

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

**Kolorektal Kanserlerde Th17 İlişkili IL-17, IL-21 ve IL-22 Sitokinlerinin  
Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi**

**Uzm. Biol. Nurlana İBRAHİMLİ**

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

**ANKARA**

**2019**



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

**Kolorektal Kanserlerde Th17 İlişkili IL-17, IL-21 ve IL-22 Sitokinlerinin  
Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi**

**Uzm. Biol. Nurlana İBRAHİMLİ**

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

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

**ANKARA  
2019**

**Kolorektal Kanserlerde Th17 İlişkili IL-17, IL-21 ve IL-22 Sitokinlerinin  
Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi**

**Öğrenci: Nurlana İbrahimli**

**Danışman: Doç. Dr. Füsun Özmen**

**İkinci Danışman:**

Bu tez çalışması 11-02-2019 tarihinde jürimiz tarafından "Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

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

(imza)

**Tez Danışmanı:** Doç. Dr. Füsun Özmen  
Hacettepe Üniversitesi

(imza)

**Üye:** Prof. Dr. Yasemin Aksoy  
Hacettepe Üniversitesi

(imza)

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Gürcan Günaydın  
Hacettepe Üniversitesi

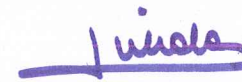
(imza)

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Cem Emir Güldoğan  
İstinye Üniversitesi

(imza)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

11 Şubat 2019



Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir.

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir

  
31/01/2019

Nurlana İbrahimli

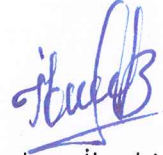
"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \* Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.  
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanının Doç. Dr. Füsun ÖZMEN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Nurlana İbrahimli

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde ve yüksek lisans sürecimin her aşamasında, kıymetli bilgileri ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, gerek duyduğum her an bana zamanını harcayan, gelecek hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım danışman hocam sayın Doç. Dr. Füsün Özmen' e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Hasta ve kontrol grubu örneklerinin toplanmasını sağlayan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD. öğretim üyeleri Prof. Dr. M. Mahir Özmen ve Doç. Dr. T. Tolga Şahin'e ve Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniğinden Doç. Dr. Keşşaf Aşlar ve Op. Dr. C. Emir Güldoğan'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalar boyunca ilgi ve desteğini hep üzerimde hissettiğim, bilgi ve tecrübeleri ile sürekli katkıda bulunan sevgili hocalarım Prof. Dr. Lale Doğan'a, Prof. Dr. Dicle Güç'e, Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya ve özellikle manevi desteğini benden hiç esirgemeyen sevgili hocam Öğr. Gör. Hande Canpınar' a ve Temel Onkoloji AD. öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca maddi-manevi destekleri ve sabırlarından dolayı aileme, sevgili eşime sonsuz teşekkür ederim.

## ÖZET

**İbrahimli N. Kolorektal kanserlerde Th17 ilişkili IL-17, IL-21 ve IL-22 sitokinlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019.**

Tümör mikroçevresinde bulunan immün sistem hücreleri ve salgıladıkları sitokinler, tümörün immün fenotipini belirlerler ve kolorektal kanser prognozunda çok önemli bir role sahiptirler. Th17 hücreleri de birçok tümör mikroçevresinde bulunur ve klinik veriler üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı Th17 ilişkili IL-17A, IL-21, IL-22 sitokinlerinin serum düzeylerini ve bunların klinikopatolojik parametrelerle olan korelasyonunu incelemektir. 40 (19K) kolorektal kanser hastası ve 40 (18K) sağlıklı kontrol araştırmaya dahil edildi. Hastalarda ameliyat öncesi kan örnekleri alınarak ELISA testi ile IL-17A, IL-21 ve IL-22 serum düzeyleri (pg/ml) ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Serum düzeyleri ile evre, diferansiyasyon, lenf nodu tutulumu, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon ve metastaz arasındaki korelasyon incelendi. Hasta grubunda IL-17A, IL-21 ve IL-22 serum düzeyleri sırasıyla 3,11 (2,99-3,73), 108,3 (11,9-1394) ve 38,8 (38,4-42,9) pg/ml olarak bulundu. Kontrol grubunda ise sitokin düzeyleri IL-17A, IL-21 ve IL-22 için sırasıyla 1,3 (0,7-6,2), 123,12 (61,8-1157,6) ve 15,44 (0,15-143,9) pg/ml olarak saptandı. IL-17A ve IL-22 serum düzeyleri hasta grubunda belirgin artmıştı ve bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlıydı ( $p<0.001$ ). Eşik-değeri olarak ise IL-17A için 2,755 pg/ml ve IL-22 için ise 35,63 pg/ml olarak bulundu. Bu düzeylerin üzerindeki herhangi bir değer kolorektal kanser ile ilişkili olabileceği düşünüldü ( $p<0.001$ ). Biz IL-17A, IL-21 ve IL-22 hasta serum düzeyleri ile diferansiyasyon, Modifiye Astler Coller sınıflaması, lenf nodu tutulumu, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve uzak metastaz arasında herhangi bir korelasyon saptayamadık. Sonuç olarak IL-17A ve IL-22 sitokinlerinin sistemik ekspresyonu, kolorektal kanser hastalarında artmaktadır. Bu nedenle artmış IL-17A ve IL-22 serum düzeyi saptanan hastalar, kolorektal kanser açısından araştırılmaya aday olabilirler.

**Anahtar Kelimeler:** Th17, IL-17A, IL-21, IL-22, kolorektal kanser



## ABSTRACT

**İbrahimli N. Determination of expression levels of Th17 related cytokines IL-17, IL-21, IL-22 cytokines in colorectal cancer, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Master Thesis of Tumor Biology and Immunology, Ankara, 2019.**

Immune system cells and released cytokines in tumor microenvironment have a very important role in cancer prognosis. Also, T-helper 17 (Th17) cells have been frequently found in many tumors microenvironment and their effects on the clinical outcomes are not fully understood. The aim of this study was to evaluate serum levels of Th17 related cytokines IL-17A, IL-21 and IL-22 and their correlation with clinicopathologic parameters of colorectal cancer. 40 (19F) patients with colorectal cancer and 40 (18F) healthy controls included in the study. Preoperative blood samples were collected from the patients for measurement of IL-17A, IL-21 and IL-22 serum levels (*pg/ml*) using ELISA and the results were compared with the levels in healthy controls. Correlation between serum interleukin levels and stage, differentiation, lymph node invasion, perineural and lymphovascular invasions, the presence of metastasis were also evaluated. IL-17A, IL-21 and IL-22 levels as *pg/ml* were 3,11 (2,99-3,73), 108,3 (11,9-1394) ve 38,8 (38,4-42,9) respectively in patients with colonic cancer. Whereas, they were 1,3 (0,7-6,2), 123,12 (61,8-1157,6) ve 15,44 (0,15-143,9) *pg/ml* respectively in healthy controls. IL-17A and IL-22 were found to be increased significantly in patients with colorectal cancer ( $p < 0.001$ ). The cut-off value for the significance of IL-17A was found to be 2,755 *pg/ml* and cut-off value for IL-22 was found to be 35.63 *pg/ml*. Any values over these were found to be correlated with colonic cancer ( $p < 0.001$ ). We couldn't find any correlation between interleukin expression levels and tumor differentiation, Modified Astler-Coller, the presence of lymph nodes metastasis, lymphovascular invasion, perineural invasion, and distant metastasis. In conclusion, systemic expression of IL-17A and IL-22 increases in patients with colorectal cancer. Therefore, patients with increased serum levels of IL-17A and IL-22 should be evaluated further for colorectal cancer.

**Keywords:** Th17, IL-17A, IL-21, IL-22, colorectal cancer

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Tümör ve Mikroçevre İlişkisi	3
2.2. Th17 Hücreleri	6
2.3. Kolon Kanseri ile IL-17 İlişkisi	9
2.4. Kolon Kanseri ile IL-21 İlişkisi	12
2.5. Kolon Kanseri ile IL-22 İlişkisi	14
2.6. Kolon Anatomisi Ve Kolon Kanseri	16
2.6.1. Kolon Kanseri	17
2.6.2. Kolon Kanseri ve İmmün Sistem İlişkisi	17
2.6.3. Kolon Kanseri Patolojisi	19
<b>3. BİREYLER ve YÖNTEMLER</b>	<b>23</b>
3.1. Hastalar ve Kontrol Grubu	23
3.2. Kan Örneğinden Serum Ayrılması	23
3.3. ELISA Testi	24
3.3.1. IL-17A ELISA Protokolü	24
3.3.2. IL-21 ELISA Protokolü	25
3.3.3. IL-22 ELISA protokolü	26
3.4. İstatistik Analiz	28

<b>4. BULGULAR</b>	29
4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Dağılımı	29
4.2. IL-17A, IL-21 ve IL-22 Serum Düzeylerinin Gruplara Göre Dağılımı	29
4.3. IL-17A, IL-21 ve IL-22 Serum Düzeylerinin Hasta Klinikopatolojik Bulguları ile İlişkisi	33
4.3.1. Diferansiyasyon ile Sitokinlerin Serum Düzeyleri arasındaki ilişki	35
4.3.2. Tümör Evresi ile Sitokinlerin Serum Düzeyleri arasındaki ilişki	37
4.3.3. Patolojik Lenf Nodu (PLN) ile Sitokinlerin Serum Düzeyleri arasındaki ilişki	39
4.3.4. Perinöral invazyon ile Sitokinlerin Serum Düzeyleri arasındaki ilişki	43
4.3.5. Lenfovasküler İnvazyon ile Sitokinlerin Serum Düzeyleri arasındaki ilişki	45
4.3.6. Metastaz ile Sitokinlerin Serum Düzeyleri arasındaki ilişki	48
<b>5. TARTIŞMA</b>	49
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	53
<b>7. KAYNAKLAR</b>	55
<b>8.EKLER</b>	
EK-1. Tez Çalışması Etik Kurul İzni	
EK-2. Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-3. Dijital Makbuz	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>DC</b>	Dendritik hücre
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>FAP</b>	Ailesel adenomatöz polipozis koli
<b>GALT</b>	Gut-associated lymphoid tissues
<b>G-CSF</b>	Granülosit Koloni Stimülatör Faktör
<b>HNPCC</b>	Hereditör nonpolipozis koli- <i>Lynch</i> sendromu
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	İnterferon gama
<b>IgA</b>	İmmünglobulin A
<b>IgG</b>	İmmünglobulin G
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>ILH</b>	İnnate lenfoid hücreler
<b>MAC</b>	Modifiye Astler-Coller sınıflaması
<b>MALT</b>	Mucosa-associated lymphoid tissues
<b>MDSC</b>	Miyeloid kökenli süpresör hücreler
<b>mRNA</b>	<i>messenger</i> -RNA
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nükleer faktör kappa B
<b>NK</b>	Doğal öldürücü hücre ( <i>Natural killer Cell</i> )
<b>NKT</b>	Doğal öldürücü T-hücresi ( <i>Natural killer-T Cell</i> )
<b>p53</b>	Tümör süpresör protein 53
<b>STAT3</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
<b>Th</b>	Yardımcı T hücresi ( <i>T helper cell</i> )
<b>Th17</b>	Yardımcı T hücre 17 ( <i>T helper cell</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör nekrotizan faktör alfa
<b>Treg</b>	T regülatuvar hücre
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Tümör gelişiminde immün sistem hücrelerinin rolü.	4
2.2.	CD4 <sup>+</sup> T hücre alt grupları.	5
2.3.	Th17 hücresinden eksprese olan sitokinler.	7
2.4.	Th17 hücrelerinin tümör gelişimindeki dual etkileri.	9
2.5.	Kolon anatomisi ve histolojisi.	16
2.6.	Kolon kanseri gelişiminde IL-17A, IL-21 ve IL-22 sitokinlerinin rolü.	18
3.1.	IL-17A dilusyonel olarak standart hazırlaması.	25
3.2.	IL-21 dilusyonel olarak standart hazırlaması.	26
3.3.	IL-22 dilusyonel olarak standart hazırlaması.	27
4.1.	Hasta ve kontrol grubu IL-17A serum düzeyleri.	30
4.2.	Hasta ve kontrol grubu IL-22 serum düzeyleri.	31
4.3.	Hasta ve kontrol grubu IL-21 serum düzeyleri.	32
4.4.	Diferansiyasyon derecesine göre IL-17A serum düzeyleri.	35
4.5.	Diferansiyasyon derecesine göre IL-22 serum düzeyleri.	36
4.6.	Diferansiyasyon derecesine göre IL-21 serum düzeyleri.	37
4.7.	Modifiye Astler-Coller Evresine göre IL-17A serum düzeyleri.	38
4.8.	Modifiye Astler-Coller Evresine göre IL-22 serum düzeyleri.	38
4.9.	Modifiye Astler-Coller Evresine göre IL-21 serum düzeyleri.	39
4.10.	Patolojik lenf nodu tutulumuna göre IL-17A serum düzeyleri.	40
4.11.	Patolojik lenf nodu tutulumuna göre IL-22 serum düzeyleri.	41
4.12.	Patolojik lenf nodu tutulumuna göre IL-21 serum düzeyleri.	42
4.13.	Perinöral invazyon ile IL-17A serum düzeylerinin ilişkisi.	43
4.14.	Perinöral invazyon ile IL-22 serum düzeylerinin ilişkisi.	44
4.15.	Perinöral invazyon ile IL-21 serum düzeylerinin ilişkisi.	45
4.16.	Lenfovasküler invazyon ile IL-17A serum düzeylerinin ilişkisi.	46
4.17.	Lenfovasküler invazyon ile IL-22 serum düzeylerinin ilişkisi.	46
4.18.	Lenfovasküler invazyon ile IL-21 serum düzeylerinin ilişkisi.	47

**TABLULAR**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b>	IL-17A, IL-21, IL-22 sitokinlerinin özellikleri.	15
<b>2.2.</b>	Kolon kanseri evreleme sistemleri.	20
<b>4.1.</b>	Çalışma gruplarının demografik özellikleri.	29
<b>4.2.</b>	IL-17A, IL-21, IL-22 sitokinlerinin gruplara göre serum düzeylerinin dağılımı (pg/ml).	30
<b>4.3.</b>	IL-17A ve IL-22 sitokinlerinin eşik değerleri.	31
<b>4.4.</b>	Sitokin serum düzeyleri ile klinikopatolojik bulgular arasındaki ilişki.	34
<b>4.5.</b>	Sitokin serum düzeyleri ile diferansiyasyon arasındaki ilişki.	37
<b>4.6.</b>	Sitokin serum düzeyleri ile Modifiye Astler-Coller evresi arasındaki ilişki.	39
<b>4.7.</b>	Sitokin serum düzeyleri ile patolojik lenf nodu tutulumu arasındaki ilişki.	42
<b>4.8.</b>	Sitokin serum düzeyleri ile perinöral invazyon arasındaki ilişki.	45
<b>4.9.</b>	Sitokin serum düzeyleri ile perinöral invazyon arasındaki ilişki.	47
<b>4.10.</b>	Sitokin serum düzeyleri ile uzak metastaz arasındaki ilişki.	48

## 1. GİRİŞ

Kanser gelişiminde mikroçevrenin ve immün hücrelerin önemi uzun süredir bilinmektedir. Bu hücrelerin tipi, miktarı ve eksprese ettikleri sitokin tipi kanserin kaderini belirlemektedir. Ayrıca kanserin evresine göre işlevleri değişebilmektedir. Kanser kendine özgü mikroçevresi ilk evrelerde tümörlü hücrelerin dokuda gelişimini ve yayılımını önlediği gibi, sonraki evrelerde tümör oluşumunu engelleyen immün hücrelerin fonksiyonlarını baskılayarak, tümör hücrelerinin büyümesine destek sağlayabilmektedir. Th17 hücreler de CD4<sup>+</sup> T hücre alt grubunda yer alan ve tümörle olan ilişkisi araştırılmakta olan bir hücredir. Th17 ilişkili IL-17, IL-21 ve IL-22 sitokinleri de, tümör mikroçevresinde bulunan proinflamatuvar sitokinlerdendir.

