T.R. Radstake, P. Barrera, F.A. van de Loo, C.A. Dinarello, and W.B. van den Berg, *IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(9): p. 3298-303.
68. Cagnard, N., F. Letourneur, A. Essabbani, V. Devauchelle, S. Mistou, A. Rapinat, C. Decraene, C. Fournier, and G. Chiochia, *Interleukin-32, CCL2, PF4F1 and GFD10 are the only cytokine/chemokine genes differentially expressed by in vitro cultured rheumatoid and osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes. Eur Cytokine Netw*, 2005. 16(4): p. 289-92.
69. Soyka, M.B., A. Treis, T. Eiwegger, G. Menz, S. Zhang, D. Holzmann, C.A. Akdis, and N. Meyer, *Regulation and expression of IL-32 in chronic rhinosinusitis. Allergy*, 2012. 67(6): p. 790-8.

70. Park, M.H., M.J. Song, M.C. Cho, D.C. Moon, Y. Yoon do, S.B. Han, and J.T. Hong, *Interleukin-32 enhances cytotoxic effect of natural killer cells to cancer cells via activation of death receptor 3*. *Immunology*, 2012. 135(1): p. 63-72.
71. Lee, H.J., Z.L. Liang, S.M. Huang, J.S. Lim, D.Y. Yoon, and J.M. Kim, *Overexpression of IL-32 is a novel prognostic factor in patients with localized clear cell renal cell carcinoma*. *Oncol Lett*, 2012. 3(2): p. 490-496.
72. Hong, J., S. Bae, Y. Kang, D. Yoon, X. Bai, E.D. Chan, T. Azam, C.A. Dinarello, S. Lee, E. Her, G. Rho, and S. Kim, *Suppressing IL-32 in monocytes impairs the induction of the proinflammatory cytokines TNFalpha and IL-1beta*. *Cytokine*, 2010. 49(2): p. 171-6.
73. Carmi, Y., G. Rinott, S. Dotan, M. Elkabets, P. Rider, E. Voronov, and R.N. Apte, *Microenvironment-derived IL-1 and IL-17 interact in the control of lung metastasis*. *J Immunol*, 2011. 186(6): p. 3462-71.
74. Zhou, L., J. Liu, and F. Luo, *Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma*. *World J Gastroenterol*, 2006. 12(8): p. 1175-81.
75. Lopez, J.B., *Recent developments in the first detection of hepatocellular carcinoma*. *Clin Biochem Rev*, 2005. 26(3): p. 65-79.
76. Kang, Y.H., M.Y. Park, D.Y. Yoon, S.R. Han, C.I. Lee, N.Y. Ji, P.K. Myung, H.G. Lee, J.W. Kim, Y.I. Yeom, Y.J. Jang, D.K. Ahn, and E.Y. Song, *Dysregulation of overexpressed IL-32alpha in hepatocellular carcinoma suppresses cell growth and induces apoptosis through inactivation of NF-kappaB and Bcl-2*. *Cancer Lett*, 2012. 318(2): p. 226-33.
77. Li, J., D.J. Minnich, E.R. Camp, A. Brank, S.L. Mackay, and S.N. Hochwald, *Enhanced sensitivity to chemotherapy in esophageal cancer through inhibition of NF-kappaB*. *J Surg Res*, 2006. 132(1): p. 112-20.
78. Olson, J.M. and A.R. Hallahan, *p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy*. *Trends Mol Med*, 2004. 10(3): p. 125-9.
79. Yousif, N.G., F.G. Al-Amran, N. Hadi, J. Lee, and J. Adrienne, *Expression of IL-32 modulates NF-kappaB and p38 MAP kinase pathways in human esophageal cancer*. *Cytokine*, 2013. 61(1): p. 223-7.
80. Sorrentino, C. and E. Di Carlo, *Expression of IL-32 in human lung cancer is related to the histotype and metastatic phenotype*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 180(8): p. 769-79.