Th17 kökenli IL-17, IL-21 ve IL-22 sitokinlerin proinflamatuvar etkisi ile kanserli hastaların prognozunun kötü yönde etkilenebileceği düşünülmektedir. Kanser patogenezi göre, adenom oluşumu için etkili olan genetik mutasyonlar zamanla bazı tümörlerin kansere dönüşümünde etkili olmaktadır. Her yıl bir milyondan fazla yeni tanı konulan kolon kanseri, sporadik, kalıtsal veya inflamatuvar barsak hastalıkları sonrası gelişebilmektedir. Th17 ilişkili IL-17, IL-21 ve IL-22 sitokinlerinin proinflamatuvar özellikleri nedeniyle sporadik kolorektal kanserleri ne yönde etkilediği ve nasıl bir değişim gösterdiği ile ilgili tartışmalar henüz devam etmektedir (1). Çünkü bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğunluğu hücre kültürü ve deney hayvanları ile yapılmıştır. Hastalar ile yapılan çalışmaların çoğunluğu ise biyopsi veya operasyonla çıkarılan doku örneklerinde Th17 ilişkili sitokinlerin immünohistokimya ile belirlenmesi yöntemine dayanmaktadır. Bu sitokinlerin dokuda mRNA düzeylerine bakılmış olsa da, tüm bu deneylerin bazı sonuçları hala tartışmalıdır (2). Literatüre bakıldığı zaman, kolon kanserli hastaların serumlarında Th17 hücrelerinden salgılanan IL-17, IL-21 ve IL-22 sitokin düzeylerinin birlikte ölçüldüğü ve sitokin düzeylerinin birbiriyle olan ilişkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu nedenle sporadik kolorektal kanserlerin tanı ve tedavisi için mikroçevrede bulunan sitokinlerin ve kemokinlerin daha fazla araştırılmasına gereksinim vardır.

Sporadik kolorektal kanser dünyada en sık görülen , önlenebilir kanserlerden bir tanesidir. Her yeni tanı alan kanser vakasının %10'nu kolon kanserleri oluşturmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri ve Batı Avrupa gibi sosyo-ekonomik düzeyi yüksek olan ülkelerde görülen kanserler arasında da ilk sıralarda yer almaktadır. Yaşla birlikte riskin artması , her jenerasyon için koruyucu tarama yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir (3). Bu nedenle yukarıda verilen bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, erken tanı için immün hücrelerin ekspres ettikleri sitokinler kullanılması söz konusu olabilir.

Bu çalışmanın amacı da, kolorektal kanser tanısı alan hastalarda Th17 hücrelerinden salgılanan IL-17, IL-21, IL-22 sitokinlerinin serum düzeylerinin sağlıklı kişilere göre nasıl değişim gösterdiğinin değerlendirmesi, kolorektal kanser hastalarında Th17 ilişkili sitokinlerin serum düzeyleri ile klinikopatolojik bulgular (tümör evresi, diferansiyasyon, patolojik lenf nodu tutulumu, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ) arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.



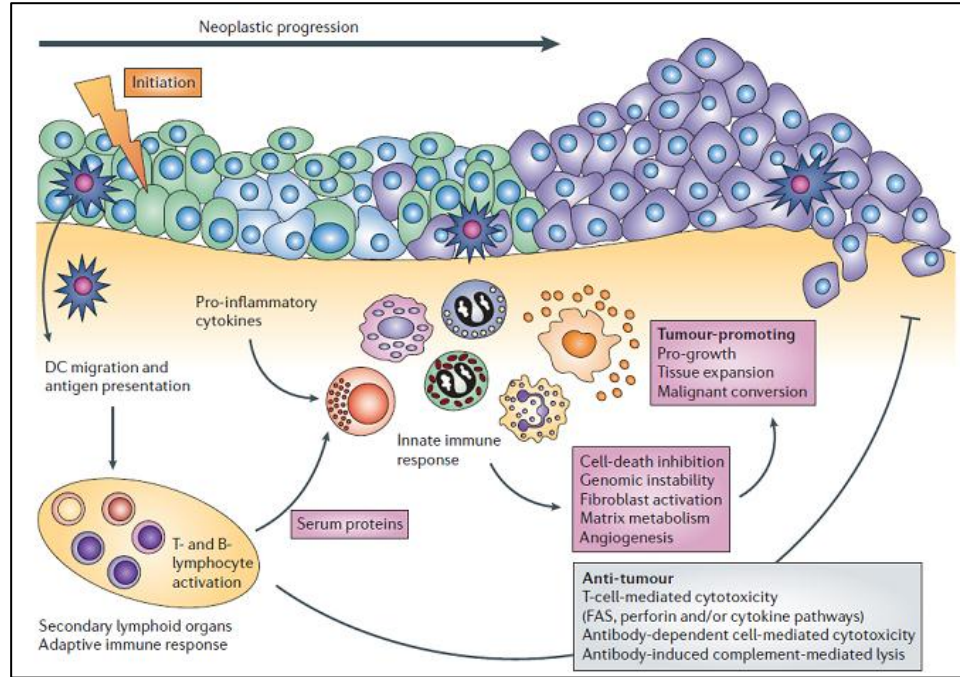
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tümör ve Mikroçevre İlişkisi

Çevresel karsinojenlerin etkisi, genetik ve epigenetik değişimler sonucu hücrelerin kontrol edilemeyecek şekilde çoğalarak tümör hücrelerinin oluşması, “mikroçevre” isimli bir alanda gerçekleşmektedir. Tümör mikroçevresi tümör hücrelerinden, tümörü infiltre eden immün sistem hücrelerinden ve stromal hücrelerden oluşur. Solid tümörler genellikle immün hücreler (T ve B lenfositleri, doğal öldürücü hücreler (NK), dendritik hücreler (DC), makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller ve mast hücreleri) tarafından infiltre edilir. Tümör içerisine farklı oranlarda dağılmış bu hücreler, tümör ile konak arasındaki etkileşimlerin çeşitliliğini de yansıtmaktadır (Şekil 2.1). Kolorektal kanserlerde tümör-konak etkileşimini gösteren analizler geliştirilmiş ve farklı tümör bölgelerindeki immün hücre popülasyonlarının doğası, fonksiyonel yönelimi, yoğunluğu ve lokalizasyonu klinik sonuçlarla ilişkili olarak araştırılmıştır (4).

Tümör mikroçevresindeki hücreler, birbirleriyle heterotipik etkileşime dahil olan çok sayıda farklı hücre tipini içermektedir. Bu sebepten tümörler, çeşitli mezenşimal ve inflamatuvar hücrelerden oluşan bir organ olarak kabul edilmiştir. Epitelial mezenşimal transformasyona uğrayan birçok kanser hücresi, farklı mikroçevresel uyaranlara maruz kalmaktadır. Aynı zamanda, farklı kanser hücre kolonileri kendine uygun mikroçevreyi geliştirebilmektedir. Bu hücre kolonilerine uygun heterojen mikroçevre morfolojisi genellikle kolorektal kanserlerde daha çok görülmektedir (5,6).

İmmün sistem tümörün başlangıç aşamalarında tümörlere karşı koruma etkisi ile birlikte, ileri aşamalarda tümöre karşı tolerans geliştirebilir ve tümör oluşumu için yardım edici işlev gösterebilmektedir (6,7).

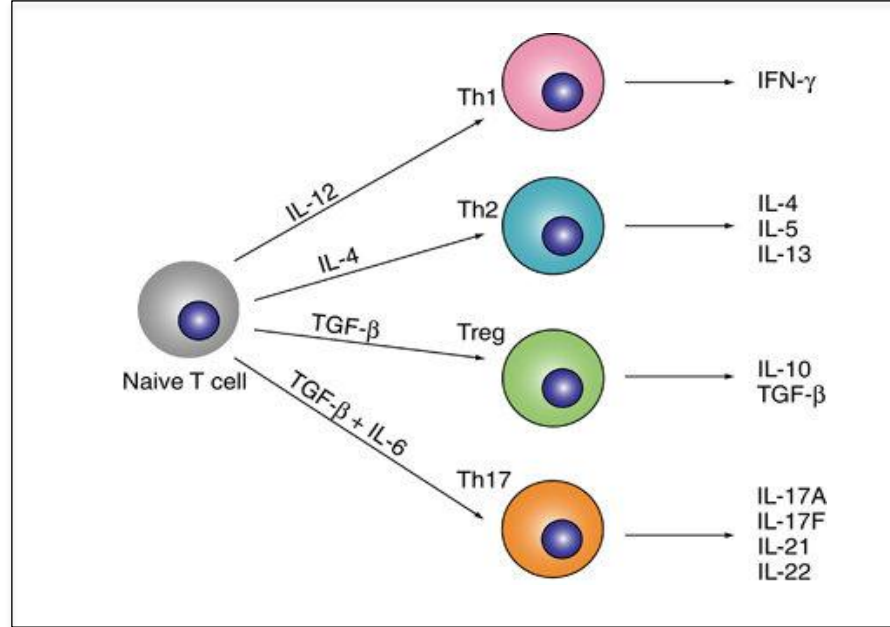


**Şekil 2.1.** Tümör gelişiminde immün sistem hücrelerinin rolü (69).

Tümör mikroçevresinin kanser immünoterapisinde önemli olmasının sebebi, tümör mikroçevresi tümör oluşumunu engelleyen immün hücrelerin fonksiyonlarını bozarak immün yanıtı baskılar ve tümör için uygun ortam sağlarlar. Buradaki hücreler kemokin aracılı onkojenik sinyaller ile tümörün proliferasyonu ve invazyonunda aktif rol aldıkları için tümör mikroçevresinin ve buradaki immün hücrelerin incelenmesi tümörün tanı ve tedavisinde önemlidir (8,9).

İmmün sistemin önemli bir parçası olduğu için, T hücreleri tümör mikroçevresinin de önemli bir bileşenidir (10). Tümör mikroçevresindeki hücreler immün yanıtları baskılayan hücreleri modüle edebildiği gibi, aynı zamanda efektör T lenfositler aracılığı ile tümöre karşı immün yanıtların gelişmesine de yardımcı olmaktadır (8). Naif  $CD4^+$  T hücreleri, konak savunmasında farklı fonksiyonlara sahip yardımcı T hücre (Th) alt gruplarına ayrılır. T lenfositler tümör hücre antijenlerini tanıyarak immün sistem mekanizmalarını uyarırlar.  $CD4^+$  T hücreler, fagositleri ve diğer immün hücreleri uyararak,  $CD8^+$  sitotoksik T hücreler (CTL) ise tümör hücrelerini sitoliz ve apoptozis aracılığı ile ortadan kaldırır.  $CD4^+$  naif T

hücre grubu sitokinler ve dendritik hücreler aracılığı ile farklı biyolojik işlevlerle karakterize edilen alt gruplara ayrılırlar (Şekil 2.2)



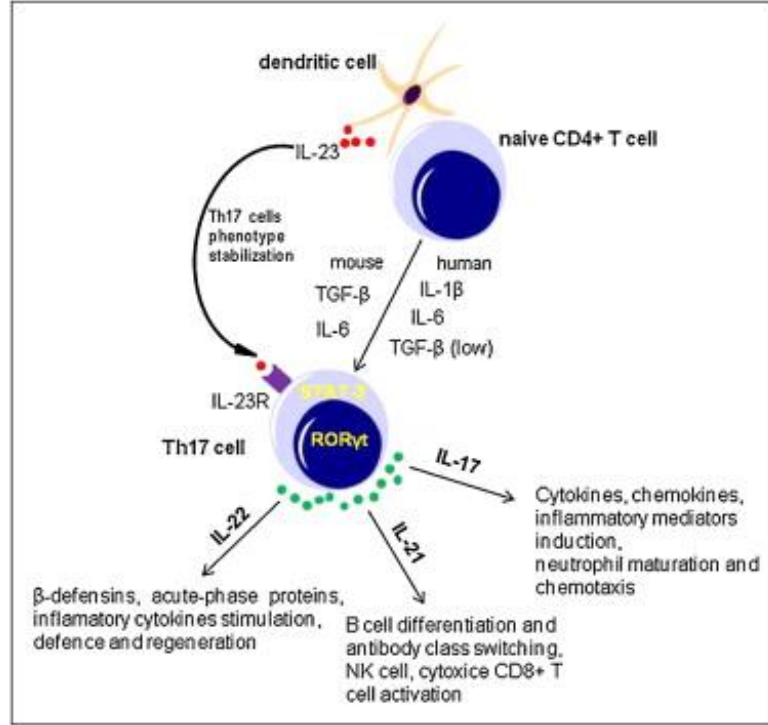
**Şekil 2.2.** CD4<sup>+</sup> T hücre alt grupları (70).

Th1 hücreleri, CD40 ligand-CD40 etkileşimi ve IFN- $\gamma$  salınımı ile makrofajları etkinleştirerek fagositik aktivitesini arttırmaktadırlar. Enfeksiyonlara karşı savunmada önemli olan Th2 hücreleri IL-4 salgılayarak IgE aracılı mast hücre aktivasyonu ile parazitlerle mücadeleyi gerçekleştirmektedirler. Aynı zamanda, IL-4 sekresyonu ile makrofaj aktivasyonunun klasik yolağını baskıladığı için Th1 hücrelerin etkilerini dengelerler. Th17 hücreleri ise, enfeksiyonun ortadan kalkması için ortama daha fazla lökosit toplanmasını sağlamakta ve belirli patojenleri yok etme yeteneğine sahip olan defensinlerin üretimini uyararak enfeksiyonlara karşı savunmayı güçlendirmektedirler. Regulator T hücreleri (Treg) ise gerektiği zaman IL-10 ve TGF- $\beta$  sitokinleri ile IL-2 etkisini engelleyerek dendritik hücre ve makrofajları baskılayarak immün yanıtın sınırlandırılmasını sağlamaktadırlar. Bu şekilde Treg hücreler immünsüpresif bir mikroçevre oluşturmakta ve immün gözetime katkıda

bulunmaktadırlar (10, 11). Bu fonksiyonlarından dolayı Th hücre grubu ve sitokinleri tümör mikroçevresinde önemlidirler.

## 2.2. Th17 Hücreleri

İnflamasyon, enfeksiyon için önemli bir yanıttır, fakat kontrolsüz olduğunda inflamatuvar hastalıklara katkıda bulunabilir. İnsanda inflamatuvar hastalıklara neden olabileceği düşünülen Th17 hücreleri, tümör immünolojisinde büyük öneme sahip efektör  $CD4^+$  T hücrelerinin bir alt grubudur (12). Th17 lenfositleri, özellikle hücre dışı bakterilere yanıt olarak IL17 proinflamatuvar sitokini üreten T hücreleridir ve 2005 yılında IL-17 sekrete etmeleri nedeniyle tanımlanmış, Th17 adını almıştır. Naif  $CD4^+$  T lenfositleri IL-1, IL-6, TGF- $\beta$  etkisi ile diferansiyasyon geçirir ve Th17 hücre fenotipine dönüşürler. Bu diferansiyasyonun gelişebilmesi için IL-23 sitokini de gereklidir ve Th17 hücrelerinin hayatta kalmasında önemli rol oynar (13, 14, 15, 16). Th17 hücrelerinde transkripsiyon faktörleri (STAT3, ROR $\gamma$ t ve ROR $\alpha$ ) tespit edilmiştir. IL-6, STAT3'ü aktive etmesiyle, Foxp3 indüksiyonunu inhibe eder ve bunun sonucunda Th17 hücrelerinin oluşmasına izin verir. Th1 farklılaşmasını destekleyen iki temel sitokin olan IL-12 ve IFN- $\gamma$ , Th17 farklılaşmasını bloke eder (17). Th17 hücreleri, IL-17A, IL-17F, IL-21 ve IL-22 gibi çeşitli sitokinlerle birlikte kendisine spesifik olmayan CCL20, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-10 ve IL-26 sitokinlerini de üretirler (Şekil 2.3) (13). Th17 hücrelerinde doğrudan tümör hücrelerini öldürme aktivitesi görülmemiştir. Th17 hücreleri, dendritik hücreler (DH) ile  $CD4^+$  T ve  $CD8^+$  T hücreleri uyarırlar (18). IL-17 proinflamatuvar sitokini üreten Th17 hücreleri, inflamatuvar yanıtın sürdürülmesinde kritik bir rol oynadıkları için otoimmün doku hasarının indüklenmesinde önemli bir role sahiptir (19). Th17 hücrenin hayatta kalması için gerekli olan IL-23 sitokinleri ile, enfeksiyonlara daha güçlü bir immün yanıt verilmesi için inflamasyonu tetikleyerek konak savunmasını gerçekleştirmektedirler. Th17 hücreleri lökosit birikiminden sorumlu oldukları için doku hasar mekanizmalarının da önemli bir komponentini oluşturmaktadır (11).

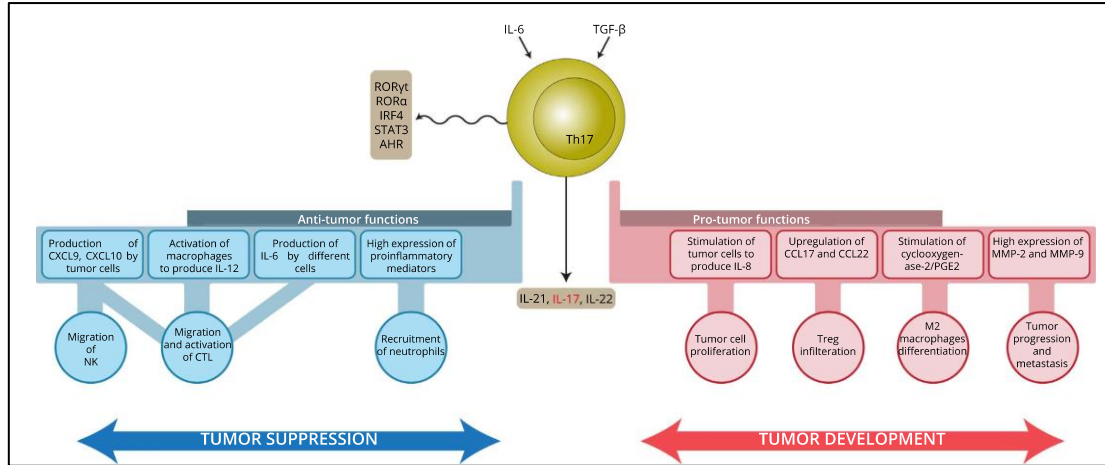


**Şekil 2.3.** Th17 hücresinden eksprese olan sitokinler (71).

TGF- $\beta$ , gelişen Th17 hücrelerinde IFN- $\gamma$  indüksiyonunu bloke eder. Th17 hücrelerinin barsak immun yanıtlarına aracılık ettiği, bu şekilde düşünülmüştür. (20, 21, 22). Bu nedenle, naif T hücrelerin Th17'ye farklılaşmasında IL-6 ve TGF- $\beta$  sitokinlerinin birlikte uyarımı daha etkili olmaktadır. Sadece TGF- $\beta$  etkisi olduğunda T hücrelerinin Treg hücrelerine doğru farklılaşması sağlanmaktadır. Bu şekilde, Th17 lenfositleri (proinflamatuvar) ile düzenleyici Treg lenfositleri (anti-inflamatuvar) arasında bir dengenin olduğu düşünülmektedir (20, 23). Tümör infiltrate Th17 hücreleri, diğer bir çok efektör hücreler ile pozitif ilişkili olduğu gibi, aynı zamanda Treg hücreleri ile de negatif ilişkilidirler. Yapılan fare deneylerinde Treg'lerin depleksyonu koliti arttırmış, IL-2 blokajı, Treg deplese edilen hayvanlarda Th17 yanıtlarını ve tümör oluşumunu geri kazandırmıştır (24). Treg hücre büyümesini ve gelişimini destekleyen IL-2'nin, Th17 farklılaşması üzerinde negatif bir etkisi olduğu da gösterilmiştir (25). Tümör ilişkili makrofajlar (TAM), interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) aracılığıyla Th17 hücrelerini desteklerken, tümör infiltrate Treg hücreleri, Th17 hücrelerini inhibe ederler. Over kanserli hastaların tümör mikroçevresinde, Th17 ve Treg hücreleri arasında ters korelasyon görülmüştür. Aynı zamanda, bu

mikroçevrede NK hücrelerinin sayısı, Th17 hücre sayısı yüksek olan hastalarda daha yüksek bulunmuştur (26). Preeklampsi hastalarında yapılan bir çalışmada ise hasta ve sağlıklı gruplar karşılaştırıldığında, Th17 hücrelerinin (özellikle IL-17A) hasta gruplarda daha yüksek olduğu, aynı zamanda Th17 hücrelerinin yüksek olduğu durumlarda Treg hücre popülasyonunun daha az olduğu tespit edilmiştir (27). Bazı çalışmalarda, mukozal bağışıklık sisteminde Treg lenfositlerinin olmaması durumunda, periferel tolerans kaybı olduğu ve dolayısıyla inflamasyonun devam ettiği gösterilmiştir (28, 29, 30). Kryczek ve arkadaşları over kanserli hastalarda, Th17 hücrelerinin IL-17 sitokin seviyelerinin azalmasının hasta sonuçlarını olumlu şekilde etkilediğini tespit etmişlerdir. Tümörlü bölgelerde Th17 hücrelerinin oranının daha yüksek olması, bu hücrelerin indüklenerek tümör mikroçevresine göç edebileceğini düşündürmektedir (26). Crohn hastalığında endoskopik biyopsilerde IL-17, IL-23 ve IL-12 sitokinlerinin yüksek olduğu ve Crohn hastalığında ülseratif kolit hastaları ve kontrol gruplarına göre CD4<sup>+</sup>T lenfositlerinin daha fazla IL-17 salgıladığı gösterilmiştir (31). Gastrointestinal sistemdeki inflamatuvar koşullar ile Th17 hücrelerinin zamanla immün baskılayıcı bir fenotip kazanabileceği Esplugues ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (32). İnflamatuvar barsak hastalıklarında, özellikle Th17 hücrelerinin önemi, biyopsi ile alınan doku örneklerinde düzeyinin artması ile gösterilmiştir (33). Farelerde yapılan deneylerde ise kolon tümörü gelişiminde IL-23R<sup>+</sup> Th17 hücrelerinin önemli oldukları gösterilmiştir (34). Th17 hücreleri mukozal yüzeylerde nötrofil mobilizasyonu ve antimikrobik faktörlerin ekspresyonunu destekleyen proinflamatuvar tehlike sinyallerini de tetiklemektedir (35,36). Kolonda ki Th17 ve Treg hücrelerin dengesi, barsak homeostazını korumak açısından inflamatuvar barsak hastalığı sonrası gelişen kolon kanseri açısından önemlidir (37). Th17 hücrelerinin uyarılması ve çoğaltılması için CCL20 ve PGE2 gerekli olmakta ve bu işlemler MyD88 yolağı ile gerçekleşmektedir. Barsak inflamasyonunu ve kolon kanseri gelişimini, sfingozin-1-fosfat, CCL20 ve prostaglandin E2 (PGE2) teşvik ettiği için, Th17 hücrelerinin barsak homeostazında rol oynadığını ve kolon kanseri ile ilişkili olduğu görülmektedir (38). Bu nedenlerle,

Th17 hücrelerinin tümör mikroçevresinde, özellikle kolon kanserinde inflamatuvar yanıtlara katkıda bulunduğu düşünülmektedir.



**Şekil 2.4.** Th17 hücrelerinin tümör gelişimindeki dual etkileri (72).

### 2.3. Kolon Kanseri ile IL-17 İlişkisi

Effektör T hücre yanıtları, enfeksiyonun türüne bağlı olarak CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin farklı yardımcı T (Th) hücre alt gruplarına ayrılmasını gerektirir. Bu Th hücre alt gruplarının her biri patojenlere karşı savunmada diğer immün hücrelere yardım ederek belirli roller üstlenir.

1986'da Coffman, Mosmann ve arkadaşları, yardımcı T hücrelerinin Th1 ve Th2 hücreleri olarak adlandırılan farklı alt kümelerinin var olduğunu makalelerinde göstermişlerdir (39). Daha sonra, Th17 hücreleri, IL-17, IL-17F ve IL-22 üreten yeni bir CD4<sup>+</sup> T hücre alt grubu olarak karakterize edildi (40). Proinflamatuvar sitokin olan interlökin 17 (IL-17), güçlü hücrel tepkileri ortaya çıkaran protein ailesi üyesidir. Bazı deneysel yaklaşımlar, IL-1 $\beta$ 'nin, hafıza Th17 ve  $\gamma\delta$  T hücrelerinin IL-17 üretimini teşvik ettiğini göstermiştir. Aynı zamanda, IL-1 $\beta$ 'nin T hücreleri tarafından IL-17 sitokin sekresyonunu daha fazla tetiklemek için diğer hücreleri de modüle edebileceğini ve IL-1 $\beta$  tarafından indüklenen insan immatür DC'lerin, insan hafıza CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde IL-17 üretimini teşvik ettiğini göstermişlerdir (41). IL-17, Th17

hücrelerinin önemli sitokini olarak görülse de, diğer hücre tipleri de IL-17'yi eksprese etmektedirler. Baş- boyun, yumurtalık, endometrial, prostat, göğüs, akciğer ve kolon tümör stroması ve tümör epitelinde, IL-17 sitokini nötrofiller (% 66), mast hücreleri (% 23) ve lenfoid hücreler (% 8) tarafından eksprese edildiği gösterilmiştir. Th17 hücrelerin, bunlara göre daha küçük IL-17 sekrete eden popülasyon olduğu belirtilmiştir (% 4) (19). IL-17 yanıtı, çeşitli enfeksiyonlara karşı vücudu savunmakla beraber, kronik inflamasyon sonrasında önemli risk faktörü olarak, çift taraflı işlev görmektedir (29,30,35,42). Th17 hücrelerinin çeşitli otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların patogeneziyle ilişkili olabileceği düşünülmekte, IL-17'nin romatoid artrit, multipl skleroz, sistemik skleroz, sistemik lupus eritematosus, sedef hastalığı, *helicobacter pylori* ilişkili gastrit, bronşiyal astım ve renal allograft reddi gibi çeşitli inflamatuvar bozukluklarla ilişkili olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir (43,44, 45). Bazı *invivo* çalışmalarda IL-4 ve interferon  $\gamma$ -nın etkisi ile, Th hücrelerinin IL-17 ürettiği gözlemlenmiştir. IL-17, *invivo* deneysel otoimmün ensefalomyelit sırasında beyindeki CCL2, CCL17 and CXCL1 kemokinlerinin ekspresyonunu inhibe ederken, akciğer epitelinde IL-17'nin aşırı ekspresyonu, kemokin üretimi ve lökosit infiltrasyonuna neden olmuştur. Böylece IL-17 sitokin ifadesinin, doku inflamasyonunu düzenleyen Th hücre alt grubuna ait olduğu gösterilmiştir (46,47).

Th17 hücrelerinin önemli sitokini olan interlökin-17A (IL-17A), konağın hücre dışı patojenlere karşı korunmasını sağlamakla beraber otoimmün hastalıklarda da inflamasyonu destekleyici rol oynamaktadır. IL-17A ve onun reseptörünü (IL-17RA) diğer sitokin ailelerinden ayıran karakteristik yapısal özelliklerinin olmasıdır. IL-17A, T hücreleri tarafından üretilen ve granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin üretimini uyaran bir sitokin olduğu tanımlanmıştır. Bir süre sonra yapılan genomik sekanslamalar, IL-17A homologlarının belirlenmesine yol açtı: IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25 olarak da bilinir) ve IL-17F. IL-17A, Th17 hücrelerinin Th alt grubu olarak tanımlanmasında esas rolü oynayan sitokindir ve araştırmalarda daha çok bu sitokin üzerinden yürümektedir. IL-17A ve IL-17F'in, IL-17 sitokin ailesinin en iyi karakterize edilmiş sitokinleridir. IL-17F, IL-17A ile %55 benzerlik göstermektedir ve hemen hemen aynı hücrelerden eksprese olmaktadır



(48). Üretimleri Th17 hücrelerinin en belirgin özelliği olmasına rağmen, hem IL-17A hem de IL-17F,  $\gamma\delta$  T hücreleri, doğal öldürücü T (NKT) hücreleri, nötrofiller ve eozinofiller tarafından üretilebilir. IL-17A özellikle makrofajlarda etkili bir şekilde sitokin üretimini indüklemesine rağmen, hem IL-17A hem de IL-17F doğal immünite yanıtlarını aktive edebilirler (15,35,47,49). IL-17A ve IL-17F sitokinleri, benzer işlevlere sahiptir ve genetik olarak bağlantılıdır. Bu sitokinlerin, aynı lokusun kontrolü altında oldukları ve genellikle tek hücre seviyesinde birlikte ifade edildikleri düşünülmektedir. IL-17A ve IL-17F, nötrofillerin aktivasyonu, migrasyonu için anahtar sitokinlerdir. Aynı zamanda fibroblastlar, endotelial hücreler, düz kas hücreleri ve epitelial hücreler gibi immün dışı hücreleri de hedefleyebilir, proinflamatuvar mediatörleri IL-6, TNF-alfa, IL-1beta, GM-CSF, G-CSF, PGE2, nitrik oksit, metalloproteinazlar ve kemokinleri (CXCL1, CXCL8, CCL2, CCL7, and CCL20) indükleyebildikleri, germinal-merkez oluşumunu ve otoantikor üretimini düzenlediği gösterilmiştir (20). IL-17A ekspresyonunun engellenmesi bakteriyel enfeksiyona karşı konak savunmasını ve otoimmün hastalıklara karşı direnci bozar (18). Bu gözlemler, IL-17A ve IL-17F sitokinlerinin, konağın immün mekanizmalarında belirgin roller üstlendiğini ortaya koymaktadır.

Th-17 hücrelerinin varlığı birçok kanser tipinde gösterilmiş ve birçok çalışma, IL-17'nin kolon kanseri oluşumunda önemli olabileceğini düşündürmüştür. Örneğin IL-17 sitokininin, NF- $\kappa$ B ve ERK sinyal yolu ile granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ekspresyonunu indüklediği ve immatür miyeloid hücre mobilizasyonu ile tümör mikroçevresine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Th17'nin bloke edildiğinde ise VEGF antikor tedavisine dirençli bazı tümörlerin tekrar duyarlı hale geldiği görülmüştür. Bu nedenlerle, IL-17'nin tümör direncini arttırdığı düşünülmektedir (50). İnflamatuvar barsak hastalığı olan hastaların serumlarında IL-17A, IL-17F ve IL-21 sitokin seviyelerinin arttığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (33). Benzer çalışmalarda, Th17 hücrelerinin güçlü proinflamatuvar sitokini olan IL-17 düzeyinin azalmasının over kanserli hasta sonuçlarını olumlu şekilde etkilediği (26), ülseratif kolit hastaları ile kontrol grupları karşılaştırıldığında, IL-17 ekspresyonunun inflamatuvar barsak hastalarının mukoza ve serumunda önemli derecede arttığı

gözlenmiştir (31,51). Aynı zamanda, IL-17 sitokininin CXCL1, CXCL5, CXCL6 ve CXCL8 de dahil olmak üzere anjiyojenik CXC kemokin ifadesini küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattında arttırdığı da gösterilmiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde IL-17 ekspresyonunun, fare deneylerinde, tümör regresyonunu indüklediği ve anjiyogenezi artırarak tümör ilerlemesini tetiklediği (52) ve tümör büyümesini teşvik ettiği de gösterilmiştir (19,53). Bu çalışmalar sayesinde, IFN- $\gamma$  ve IL-17'nin, primer over kanseri hücreleri ve makrofajlar tarafından sinerjik olarak CXCL9 ve CXCL10 üretimini indüklediği gösterilmiştir (26). IL-17A polimorfizminin kolorektal kanser duyarlılığı ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalarda, IL-17A ve IL17F'nin tümörün lenf noduna metastazı ile de ilişkili olabileceği belirtilmiştir (9). İnsan kolon kanserinde yapılan çalışmalarda, aynı hastada tümörlü ve sağlıklı kolon kısımları karşılaştırıldığında IL-17A düzeylerinin arttığını gözlemlenmiş ve sonuç olarak, sporadik kolorektal karsinogenezinde IL-17A'nin önemli olduğu gösterilmiştir (54).