81. Lee, S., J.H. Kim, H. Kim, J.W. Kang, S.H. Kim, Y. Yang, J. Kim, J. Park, S. Park, J. Hong, and D.Y. Yoon, *Activation of the interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to human papillomavirus infection and over-expression of interleukin-32 controls the expression of the human papillomavirus oncogene. Immunology*, 2011. 132(3): p. 410-20.
82. Hattori, T., H. Hayashi, T. Chiba, and K. Onozaki, *Activation of two distinct anti-proliferative pathways, apoptosis and p38 MAP kinase-dependent cell cycle arrest, by tumor necrosis factor in human melanoma cell line A375. Eur Cytokine Netw*, 2001. 12(2): p. 244-52.
83. Sondergaard, H. and K. Skak, *IL-21: roles in immunopathology and cancer therapy. Tissue Antigens*, 2009. 74(6): p. 467-79.
84. Asao, H., C. Okuyama, S. Kumaki, N. Ishii, S. Tsuchiya, D. Foster, and K. Sugamura, *Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. J Immunol*, 2001. 167(1): p. 1-5.
85. Zeng, R., R. Spolski, E. Casas, W. Zhu, D.E. Levy, and W.J. Leonard, *The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. Blood*, 2007. 109(10): p. 4135-42.
86. Jin, H., R. Carrio, A. Yu, and T.R. Malek, *Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. J Immunol*, 2004. 173(1): p. 657-65.
87. Zeng, R., R. Spolski, S.E. Finkelstein, S. Oh, P.E. Kovanen, C.S. Hinrichs, C.A. Pise-Masison, M.F. Radonovich, J.N. Brady, N.P. Restifo, J.A. Berzofsky, and W.J. Leonard, *Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. J Exp Med*, 2005. 201(1): p. 139-48.
88. Alves, N.L., F.A. Arosa, and R.A. van Lier, *IL-21 sustains CD28 expression on IL-15-activated human naive CD8+ T cells. J Immunol*, 2005. 175(2): p. 755-62.
89. Brady, J., Y. Hayakawa, M.J. Smyth, and S.L. Nutt, *IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. J Immunol*, 2004. 172(4): p. 2048-58.
90. Coquet, J.M., K. Kyparissoudis, D.G. Pellicci, G. Besra, S.P. Berzins, M.J. Smyth, and D.I. Godfrey, *IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. J Immunol*, 2007. 178(5): p. 2827-34.
91. Brandt, K., S. Bulfone-Paus, A. Jenckel, D.C. Foster, R. Paus, and R. Ruckert, *Interleukin-21 inhibits dendritic cell-mediated T cell activation*

- and induction of contact hypersensitivity in vivo. J Invest Dermatol*, 2003. 121(6): p. 1379-82.
92. Brandt, K., S. Bulfone-Paus, D.C. Foster, and R. Ruckert, *Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. Blood*, 2003. 102(12): p. 4090-8.
 93. Maeda, M., Y. Yanagawa, K. Iwabuchi, K. Minami, Y. Nakamaru, D. Takagi, S. Fukuda, and K. Onoe, *IL-21 enhances dendritic cell ability to induce interferon-gamma production by natural killer T cells. Immunobiology*, 2007. 212(7): p. 537-47.
 94. Pelletier, M., A. Bouchard, and D. Girard, *In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. J Immunol*, 2004. 173(12): p. 7521-30.
 95. Ruckert, R., S. Bulfone-Paus, and K. Brandt, *Interleukin-21 stimulates antigen uptake, protease activity, survival and induction of CD4+ T cell proliferation by murine macrophages. Clin Exp Immunol*, 2008. 151(3): p. 487-95.
 96. Ugai, S., O. Shimosato, K. Kawamura, Y.Q. Wang, T. Yamaguchi, H. Saisho, S. Sakiyama, and M. Tagawa, *Expression of the interleukin-21 gene in murine colon carcinoma cells generates systemic immunity in the inoculated hosts. Cancer Gene Ther*, 2003. 10(3): p. 187-92.
 97. Wang, G., M. Tschoi, R. Spolski, Y. Lou, K. Ozaki, C. Feng, G. Kim, W.J. Leonard, and P. Hwu, *In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. Cancer Res*, 2003. 63(24): p. 9016-22.
 98. Moroz, A., C. Eppolito, Q. Li, J. Tao, C.H. Clegg, and P.A. Shrikant, *IL-21 enhances and sustains CD8+ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. J Immunol*, 2004. 173(2): p. 900-9.
 99. Sondergaard, H., K.S. Frederiksen, P. Thygesen, E.D. Galsgaard, K. Skak, P.E. Kristjansen, N. Odum, and M. Kragh, *Interleukin 21 therapy increases the density of tumor infiltrating CD8+ T cells and inhibits the growth of syngeneic tumors. Cancer Immunol Immunother*, 2007. 56(9): p. 1417-28.
 100. Hinrichs, C.S., R. Spolski, C.M. Paulos, L. Gattinoni, K.W. Kerstann, D.C. Palmer, C.A. Klebanoff, S.A. Rosenberg, W.J. Leonard, and N.P. Restifo, *IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. Blood*, 2008. 111(11): p. 5326-33.
 101. Atkins, M.B., *Interleukin-2: clinical applications. Semin Oncol*, 2002. 29(3 Suppl 7): p. 12-7.