#### **2.4. Kolon Kanseri ile IL-21 İlişkisi**

İnterlökin 21 (IL-21) sitokininin de kolorektal kanserlerin gelişimi ve prognozu açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Th hücreler, foliküler T hücreler, Th17 ve NKT hücrelerinden eksprese olan IL-21 sitokini, IL-15 ile benzerlik göstermektedir. IL-2 ailesi üyesi olan ve özellikle Th17 hücre farklılaşmasıyla ilişkili IL-21 sitokini, T hücre farklılaşmasında ve klonal genişlemesinde önemlidir. IL-21, T hücrelerde STAT3'ü aktive ederek TGF- $\beta$ 'ya bağlı FoxP3 ekspresyonunu inhibe eder, Treg hücrelerin oluşumunu bloke eder. Bunun sonucunda IL-21 sitokini, Treg hücrelerle negatif ilişkili Th17 hücrelerinin gelişimini artırır (55). IL-21, iTreg ve Th17 hücrelerinin dengesini kontrol ederek, karşılıklı düzenlenmesinde önemli role de sahiptir. IL-21, naif Th-nin IFN- $\gamma$  üreten Th1 hücrelere farklılaşmasını önleyerek, Th2 aracılı immün yanıt oluşumunda rol oynamaktadır (56). Aynı zamanda, CD4<sup>+</sup> T hücreleri tarafından üretilen IL-21, T hücre proliferasyonunu uyarır, B hücrelerden Ig üretimini indükler, CD8<sup>+</sup> T hücrelerin sitotoksik etkisini artırır, Treg hücre diferansiyasyonunu inhibe eder ve NK hücre aktivasyonunu düzenler (57).

Tip 1 sitokin reseptörleri ailesinden olan İnterlökin 21 reseptörü (IL-21R), yapısal olarak IL-2R ve IL-15R ile ilişkilidir ve T, NK, B ve dendritik hücrelerden eksprese edilir. JAK1 ve JAK3, STAT3 ve PI-3K yolağını aktive edebilen IL-21R, bu sinyaller ile hücrel aktivasyona ve hücre sağ kalımına katkıda bulunmakta ve aktive lenfositler için kostimulan etki göstermektedir. IL-21R'nin inflamatuvar barsak mukozasındaki NK hücrelerinden yüksek oranda eksprese edildiği ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indüklediği bilinmektedir (54). IL-21, inflamatuvar kolon mukozasında bulunan T hücrelerini uyararak, kolon fibroblastları tarafından salınan matriks bozucu enzimlerin tetiklenmesine neden olur ve inflamatuvar yanıt artar. Doku inflamasyonunu açısından önemli bir sitokin olan IL-21, hem hücre aracılı hem de hümorale yanıtla ilgili olup, alerjik ensefalomyelit, sistemik lupus eritematosus, diyabet ve romatoid artrit gibi farklı otoimmün hastalıkların patogeneğinde de önemli bir role sahiptir. Yapılan çalışmalarda, inflamatuvar barsak hastalıklarının iltihaplı mukozasındaki IL-21 sitokini, NK hücrenin sitotoksik tepkisini arttırmış ve T hücrelerini proinflamatuvar sitokinler üretmeye teşvik etmiştir. IL-21' in otokrin etkisi, B hücreli lenfoma 6 (BCL-6) ekspresyonunu da düzenlediği tesbit edilmiştir. Bu nedenle IL-21 sitokinin anti-tümör immün yanıtın gelişmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir (55).

IL-21 dendritik hücreler üzerine genel olarak inhibitör etki gösterir ve onların immatür kalmalarına neden olur, fagositik aktivitelerini artırır, antijen sunma yeteneklerini ise azaltır. Bu nedenle, T hücre cevaplarını kısıtlayarak, spesifik immün yanıt gelişimini baskılar. Makrofajların fagositik aktivitelerini artırır, proinflamatuvar etki göstererek, makrofajların CXCL8/ IL-8 üretimini indükler (58).

İnflamatuvar barsak hastalarında yapılan çalışmalar, kolon mukozalarında IL-21'in yüksek düzeyde eksprese olduğunu ve Th1 tip hücre grubunu baskıladığını göstermiştir. İnflamatuvar barsak hastalarından ve farelerden alınan barsak biyopsilerinde bulunan yüksek düzeydeki IL-21 sitokini, aşırı inflamatuvar yanıtla neden olmuştur. IL-21 ekspresyonu inhibe edildiği zaman farelerde intestinal kolitin gelişmediği gösterilmiştir (59,60).

## 2.5. Kolon Kanseri ile IL-22 İlişkisi

IL-22'yi ifade eden tüm ILC'lerin gelişimi için Th17 ana transkripsiyon faktörü ROR $\gamma$ t'ye bağlı olduğu ve bu hücrelerin çoğunun IL-17 ifade ettiğine ilişkin keşifler, Th17 transkripsiyonel programın bir parçası olarak IL-22 kavramını ortaya koymuştur. Daha sonra, Th1 ve Th22 hücreleri gibi bir dizi hücre tipinin IL-17'den bağımsız olarak IL-22 eksprese ettiği de ortaya çıkmıştır. Th17 hücrelerine benzer olarak, CCR4 ve CCR6'yı ifade eden Th22 hücreleri aynı zamanda IL-22, IL-13 ve TNF- $\alpha$ -nın da salgılanmaktadır. Epitel ve stromal hücreler üzerine önemli etkileri olan IL-22 sitokini, mikrobiyal patojenlere karşı konak savunmasına da katkıda bulunur. Bununla birlikte, IL-22 tek başına veya diğer sitokinlerle birlikte sinerjik etki bazı enfeksiyöz ve inflamatuvar koşullarda anormal epitel çoğalmasına ve farklılaşmasına neden olabilir. Kontrolsüz aşırı veya uzun süreli IL-22 üretimi, sedef hastalığı ve benzeri patolojilere neden olabilir. Esas olarak Th22 ve Th17 hücrelerinden salgılanan ve 2000 yılında tanımlanmış IL-22 sitokinin kolorektal kanserlerin gelişiminde de önemli olduğu düşünülmektedir (61).

IL-10 ailesinin bir üyesi olan ve epitel hücrelerin proliferasyonunu ve sağ kalımını, aynı zamanda antimikrobiyal peptidlerin aktivasyonunu sağlayarak bariyer fonksiyonunu destekleyen IL-22 sitokini, Th17, Th22 ve innate lenfoid hücreler tarafından (ILH) üretilir. Epitelial bariyer bütünlüğünü destekleyen ve yara iyileşmesi sırasında epitel hücre çoğalmasını indükleyen IL-22, inflamatuvar yanıtlar sırasında nötrofil infiltrasyonunun yanı sıra reaktif oksijen türleri, IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$  üretimine de neden olur. Fare modellerinde yapılan çalışmalar, IL-22'nin bariyer yüzeylerdeki epitel hücrelerinin homeostazının korunmasında, inflamasyon ve doku tamirinin teşvik edilmesinde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. IL-22, antimikrobiyal immün reaksiyonları IL-22 reseptörü (IL-22R) aracılığıyla gerçekleştirir. IL-22R, IL-10R  $\beta$  ile bir reseptör kompleksi oluşturur ve sinyal iletimini sağlarlar. IL-22 reseptörü, kemotaksis, proliferasyon, akut faz cevabında görev alan birçok genin ekspresyonunu modüle eder. Ayrıca doku iltihabı, immünsüpresif yanıtlar ve homeostazda yer alan molekülleri kodlayan genlerin ekspresyonunu da indükleyebilir. IL-22 sitokini, NF- $\kappa$ B, MAPK, PI3K/AKT sinyal yollarını kullansa da,

esas etkisini STAT3 yolağı üzerinden gösterir. Bunun sonucunda inflamatuvar reaksiyonda rol alan IL-6, G-CSF, IL-1 $\alpha$ , *LPS-binding protein*, serum amiloid A, haptoglobulin gibi molekülleri kodlayan bir dizi genin ekspresyonuna da katkıda bulunabilir (62). *İnvivo* çalışmalar, IL-22'nin NK hücre ve dendritik hücreler tarafından da eksprese edildiğini göstermiştir (63). Birçok inflamatuvar ve enfeksiyöz hastalıklarda IL-22 sitokininin aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. Klinik çalışmalarda, sedef hastalığı veya artrit olan periferik kan ve dokularda IL-22'nin aşırı ifadesi görülmüştür (64). İnflamatuvar barsak hastalığı olan hastaların periferik kan ve dokularında IL-22 konsantrasyonları daha yüksek tespit edilmiştir. *Zenewicz L.A* ve arkadaşları da farelerle yaptıkları çalışmalarda IL-22'nin, kolon epitel hücreleri üzerinde proinflamatuvar etkilere sahip olduğunu, IL-6 ve IL-8 salınımını indüklediğini ve NF- $\kappa$ B ile AP-1'i aktive ettiğini göstermişlerdir (65). Kemorezistans olan hastalarda IL-22 düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiş, invitro deneylerde inhibe edildiğinde bu etkisi ortadan kalkmıştır (66). *Kirchberger S.* ve arkadaşlarının araştırmasında ise IL-22'nin inflamasyonla birlikte tümör oluşumunu ve gelişimini arttırdığı da gösterilmiştir (67).

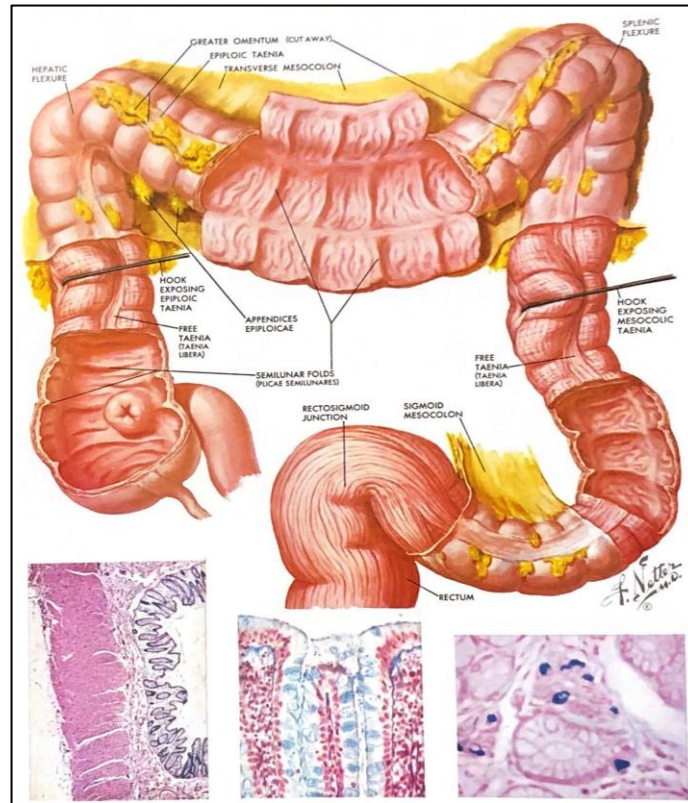
**Tablo 2.1.** IL-17A, IL-21, IL-22 sitokinlerinin özellikleri.

	<b>IL-17</b>	<b>IL-21</b>	<b>IL-22</b>
<b>Sitokin grubu</b>	Proinflamatuvar	Proinflamatuvar	Proinflamatuvar
<b>Eksprese Olduğu Hücreler</b>	Th, Th17, NK, $\delta$ T cells, iNKT,	Tfh, Th, Th17, NK	DC, Th, Th17
<b>Etkilediği hücreler</b>	Th, Th17, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NK, DC, Makrofaj	Th, Th17, Tfh, NK, NKT, DC, B, CTL, Treg, Makrofaj	Th, Th17, NK, DC, IL-17A, Makrofaj
<b>Protein</b>	15-23 kDa	17 kDa	16.5 kDa
<b>Reseptör</b>	IL-17RA	Yc Reseptör Kompleksi	IL-22R1-4

## 2.6. Kolon Anatomisi Ve Kolon Kanseri

Gastrointestinal sistemde ileoçekal valv ile rektosigmoid köşe arasında kalan yaklaşık 150 cm'lik uzunluğundaki kolon, sindirim kanalının beşte birini oluşturmaktadır. Kolon sırasıyla çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon gibi bölümlere ayrılır ve devamında rektosigmoid köşede rektum ile birleşir (Şekil 2.5)

Kolonun dışında 3 adet olan tinea koliler appendikste birleşir ve proksimal rektumda sakral promontorium hizasında kaybolurlar. Kolon duvarının 4 tabakadan oluşan katları: Mukoza, submukoza, iç sirküler kas, dış longitudinal kas ve serozadır (perikolik yağ dokusu). Mukoza; epitel hücreleri, lamina propria, muskularis mukoza olmak üzere 3 tabakadan oluşmuştur. Mukoza, çok sayıda goblet hücreleri içeren tek sıralı prizmatik bir epitele sahiptir. Kök hücreler aracılığıyla buradaki absorbtif ve goblet hücreleri 6 günde, enteroendokrin hücreler ise 4 hafta da bir yenilenir (68).



Şekil 2.5. Kolon anatomisi ve histolojisi (73).

Mukozal yüzeyde lenfatik kanallar olmamasından dolayı, muskularis mukozaya erişmemiş kanserler, lenfatik metastaz yapamazlar. Submukoza ise kan ve lenf damarlarından zengin, submukozal sinir pleksusu (Meissner pleksus) içeren gevşek bağ dokusudur. Muskularis mukoza ise mukoza ile submukozayı ayıran tabakadır. Bu tabakanın lümenine yakın iç kısmı sirküler, dış kısmı ise longitudinal kas tabakalarıdır. Bu kas tabakaları arasında (Auerbach's) nöral pleksus bulunmaktadır. Seroza ise kan ve lenf damarları, yağ dokusu ile zengin olup, tek katlı yassı küboidal mezotelyal hücreler ile örtülmüş, ince ve gevşek bir bağ dokusuyla kaplanmıştır (73).

### **2.6.1. Kolon Kanseri**

Amerikan Kanser Derneğinin son verilerine göre, genel insidanstaki en sık dört ana kanser türü; akciğer, meme, kolorektal ve prostat kanseri olarak sıralanmaktadır. Yani, kolorektal kanserler akciğer ve meme kanserlerinden sonra en sık görülen üçüncü kanser türü olup, aynı zamanda akciğer kanserlerinden sonra ölüm oranı en yüksek ikinci kanser türüdür. Kalıtsal özellik gösteren sendromları olan kişilerde 40 yaş üstü kolorektal kanser görülme riski artmakta, bu sendromları olmayanlarda ise sporadik kolon kanseri daha çok 60-70 yaşlarında görülmektedir. Yani, artmış kolorektal kanser riski olan kişilerin öykülerinde kolorektal adenom, familial polipozis, ailesel kanser veya ülseratif kolit olduğunu söyleyebiliriz. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre daha fazla oranda olsa da, kadınlarda mortalite sıklığı daha yüksektir (74).

Kendini rektal kanamalar ile (78%) gösteren kolorektal kanserlerde birkaç neoplasm birlikte görülebilir. Aynı anda, bir veya birden fazla saptanmış tümörlere senkron, farklı zamanlarda bağımsız olarak saptanan tümörlere ise metakron tümörler adı verilir.

### **2.6.2. Kolon Kanseri ve İmmün Sistem İlişkisi**

İmmün sistem hücrelerinin kolorektal tümörlerin oluşumunda, büyüme ve metastazında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Her insanın farklı barsak florası olduğu için, buradaki mikroorganizma türleri, oranları ve vücutdaki dağılımı farklıdır.





adlandırılan membranöz hücreler tarafından tanınır. M hücreleri, birçok pinositik vezikül içeren yassı epitel hücreleridir. Bu pinositik veziküller ile antijen, M hücresi tarafından yutulur ve burada MHC-class II antijeni sunan makrofajlar, dendritik hücreler ve B hücreleri antijeni işleyerek T lenfositlere sunarlar. Th17 hücreleri de immün sistem reaksiyonları içinde yerini alır ve salgıladığı sitokinlerle tümör gelişiminde önemli rol oynarlar (Şekil 2.6). Bazen belirli aşamalar sonrasında, proinflamatuar hücreler sayesinde oluşan savunma mekanizmaları, tümör destekleyici mekanizmalara dönüşebilir (13).