102. Davis, I.D., B.K. Skrumsager, J. Cebon, T. Nicholaou, J.W. Barlow, N.P. Moller, K. Skak, D. Lundsgaard, K.S. Frederiksen, P. Thygesen, and G.A. McArthur, *An open-label, two-arm, phase I trial of recombinant human interleukin-21 in patients with metastatic melanoma. Clin Cancer Res*, 2007. 13(12): p. 3630-6.
103. Thompson, J.A., B.D. Curti, B.G. Redman, S. Bhatia, J.S. Weber, S.S. Agarwala, E.L. Sievers, S.D. Hughes, T.A. DeVries, and D.F. Hausman, *Phase I study of recombinant interleukin-21 in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. J Clin Oncol*, 2008. 26(12): p. 2034-9.
104. Danese, S. and A. Mantovani, *Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. Oncogene*, 2010. 29(23): p. 3313-23.
105. Mantovani, A., *Cancer: Inflaming metastasis. Nature*, 2009. 457(7225): p. 36-7.
106. Fina, D., M. Sarra, M.C. Fantini, A. Rizzo, R. Caruso, F. Caprioli, C. Stolfi, I. Cardolini, M. Dottori, M. Boirivant, F. Pallone, T.T. Macdonald, and G. Monteleone, *Regulation of gut inflammation and th17 cell response by interleukin-21. Gastroenterology*, 2008. 134(4): p. 1038-48.
107. Jauch, D., M. Martin, G. Schiechl, R. Kesselring, H.J. Schlitt, E.K. Geissler, and S. Fichtner-Feigl, *Interleukin 21 controls tumour growth and tumour immunosurveillance in colitis-associated tumorigenesis in mice. Gut*, 2011. 60(12): p. 1678-86.
108. Rutter, M.D., B.P. Saunders, K.H. Wilkinson, S. Rumbles, G. Schofield, M.A. Kamm, C.B. Williams, A.B. Price, I.C. Talbot, and A. Forbes, *Cancer surveillance in longstanding ulcerative colitis: endoscopic appearances help predict cancer risk. Gut*, 2004. 53(12): p. 1813-6.
109. Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill, *Cancer-related inflammation. Nature*, 2008. 454(7203): p. 436-44.
110. Terzic, J., S. Grivennikov, E. Karin, and M. Karin, *Inflammation and colon cancer. Gastroenterology*, 2010. 138(6): p. 2101-2114 e5.
111. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
112. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting. Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 329-60.
113. Burkholder, B., R.Y. Huang, R. Burgess, S. Luo, V.S. Jones, W. Zhang, Z.Q. Lv, C.Y. Gao, B.L. Wang, Y.M. Zhang, and R.P. Huang, *Tumor-*

- induced perturbations of cytokines and immune cell networks. Biochim Biophys Acta*, 2014. 1845(2): p. 182-201.
114. Bindea, G., B. Mlecnik, W.H. Fridman, and J. Galon, *The prognostic impact of anti-cancer immune response: a novel classification of cancer patients. Semin Immunopathol*, 2011. 33(4): p. 335-40.
 115. Fridman, W.H., M.C. Dieu-Nosjean, F. Pages, I. Cremer, D. Damotte, C. Sautes-Fridman, and J. Galon, *The immune microenvironment of human tumors: general significance and clinical impact. Cancer Microenviron*, 2013. 6(2): p. 117-22.
 116. Fridman, W.H., F. Pages, C. Sautes-Fridman, and J. Galon, *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat Rev Cancer*, 2012. 12(4): p. 298-306.
 117. Mlecnik, B., M. Tosolini, A. Kirilovsky, A. Berger, G. Bindea, T. Meatchi, P. Bruneval, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, F. Pages, and J. Galon, *Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. J Clin Oncol*, 2011. 29(6): p. 610-8.
 118. Bindea, G., B. Mlecnik, H.K. Angell, and J. Galon, *The immune landscape of human tumors: Implications for cancer immunotherapy. Oncoimmunology*, 2014. 3(1): p. e27456.

EKLER

EK-1. Etik Kurul İzni



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

21 Aralık 2012

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.07.00/943

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 28 KASIM 2012 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2012/11
Proje No : LUT 12/160 (Değerlendirme Tarihi 28.11.2012)
Karar No : LUT 12/160 - 37

Üniversitemiz Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim görevlilerinden Dr. Füsün Özmen'in sorumlu araştırmacı olduğu Gizem Övgü Erdem'in tezi olan LUT 12/160 kayıt numaralı ve "Kolon Kanseri Hastalarında İnterlökin - 21 ve İnterlökin - 32 gen Ekspresyon Düzeyleri ve Metastaz İlişkisi" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|---|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Songül Vaizoğlu (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | 10. Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye) |
| İZİNLİ | |
| 3. Prof. Dr. Hakan S. Orer (Üye) | 11. Doç. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevdâ F. Müftüoğlu (Üye) | 12. Doç. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmenster (Üye) | 13 Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Kafiye Eroğlu (Üye) | 14. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| İZİNLİ | |
| 7. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsvrev Turnagöl (Üye) |
| GÖREVLİ | GÖREVLİ |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | 16. Av. Meltem Onurlu (Üye) |

EK-2. Çalışmanın sunulduğu bilimsel toplantılar

Erdem G.Ö., Özmen F., Özmen M., (2013) Kolon Kanserli Hastalarda IL-32 Gen Ekspresyonu. **22.Ulusal İmmünoloji Kongresi**, Çeşme 2013, P-116, s:131.

Erdem G.Ö., Özmen F., Özmen M.,(2014) IL-32 and IL-21 Gene Expression Levels in Patients with Colon Cancer. **Molecular Immunology & Immunogenetics Congress**, Antalya, P-077,s:85.