### 2.6.3. Kolon Kanseri Patolojisi

Kolon kanserlerinin %95'ini adenokarsinomalar oluşturur, %5 inden daha az kısmı adenokarsinom dışı tümörler tarafından oluşturulmaktadır. Kolorektal kanserlerin makroskopik yapısı polipoid, ülseratif, infiltratif veya anüler (skiröz) olabilir. Genel olarak, sağ kolon karsinomları polipoid, sol kolon karsinomları ise annülerdir. Kolorektal kanserler intramukozal epiteliyal lezyonlar olarak başlar (intramukozal karsinom) ve tümör gelişimi ile submukozaya ulaşarak invaziv kansere dönüşürler.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kolorektal kanserleri mikroskopik olarak Grade I (iyi diferansiye) Grade II (orta derecede diferansiye) Grade III (az diferansiye) şeklinde derecelendirmektedir. Derecelendirme hasta prognozu açısından son derece önemlidir, patoloji raporlarında yer almaktadır.

Kolorektal kanserli hastaların prognozunun belirlenmesinde evreleme de çok önemli bir yöntemdir. İki çeşit evreleme vardır; **Dukes** ve **TNM** evreleme sistemleri (T: Tümör invazyonu, N: Lenf nodu tutulumu ve sayısı, M: Metastaz varlığı). Dukes evrelemesi ilk kullanılan şekliyle tümörün derinliğine göre evresini belirlemekteydi. Daha sonra bu evrelere lenf nodu tulumu ve sayısında eklenerek tekrar evreleme yapıldı. Bu evreleme sistemine de **Modifiye Astler-Coller (MAC)** evrelemesi adı verilmiştir (Tablo 2.3) (75). Kolorektal kanserlerin lenfatik damarlar yoluyla yayılma özelliğinin bulunması nedeniyle tutulan (metastatik) lenf nodu sayısı da büyük önem taşımaktadır. Patolojik lenf nodu sayısının 3 ün üzerinde olması ileri evre tümör

olduğunu belirtmektedir. Prognozu belirlemede ameliyatla çıkarılan lenf nodu sayısı da önemlidir. Metastatik lenf nodu oranı “Patolojik Lenf nodu Sayısı/Total çıkarılan Lenf Nodu Sayısı (PLN/TLN)” sifira ne kadar yakınsa sağkalım süresi o kadar uzamaktadır (76).

**Tablo 2.2.** Kolon kanseri evreleme sistemleri.

Evreler	TNM	Modifiye Astler-Coller	Açıklamalar
<b>Evre 0</b>	Tis, N0, M0	-	Kolon ya da rektumda tümör araştırılmış ama tespit edilememiş
<b>Evre I</b>	T1, N0, M0	<b>A</b>	Tümör muskularis mukozayı delerek submukozaya ulaşmış ama muskularis propriaya ulaşmamış
	T2, N0, M0	<b>B1</b>	Tümör muskularis propriayı invaze etmiş
<b>Evre II</b>	T3, N0, M0	<b>B2</b>	Tümör muskularis propriayı tamamen delmiş serozaya ulaşmış
	T4, N0, M0	<b>B2</b>	Tümörün her çeşit invazyonunu + regional lenf nodlarını tutmuş
<b>Evre III</b>	T1, T2, N1, N2, M0	<b>C1</b>	Tümör muskularis propriayı invaze etmiş + 1-3 lenf nodu tutulumu
	T3, T4, N1, N2, M0	<b>C2</b>	Tümör muskularis propriayı tamamen delmiş serozaya ulaşmış + $\geq 4$ lenf nodu tutulumu
<b>Evre IV</b>	Her T, Her N, M1	<b>D</b>	Uzak metastaz yapmış lezyonlar

Diferansiyasyon, tümörün histolojik açıdan değerlendirilmesinde kullanılmakta, normal yapıdan ne kadar değişim gösterdiğini belirlemektedir.

**Grade 1 (iyi):** Bu evrede mikroskopik olarak karsinomalar adenoma epiteline benzerler. Hücreler uniform görünümünde olur ve polarite kaybı yoktur veya minimaldir.

**Grade 2 (Orta):** Tümörlerde tübüler yapılar basit veya kompleks ve düzensiz olabilirler. Çekirdek polaritesinde hafif-orta düzeyde kayıplar söz konusudur.

**Grade 3 (Kötü):** Tümörlerde glandüler-tübüler yapı tamamen ortadan kalkmış ve çekirdek polaritesi fazlasıyla bozulmuştur. Hücrelerde pleomorfizm belirgin haldedir. Diferansiyasyon derecesi mortalitenin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır (77,78).

Kolon kanserleri kalıtsal kökenli, inflamatuvar kökenli veya sporadik olarak görülebilirler.

**a) Kalıtsal kökenli kolon kanserleri:** Herediter yassı kolorektal kanserleri (*Lynch Sendromu, Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer-HNPCC*), ailesel kolon polipozisi (*Familial Adenomatous Polyposis-FAP*), hamartamatöz juvenil polipozis sendromu ve *Peutze-Jeghers Sendromu*'nu kalıtsal kökenli kolon kanserlerine örnek olarak gösterebiliriz. FAP otozomal dominant geçiş gösteren hastalıktır ve kromozom 5q' da bulunan *Adenomatous Poliposis Coli (APC)* isimli tümör baskılayıcı gendeki mutasyondan kaynaklanır. FAP hastalarında kolon ve rektumda çok sayıda polip bulunur ve iyi tanımlanmış olmasına rağmen bu genetik sendromlar tüm kolorektal kanserlerin ancak %5 inden az bir kısmını oluşturmaktadır.

HNPCC herediter kolorektal kanserlerin en sık görülen tipidir, tüm kolorektal kanserlerin %1-6' sını oluşturur. HNPCC olan ailelerde sadece kolon değil, aynı zamanda mide, endometriyum, over, ince barsak, genitoüriner sistem ve böbrek kanserleri de görülmektedir. HNPCC hastalarının %90'ında mikrosatellit instabilitesi gözlenmektedir.

**b) Sporadik kolon kanserleri:** Bu kanser vakalarının %20'sinde aile hikayesi gözlenmektedir. Tüm kolon kanserlerinin %80' nini oluşturan sporadik kolorektal kanserler, çoğunlukla poliplerden köken alır ve rastgele gelişen somatik mutasyonların birikmesinin yanı sıra birçok genetik ve çevresel faktörün de bu süreçte önemli olduğu düşünülmektedir. Yaş oranı da bu süreci etkileyen önemli faktör olmaktadır. Sporadik kolon kanserlerinin %5 kadarı 40 yaş altında, %8'i 50 yaş altındaki kişilerde görülmektedir. Kolorektal kanser gelişimi açısından, 50 yaş üzerinde olmanın önemli bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir.

**c) İnflamatuvar kolon kanserleri:** İnflamatuvar barsak hastalıkları da kolorektal kanserlerin gelişiminde çok önemli bir yere sahiptir . Chron hastalığı (*CD*)

ve Ülseratif Kolit (UC) kolonda adenokarsinoma gelişimi için artmış risk faktörüdür. Bugüne kadar yapılan retrospektif çalışmalarda, kolon kanseri oluşan ülseratif kolitli hastaların rezeke edilen kolonlarında %90 mukozada displazi saptanmıştır. Kolonoskopik biyopsi veya cerrahi rezeksiyon sonrası mukozal yüzey displazisi saptanan hastaların 1/3'ünde, beraberinde kolorektal karsinomun da bulunduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde, Chron hastalığında da, kolon tutulumu olan hastalarda kolorektal kanserin gelişme riskinin normal insanlara göre daha fazla olduğu saptanmıştır (75).

### 3. BİREYLER ve YÖNTEMLER

Bu araştırma için gerekli hasta kan örnekleri, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında, kolorektal kanser tanısı ile ameliyatına karar verilen hastalardan alınmıştır. Deneysel çalışmalar ise Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir .

Etik kurul izni Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu' ndan (Karar No: GO 16/149-43) alınmıştır.

#### 3.1. Hastalar ve Kontrol Grubu

Kolorektal kanser tanısı ile genel cerrahi kliniğine başvuran 40 hasta çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu ise, genel cerrahi kliniğine kanser dışında bir tanı ile başvuran, kronik inflamatuvar bir hastalığı olmayan sağlıklı gönüllü bireylerden oluşturuldu.

Hastalardan ameliyattan bir gün önce kan alınarak, soğuk zincire uygun olarak Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı'na transfer edildi ve serumları ayrılarak arşivlendi. Kontrol grubu için ise kliniğe başvurdukları gün kan alınarak, serumları ayrıldı ve arşivlendi. Çalışmaya dahil edilen hastalar ve kontrol grubundan imzalı bilgilendirilmiş onam formları alındı. Ameliyatların tümü aynı ekipler tarafından yapıldı.

Her bir kolorektal kanser hastasının tümör evresi, tümörün büyüklüğü, tutulan lenf bezi sayısı, lenfatik ve vasküler invazyon durumu, perinöral invazyon ve uzak organ metastaz durumu rutin patoloji ve radyoloji raporlarına göre kayıt altına alındı.

#### 3.2. Kan Örneğinden Serum Ayrılması

Kan örnekleri hastadan alındıktan sonra soğuk zincir koşulları altında hemen laboratuvara transfer edildi ve 2000 g' de 10 dk santrifüj edildi. Tüpün üst tarafında kalan serum toplanarak, 1,5 ml hacmindeki ependorf tüplere 500 µl olacak şekilde dağıtıldı. Bunun amacı her dondurma - çözündürme işleminden sonra proteinlerin

bozulma olasılığını en aza indirmektir. Daha sonra bu örnekler  $-80^{\circ}\text{C}$ ' de sitokin ölçümü yapıncaya kadar saklandı.

### 3.3. ELISA Testi

Son yıllardaki tarama testleri sayesinde erken tanı ve dolayısıyla daha iyi tedavi, kolon kanserlerinde mortaliteyi azaltmaktadır. Bu testlerden biri de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testidir. Antijen-antikor ilişkisine dayalı, antikora bağlanan enzimin miktarına göre, oluşan renk değişiminin yoğunluğuna göre, antijen miktarını ölçen bir yöntemdir.

Serum örneklerinde sitokin düzeylerinin ölçümü için kullanılandığımız ELISA testinin yapılması için, IL-17A, IL-21, IL-22 sitokinlerinin ELISA kitleri satın alındı. Her bir sitokin ölçümü için 50 µl serum örneği kullanılarak, üretici firmanın talimatları takip edilerek testler yapıldı. Her örnek iki kez çalışıldı. Daha sonra optik mikropate okuyucuda (*SpektraMax Plus*, Molecular Divices, USA) 450 nm ve 570 nm dalga boyunda okutuldu. Optik dansite SoftMax® Pro Microplate Data Acquisition and Analysis Software (Molecular Devices, USA) ile analiz edilerek kaydedildi.

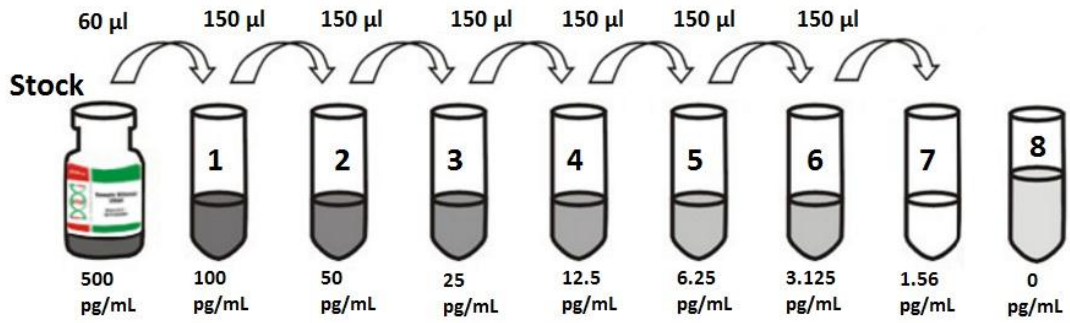
#### 3.3.1. IL-17A ELISA Protokolü:

Test için Human IL-17A ELISA Kit ab216167 (Abcam, USA) kullanıldı. Sensitivite  $<3$  pg/ml.

- 1 x **Wash Buffer PT**- 5 ml 10X Wash Buffer PT + 45 ml diH<sub>2</sub>O

- **Antibody Cocktail**- 300 µl Detector Ab + 300 µl Capture Ab + 2,4 µl Ab Diluent 5BI.

- **Standarts**- IL-17A protein + 500 µl Sample Diluent (500 pg/mL Stock Standarts)



**Şekil 3.1.** IL-17A dilusyonel olarak standart hazırlaması.

50 µl Standart solusyonu ve örnekler uygun kuyulara eklendi.

50 µl bütün kuyulara antikor kokteyli eklenerek üzeri örtüldü, 400 rpmde çalkalanarak 1 saat inkübe edildi.

3x 350 µl Wash Buffer PT ile örnekler yıkanıp ters çevrilerek kurutuldu.

100 µl TMB eklenerek 10 dk karanlıkta 400 rpmde çalkalanarak inkübe edildi.

100 µl STOP solusyonu eklendi ve 1dk karıştırıldı.

450 nm – optik dansite okumaları yapıldı.

### 3.3.2. IL-21 ELISA Protokolü

Test için Human IL-21 ELISA Kit ab119542 (Abcam, USA) kullanıldı.

Sensitivite 20 pg/ml

- 1x **Wash Buffer**- 25 ml 20x Wash Buffer Concentrate + 475 ml diH<sub>2</sub>O

- 1x **Assay Buffer**- 2.5mL 20x Assay Buffer + 47,5 mL diH<sub>2</sub>O

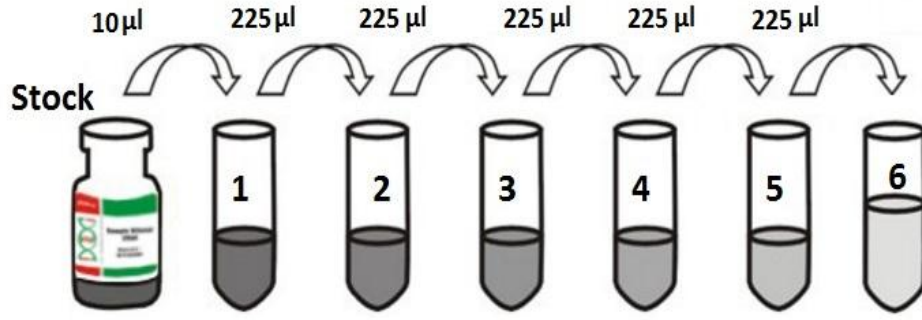
- 1x **Biotin Conjugated Antibody**

60 µl Biotin Con Ab + 5.94 ml 1x Assay Buffer

- 1x **Streptavidin HRP Conjugate**

60 µl Streptavidine HRP + 11.94 mL 1x Assay Buffer

- **10 ng/ml Stock Standart** hazırlamak için liyofilize IL-21 protein üzerine, distile suyun üzerinde yazan miktar kadar su ilave edilir ve 30 dk oda sıcaklığında bekletilir.



**Şekil 3.2.** IL-21 dilusyonel olarak standart hazırlaması.

- Plaklara 10-15 saniyelik 400 µl 2 kez yıkama işlemi uygulandı
- 100 µl Standart + 50 µl Sample + 50 µl 1x Biotin-Con Ab uygun kuyulara eklendi
- Üzeri kapatılarak 3 saat 400 rpm-de inkübe edildi
- 100 µl Standartlar eklendi
- 50 µl Sample Diluent örnek kuyularına eklendi
- 50 µl örnekler kendi kuyularına eklendi
- 50 µl Biotin-Con Ab bütün kuyulara eklendi
- Üzeri kapatılarak 3 saat 400 rpm-de inkübe edildi
- Kuyular 400 µl 4 kez 10-15 saniye yıkandı
- Bütün kuyulara 100 µl Streptavidin-HRP eklendi
- Üzeri kapatılarak 1 saat 400 rpm-de inkübe edildi
- Kuyular 400 mL 4 kez 10-15 saniye yıkandı
- 100 µl TMB Substrat solusyonu eklendi
- 10 dakika karanlıkta inkübe edildi
- 100 µl Stop solusyonu eklendi
- 1 dakika karıştırılarak optik dansite okumaları yapıldı.

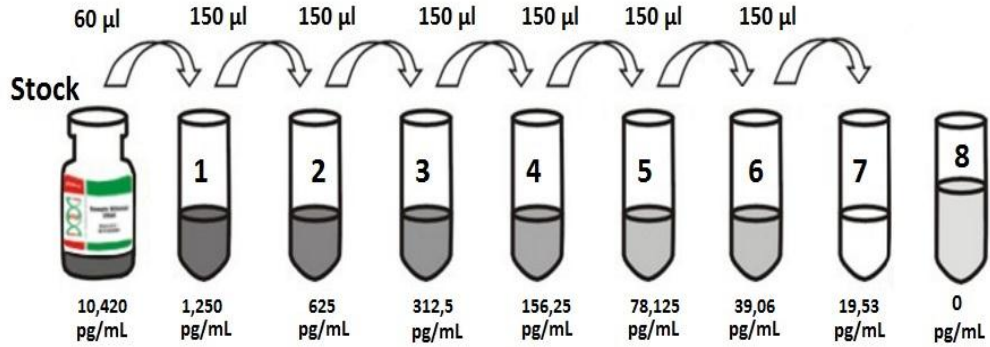
### 3.3.3. IL-22 ELISA Protokol:

Test için Human IL-22 ELISA Kit ab216170 (Abcam, USA) kullanıldı.

Sensitivite 2,61 pg/ml.



- 1 x **Wash Buffer PT**- 5 mL 10x Wash Buffer PT + 45 mL diH<sub>2</sub>O.
- **Antibody Cocktail**- 300 µl 10x Detector Ab + 300 µl 10x Capture Ab + 2.4mL Ab Diluent CPI.
- **Standarts**- IL-22 protein + 100 µl su (10.420 pg/mL Stock Standarts) oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.



**Şekil 3.3.** IL-22 dilusyonel olarak standart hazırlaması.

- 50 µl Standart solusyonu ve örnekler uygun kuyulara eklendi.
- 50 µl Ab kokteyl + 50 µl Sample kuyulara eklenerek üzeri örtülüp, 400 rpm-de çalkalanarak 1 saat inkübe edildi.
- Her kuyu 350 µl Wash Buffer PT ile 3 kez 10-15 saniye yıkandı
- Kalan sıvı ters çevrilip vurularak kurutuldu.
- 100 µl TMB Substrat solusyonu eklendi
- 10 dakika karanlıkta 400 rpm-de inkübe edildi
- 100 µl Stop solusyonu her kuyuya eklendi
- 1 dakika karıştırılarak 450nm-de okumaları yapıldı.

### 3.4. İstatistiksel Analiz

Hastalardan ve laboratuvar çalışmalarından elde edilen tüm veriler IBM® SPSS® Statistic Version 21 (IBM Corporation, ABD) yazılımı kullanarak değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubu verileri *student t* testi kullanılarak analiz edildi. Sitokin düzeyleri ile kliniikopatolojik bulgular arasındaki analizler ise *One way Anova*, *Spearman Korelasyon* regresyon kullanılarak yapıldı. Analizler sonucunda  $p < 0,05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tanımlayıcı veriler ortalama (mean) kullanılarak ifade edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Dağılımı

Hasta grubu genel cerrahiye kliniğinde kolorektal kanser tanısı almış hastalardan oluşturuldu. Bu hastaların çoğunluğu ameliyata karar verilmiş hastalardı. Çok az bir kısmı ise ileri evre olmaları nedeni ile ameliyat endikasyonu olmayan, görüntüleme yöntemleri ile evrelendirmesi yapılan hastalardı. Kontrol grubu ise gönüllülük esasına göre kliniklere kanser dışında bir tanı ile başvuran, kronik inflamatuvar bir hastalığı olmayan sağlıklı bireylerden oluşturuldu.

Hasta grubu 19 kadın ve 21 erkek hastadan oluşmaktadır. Kadın hastaların yaş ortalaması 58,4 (30-83) iken erkek hastaların yaş ortalaması ise 59,7 (34-77) olarak bulundu. Kontrol grubunda ise 18 kadın, 22 erkek bulunmaktaydı. Bu gruptaki kadınların yaş ortalaması 41,4 (29-56), erkeklerin yaş ortalaması ise 44,1 (25-58) olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Çalışma gruplarının demografik özellikleri.

	Hasta Grubu		Kontrol Grubu	
	n	Yaş	n	Yaş
<b>Kadın</b>	19	59,7±11,9 (30-83)	18	41,4±9,0 (29-56)
<b>Erkek</b>	21	58,4±10,0 (34-77)	22	44,1±8,8 (25-58)
<b>Toplam</b>	40	59,10±10,8 (30-83)	40	42,9±8,9 (25-58)

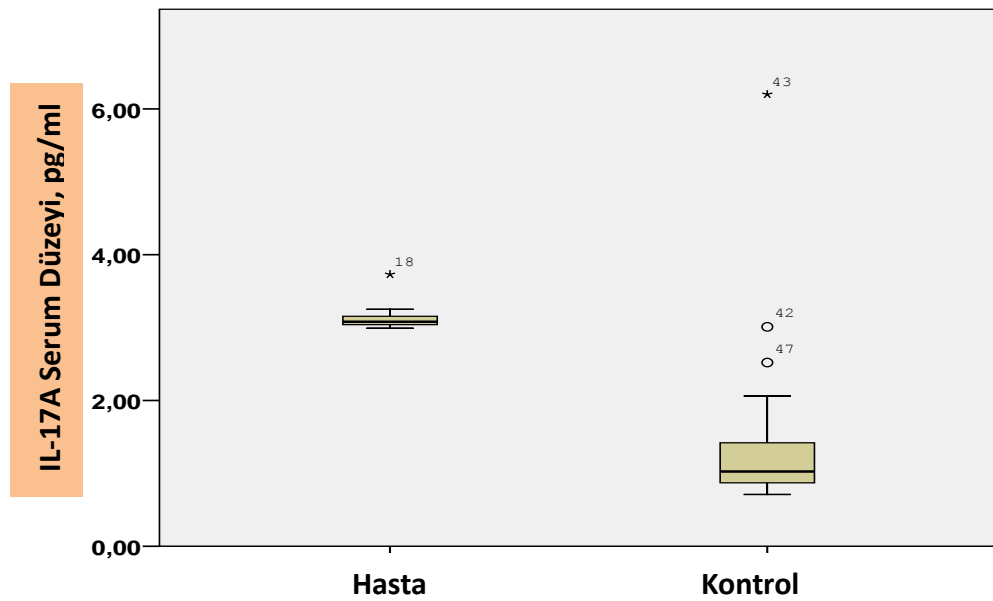
### 4.2. IL-17A, IL-21 ve IL-22 Serum Düzeylerinin Gruplara Göre Dağılımı

Hasta ve kontrol grubunda IL-17 ile ilişkili olan IL-17A ,IL-21 ve IL-22 sitokinlerinin serum seviyeleri ölçüldü. Her grubun sitokin ortalaması alınarak birbiriyle karşılaştırılmaları yapıldı (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** IL-17A, IL-21, IL-22 sitokinlerinin gruplara göre serum düzeylerinin dağılımı (pg/ml).

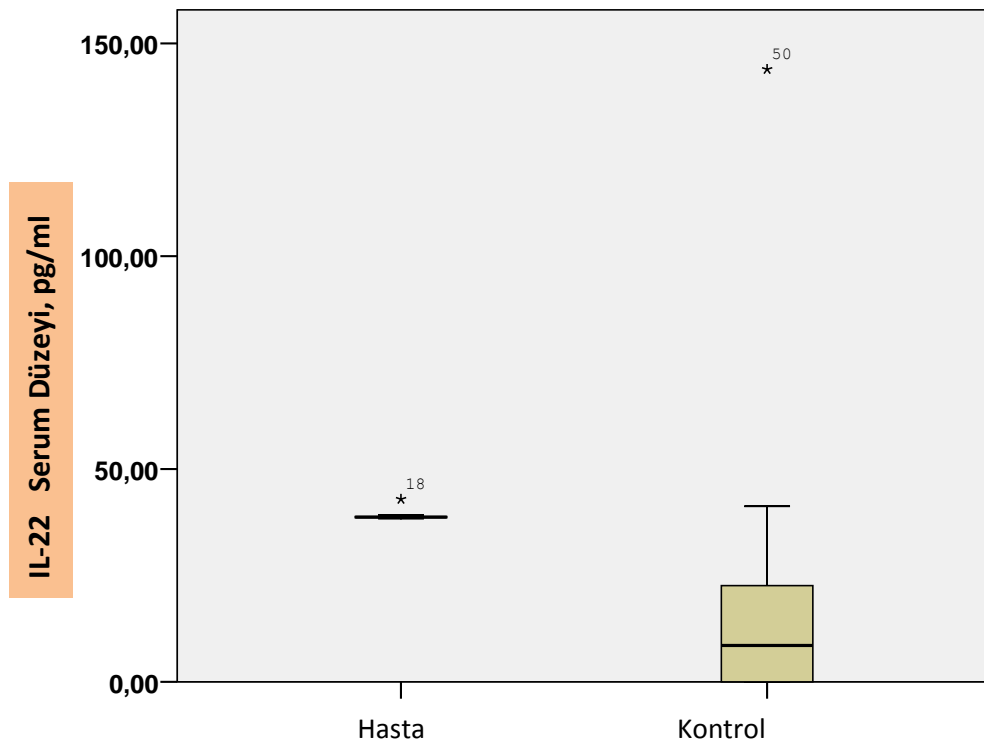
Sitokinler	Hasta Grubu (pg/ml)				Kontrol Grubu (pg/ml)				p
	Ortalama±SS	Ortanca	En Küçük	En Büyük	Ortalama±SS	Ortanca	En Küçük	En Büyük	
IL-17A	3,11±0,12	3,08	2,99	3,73	1,30±0,92	1,02	0,71	6,20	0,000
IL-21	108,29±222,36	51,02	11,87	1394,00	123,12±177,52	79,66	61,80	1157,59	0,001
IL-22	38,81±0,69	38,68	38,37	42,91	15,44±24,25	8,54	0,00	143,91	0,000

IL-17A düzeyi, hasta grubunda  $3,11\pm 0,12$  pg/ml, kontrol grubunda ise  $1,30\pm 0,92$  pg/ml olarak bulundu. Hastalarda IL-17A düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olarak bulundu ( $p<0,001$ ).



**Şekil 4.1.** Hasta ve kontrol grubu IL-17A serum düzeyleri.

IL-22 serum değerlerinin ortalaması hasta grubunda  $38,81\pm 0,69$  pg/ml , kontrol grubunda ise  $15,44\pm 24,25$  pg/ml olarak tespit edildi. Hasta grubunda ekspresyon düzeyi daha yüksek olarak bulundu ve bu gruplar arası fark istatistiksel olarak da anlamlıydı ( $p<0,001$ ) (Şekil 4.2).



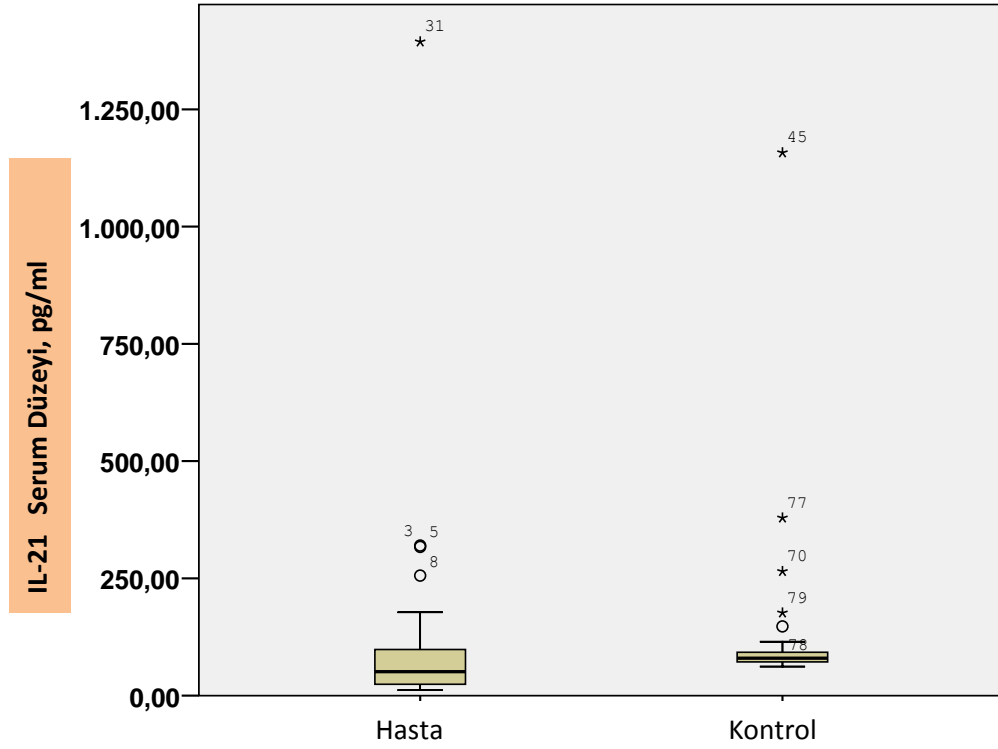
**Şekil 4.2.** Hasta ve kontrol grubu IL-22 serum düzeyleri.

IL-17A ve IL-22 serum düzeyleri için bir eşik-değeri de (*cut-off*) tespit edildi. IL-17A için 2.755 pg/ml, IL-22 için ise 35.63 pg/ml eşik-değeri olarak belirlendi. Bu serum düzeylerini aşan herhangi bir değer kolon kanseri ile ilişkili olabileceği saptandı ve bu istatistiksel olarak da anlamlıydı ( $p < 0.001$ ) (Tablo 4.3). Bu analiz SPSS istatistik programında *ROC Curve* kullanılarak yapıldı.

**Tablo 4.3.** IL-17A ve IL-22 sitokinlerinin eşik değerleri.

	Kesme Değeri	Duyarlılık	Seçicilik	+LR	-LR
IL-17A	>2,755	%100	%65	2,85	0
IL- 22	>35,63	%100	%92,5	13,33	0

IL-21 serum düzeyleri hasta ve kontrol grubunda ölçüldü ve sonuçlar sırası ile  $108,29 \pm 222,36$  pg/ml ve  $123,12 \pm 177,52$  pg/ml olarak tesbit edildi. Buna göre kontrol grubunda IL-21 serum düzeyi hasta grubundan daha düşük düzeydeydi ve bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı olarak bulundu ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 4.3.** Hasta ve kontrol grubu IL-21 serum düzeyleri.

Sitokin ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiye Pearson korelasyon testi ile bakıldı. Buna göre IL-17A ile IL-22 ekspresyon düzeyleri arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ( $r=0,479$ ,  $p=0,001$ ). IL-21 ekspresyonu ile IL-17A ve IL-22 arasında negatif bir ilişki görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde değildi.

Bu sonuçlar elde edildikten sonra IL-17A, IL-21, IL-22 serum düzeylerinin kolon kanserinin klinikopatolojik bulgular ile olan ilişkisine bakıldı.

### **4.3. IL-17A, IL-21 ve IL-22 Serum Düzeylerinin Hasta Klinikopatolojik Bulguları ile İlişkisi**

Hastaların tümör dokusuna ait bilgiler radyoloji tetkiklerinin ve patoloji raporlarının sonuçlarına göre kaydedildi. Buna göre, araştırdığımız sitokinlerin etkileyebileceği parametreler dikkate alınarak, diferansiyasyon derecesi, tümör evresi, lenf nodu metastazının varlığı, sayısı, , lenfovasküler ve perinöral invazyon varlığı, uzak metastas varlığı ile IL-17A, IL-21,IL-22 serum düzeyleri arasında bir ilişki var mı araştırıldı (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4.** Sitokin serum düzeyleri ile klinikopatolojik bulgular arasındaki ilişki.

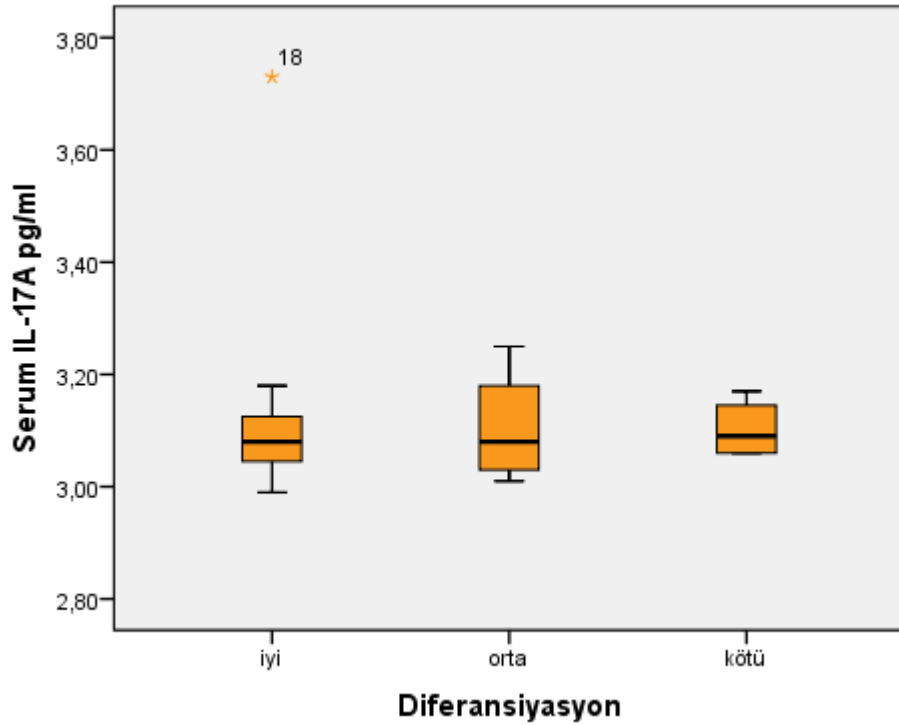
	n	IL-17A (pg/ml)	IL-21 (pg/ml)	IL-22 (pg/ml)
<b>Diferansiyasyon</b>				
iyi	12	3,14(2,99-3,73)	52,97(13,15-177,77)	39,11(38,47-42,91)
orta	24	3,09(3,01-3,25)	141,87(12,84-1394,00)	38,66(38,37-39,18)
kötü	4	3,10(3,06-3,17)	72,75(11,87-173,60)	38,76(38,61-39,03)
<b>p</b>		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05
<b>TNM Evresi</b>				
1	13	3,08(3,02-3,21)	152,87(12,84-1394,0)	38,68(38,47-39,00)
2a	5	3,27(3,04-3,73)	39,98(13,15-81,18)	39,60(38,50-42,91)
2b	4	3,08(3,01-3,25)	159,24(95,30-317,05)	38,66(38,52-38,83)
3a	6	3,07(3,02-3,12)	109,85(11,87-319,93)	38,80(38,54-39,03)
3b	11	3,09(2,99-3,20)	73,45(20,85-255,75)	38,68(38,37-39,15)
4b	1	3,17(3,17-3,17)	40,42(40,42-40,42)	38,61(38,61-38,61)
<b>p</b>		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05
<b>Modifiye Astler-Coller Evresi</b>				
A	6	3,10(3,04-3,19)	53,80(15,41-177,77)	38,62(38,47-38,80)
B1	6	3,08(3,03-3,21)	275,28(22,15-1394,00)	38,69(38,47-38,91)
B2	11	3,16(3,01-3,73)	79,52(12,84-317,05)	39,14(38,50-42,91)
C1	4	3,09(3,02-3,14)	138,54(26,31-319,93)	38,67(38,54-38,73)
C2	9	3,09(2,99-3,20)	68,24(20,85-255,75)	38,67(38,37-39,15)
D	4	3,08(3,06-3,12)	78,54(11,87-173,60)	38,84(38,61-39,03)
<b>p</b>		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05
<b>Patolojik Lenf Nodu (PLN)</b>				
PLN Yok	24	3,12 (3,01-3,73)	119,94 (12,84-1394,0)	38,87 (38,47-42,91)
PLN ≤ 3	13	3,07 (2,99-3,17)	92,24(11,87-319,93)	38,68 (38,37-39,15)
PLN >3	3	3,15 (3,11-3,20)	84,71 (26,31-93,05)	38,85 (38,69-38,72)
<b>p</b>		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05
<b>Lenfovasküler İnvazyon</b>	<b>n</b>	<b>IL-17A (pg/ml)</b>	<b>IL-21 (pg/ml)</b>	<b>IL-22 (pg/ml)</b>
Var	12	3,07 (3,01-3,17)	123,86 (11,87-319,93)	38,72 (38,50-39,03)
Yok	28	3,12 (2,99-3,73)	101,62 (12,84-1394,0)	38,85 (38,37-42,91)
<b>p</b>		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05
<b>Perinöral İnvazyon</b>	<b>n</b>	<b>IL-17A (pg/ml)</b>	<b>IL-21 (pg/ml)</b>	<b>IL-22 (pg/ml)</b>
Var	11	3,14(2,99-3,73)	58,25(11,87-173,60)	39,12(-38,37-42,91)
Yok	29	3,10(3,01-3,25)	127,27(12,84-1394,0)	38,69(38,47-39,18)
<b>p</b>		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05
<b>Metastaz</b>				
var	5	3,09(3,06-3,17)	70,91(11,87-173,60)	38,80(38,61-39,03)
yok	35	3,11(2,99-3,73)	113,63(12,84-1394,00)	38,81(38,37-42,91)
<b>p</b>		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05



#### 4.3.1. Diferansiyasyon ile Sitokinlerin Serum Düzeyleri arasındaki ilişki

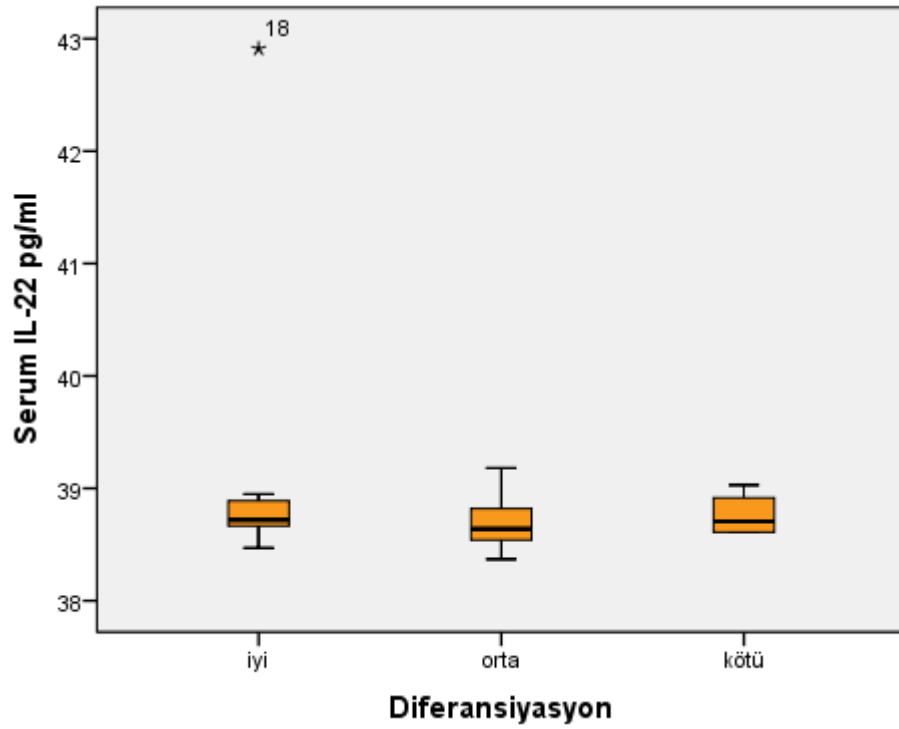
Bu bölümde Th17 hücreleriyle ilgili sitokinlerin tümörün diferansiyasyonu ile bir ilişkisi var mı araştırıldı. Çalışmaya alınan hasta grubunda kötü diferansiyasyonlu hasta sayısı iyi ve orta diferansiyasyona göre çok daha azdı, bu grupta dört hasta bulunmaktaydı.

Sonuçlar IL-17A için değerlendirildiğinde, serum düzeylerinin her üç grupta da benzer düzeylerde olduğu tespit edildi. İyi, orta, kötü diferansiyasyona göre sırasıyla IL-17A serum düzeyleri sırasıyla 3,14; 3,09; 3,14 pg/ml olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4.5) ( $p>0,05$ ).



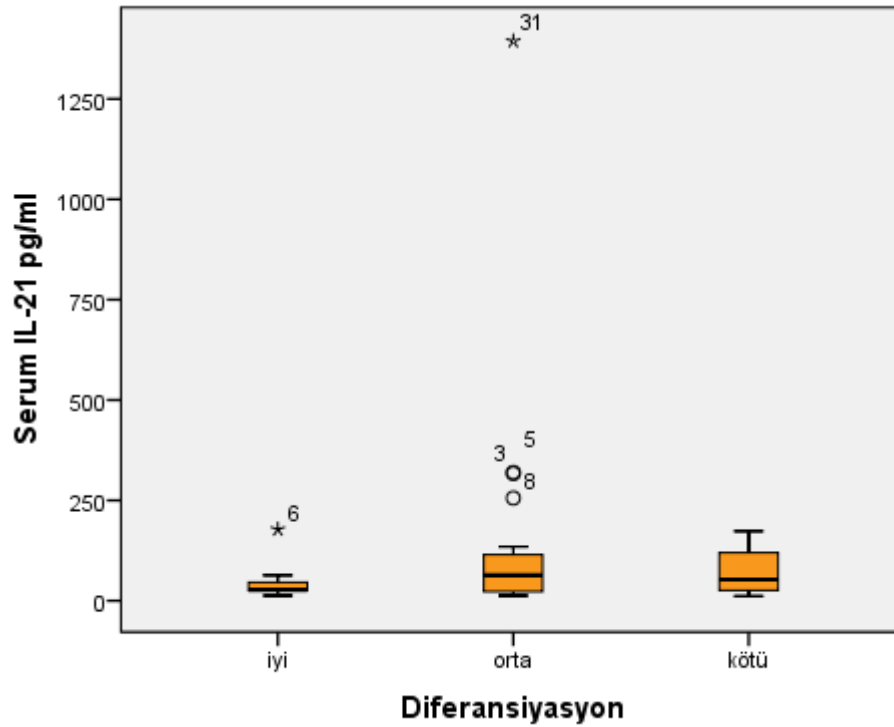
**Şekil 4.4.** Diferansiyasyon derecesine göre IL-17A serum düzeyleri.

IL-22 hasta serum düzeyleride benzer bir durum göstermekteydi, grup ortalamaları arasında belirgin bir fark yoktu, iyi-orta-kötü diferansiyasyon derecelerine göre sırasıyla 38,11; 38,66 ve 38,76 pg/dl ortalama değerleri bulundu. İstatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamadı ( $P>0,05$ )



**Şekil 4.5.** Diferansiyasyon derecesine göre IL-22 serum düzeyleri.

IL-21 serum düzeylerinde diferansiyasyon derecesine göre gruplar arasında bir fark görülse de istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşamadı ( $P > 0,05$ ). Orta derecede diferansiyasyon grubunda iki katı kadar bir artış saptandı ama bunun bir hastada çok yüksek değerlere ulaştığı için olduğu düşünüldü, bu hasta çıkarıldıktan sonra yapılan hesaplamalarda da sonuçlarda bir değişiklik olmadı.



**Şekil 4.6.** Diferansiyasyon derecesine göre IL-21 serum düzeyleri.

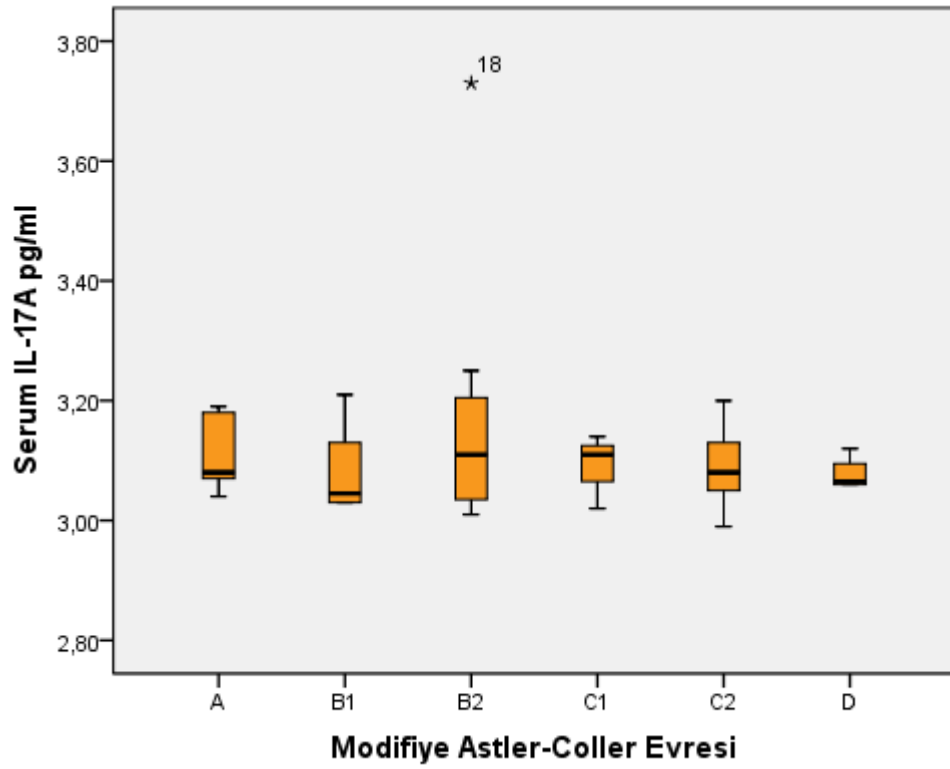
**Tablo 4.5.** Sitokin serum düzeyleri ile diferansiyasyon arasındaki ilişki.

Diferansiyasyon	n	IL-17A (pg/ml)	IL-21 (pg/ml)	IL-22 (pg/ml)
iyi	12	3,14(2,99-3,73)	52,97(13,15-177,77)	39,11(38,47-42,91)
orta	24	3,09(3,01-3,25)	141,87(12,84-1394,00)	38,66(38,37-39,18)
kötü	4	3,10(3,06-3,17)	72,75(11,87-173,60)	38,76(38,61-39,03)
p		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05

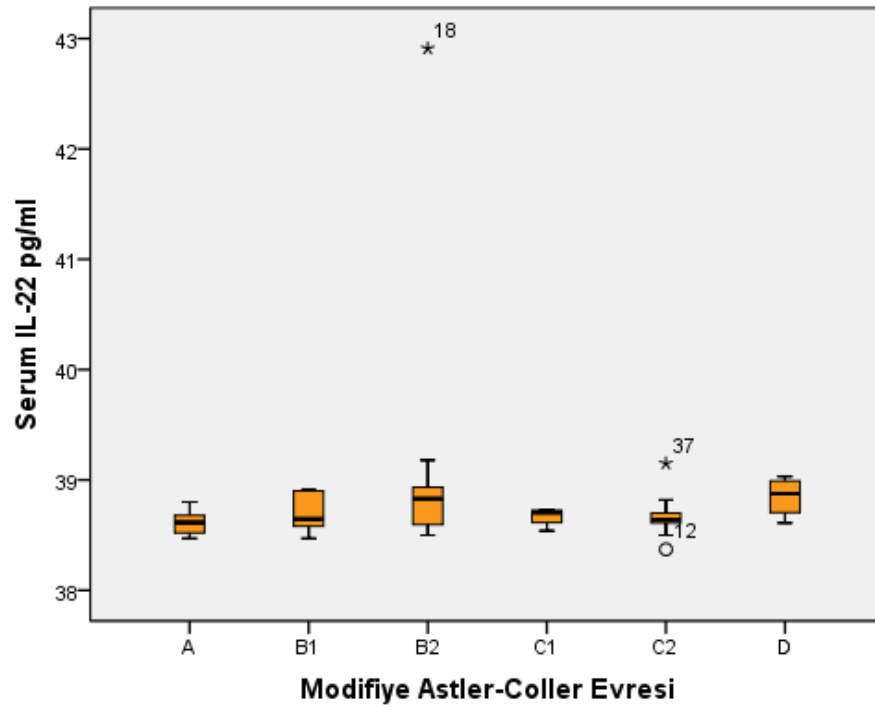
#### 4.3.2. Tümör Evresi ile Sitokinlerin Serum Düzeyleri arasındaki ilişki

Tümör evresi için Modifiye Astler-Coller (MAC) sınıflaması kullanıldı. Burada tümörün serozaya doğru invazyon bulguları da yer aldığı için tümör evresi ile sitokin ekspresyon düzeyleri arasında daha önemli bilgi verebileceği düşünüldü.

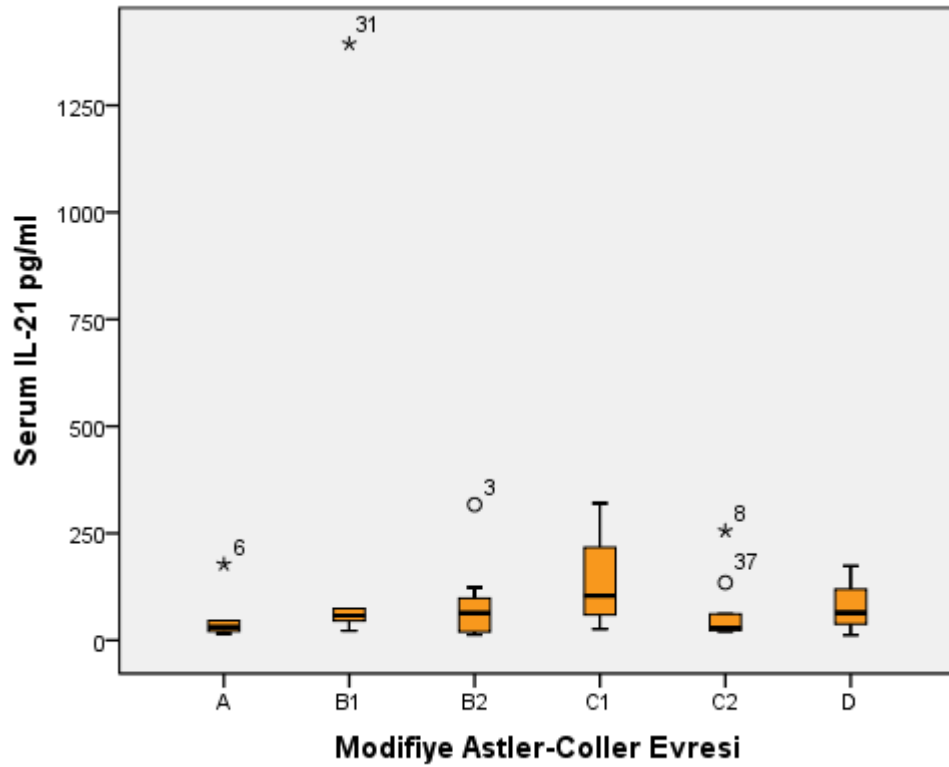
IL-17, IL-21 ve IL-22 ile tümör evresi arasındaki ilişki değerlendirildi. Her üç sitokin için de evreler arasında ekspresyon düzeyleri açısından fark saptanamadı, istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç bulunamadı (Tablo 4.6) (P> 0,05).



Şekil 4.7. Modifiye Astler-Coller Evresine göre IL-17A serum düzeyleri.



Şekil 4.8. Modifiye Astler-Coller Evresine göre IL-22 serum düzeyleri.



Şekil 4.9. Modifiye Astler-Coller Evresine göre IL-21 serum düzeyleri.

Tablo 4.6. Sitokin serum düzeyleri ile Modifiye Astler-Coller evresi arasındaki ilişki.

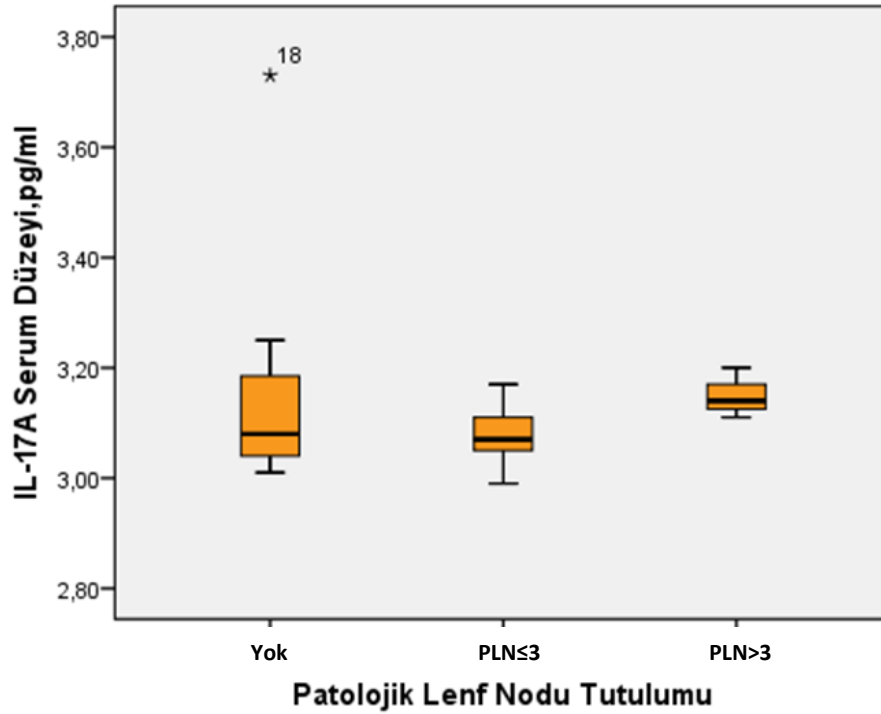
Modifiye Astler-Coller Evresi	n	IL-17A (pg/ml)	IL-21 (pg/ml)	IL-22 (pg/ml)
A	6	3,10(3,04-3,19)	53,80(15,41-177,77)	38,62(38,47-38,80)
B1	6	3,08(3,03-3,21)	275,28(22,15-1394,00)	38,69(38,47-38,91)
B2	11	3,16(3,01-3,73)	79,52(12,84-317,05)	39,14(38,50-42,91)
C1	4	3,09(3,02-3,14)	138,54(26,31-319,93)	38,67(38,54-38,73)
C2	9	3,09(2,99-3,20)	68,24(20,85-255,75)	38,67(38,37-39,15)
D	4	3,08(3,06-3,12)	78,54(11,87-173,60)	38,84(38,61-39,03)
p		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05

#### 4.3.3. Patolojik Lenf Nodu (PLN) ile Sitokinlerin Serum Düzeyleri arasındaki ilişki

Bilindiği üzere kolon kanseri lenfatik yolla metastaz yapan bir kanser türüdür ve bu nedenle tedavide ameliyatla çıkarılan lenf nodu sayısı ve patolojik tutulumu

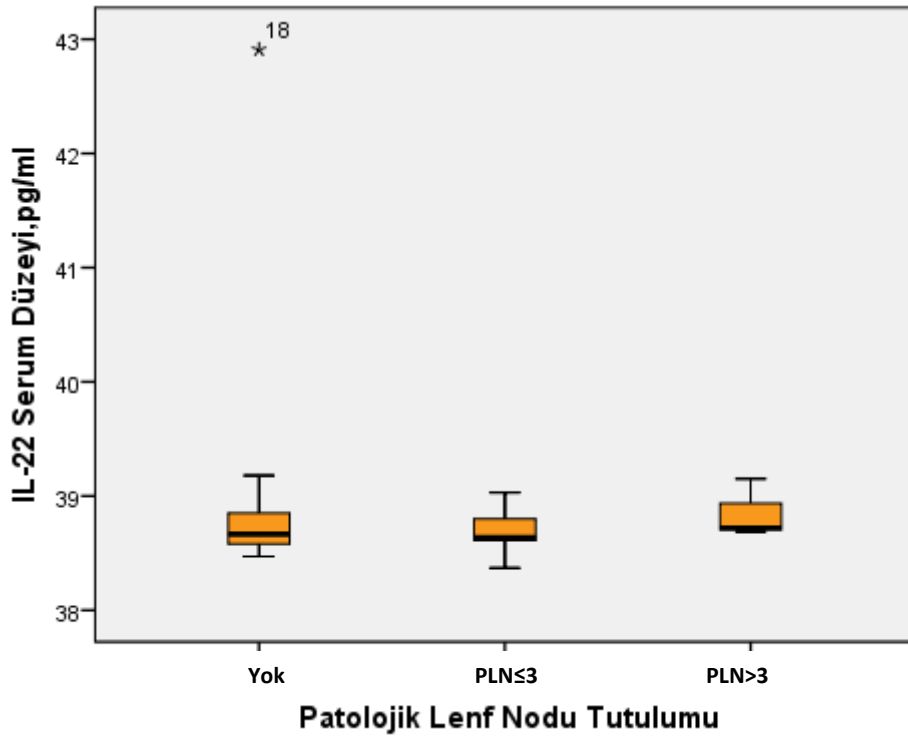
olan lenf nodu sayısı önem taşımaktadır. Buna göre biz de Th17 ilişkili sitokinlerin serum düzeyleri ile patolojik lenf nodu tutulumu ve tutulan lenf nodu sayısı arasındaki ilişki var mı bunu araştırdık. PLN sayısının 3'ün üzerinde olması prognoz açısından önemli olduğu için PLN sayısına göre de hastaları  $PLN \leq 3$  ve  $PLN > 3$  olarak iki gruba ayırdık.

IL-17 ile yaptığımız çalışmada hastaların serum düzeylerinin PLN varlığı ve yokluğu arasında bir değişiklik göstermediği, PLN sayısının artması sonuçları değiştirmedini saptadık (Şekil 4.10) ( $P > 0,05$ ).



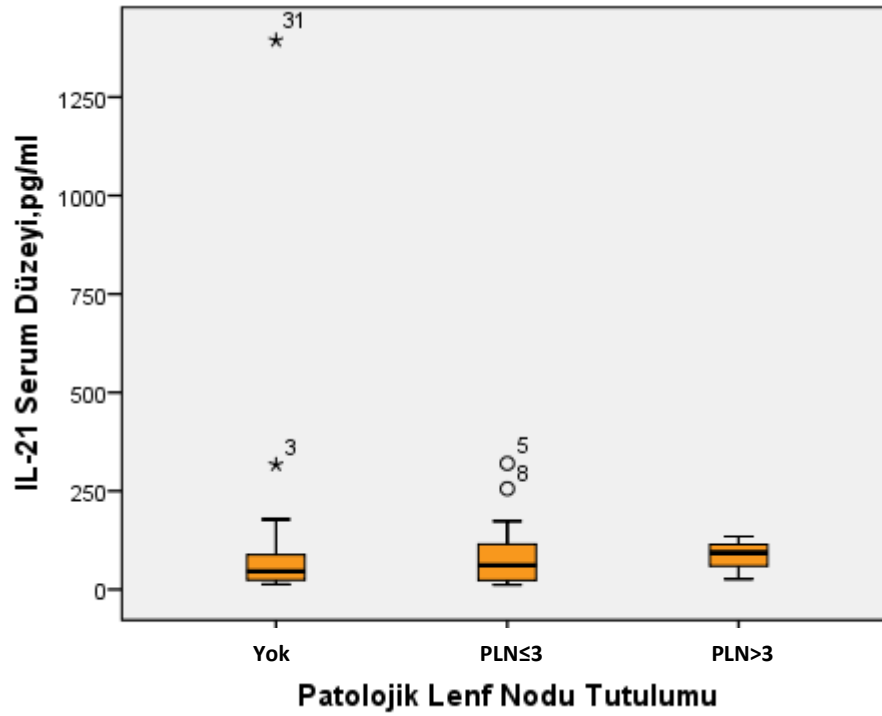
**Şekil 4.10.** Patolojik lenf nodu tutulumuna göre IL-17A serum düzeyleri.

IL-22 serum düzeyleri IL-17A ile benzerlik gösteriyordu, burada da PLN sayısına göre anlamlı bir değişim görülmemekteydi ( $p > 0,05$ ). Bu sitokin içinde 18 nolu hasta IL-17 de olduğu gibi en yüksek serum düzeyini gösteren hastaydı. Bu hastanın özelliklerine bakıldığı zaman orta yaşlı, erkek, iyi diferansiye, MAC B2 tümörü olan, PLN si olmamasına karşın perinöral invazyonu olan bir hastaydı.



**Şekil 4.11.** Patolojik lenf Nodu tutulumuna göre IL-22 serum düzeyleri.

IL-21 ekspresyon düzeyleri ile PLN arasında bir ilişki tespit edilemedi (Tablo 4.7) ( $p>0,05$ ). IL-21 serum düzeylerinde hastalar arasında sapmaların çok fazla olduğunu biliyoruz ve en yüksek ekspresyona sahip hasta PLN bulunmayan bir grupta yer alıyordu. PLN sayısı arttıkça ortalamalar düşüyor gibi görünse de, ortalamadan sapma gösteren hastaların hepsi erken evrede tümör saptanan hastalardır.



**Şekil 4.12.** Patolojik lenf nodu tutulumuna göre IL-21 serum düzeyleri.

Çalışmaya katılan hasta sayısını artırmak veya özellikle PLN>3 ileri evrede bulunan hasta sayısını artırmak IL-21' nin dağılımını net bir şekilde ortaya çıkarmak açısından önemli olabilir (Şekil 4.12).

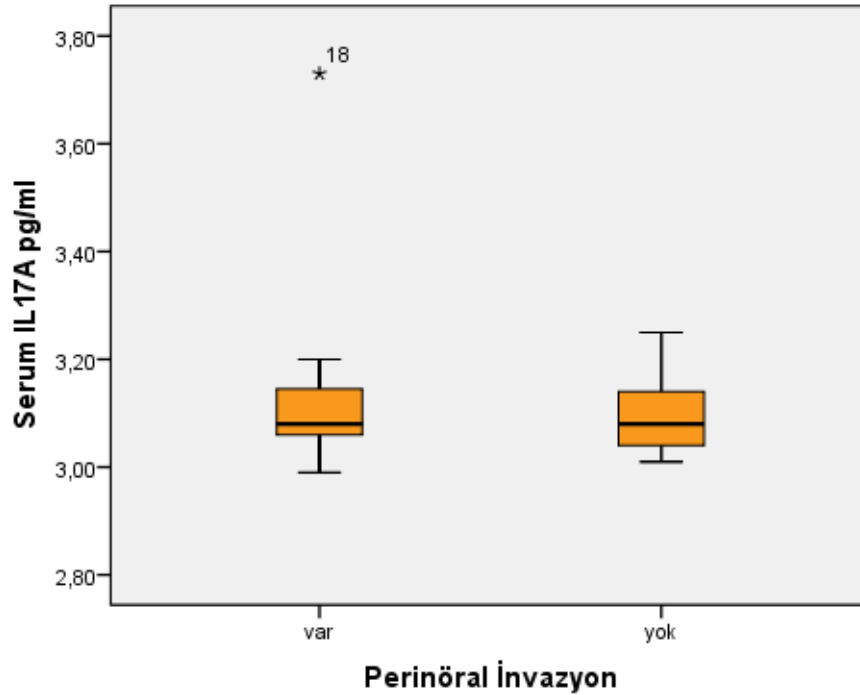
**Tablo 4.7.** Sitokin serum düzeyleri ile patolojik lenf nodu tutulumu arasındaki ilişki.

Patolojik Lenf Nodu (PLN)	n	IL-17A (pg/ml)	IL-21 (pg/ml)	IL-22 (pg/ml)
PLN Yok	24	3,12 (3,01-3,73)	119,94 (12,84-1394,0)	38,87 (38,47-42,91)
PLN≤3	13	3,07 (2,99-3,17)	92,24(11,87-319,93)	38,68 (38,37-39,15)
PLN >3	3	3,15 (3,11-3,20)	84,71 (26,31-93,05)	38,85 (38,69-38,72)
<b>p</b>		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05



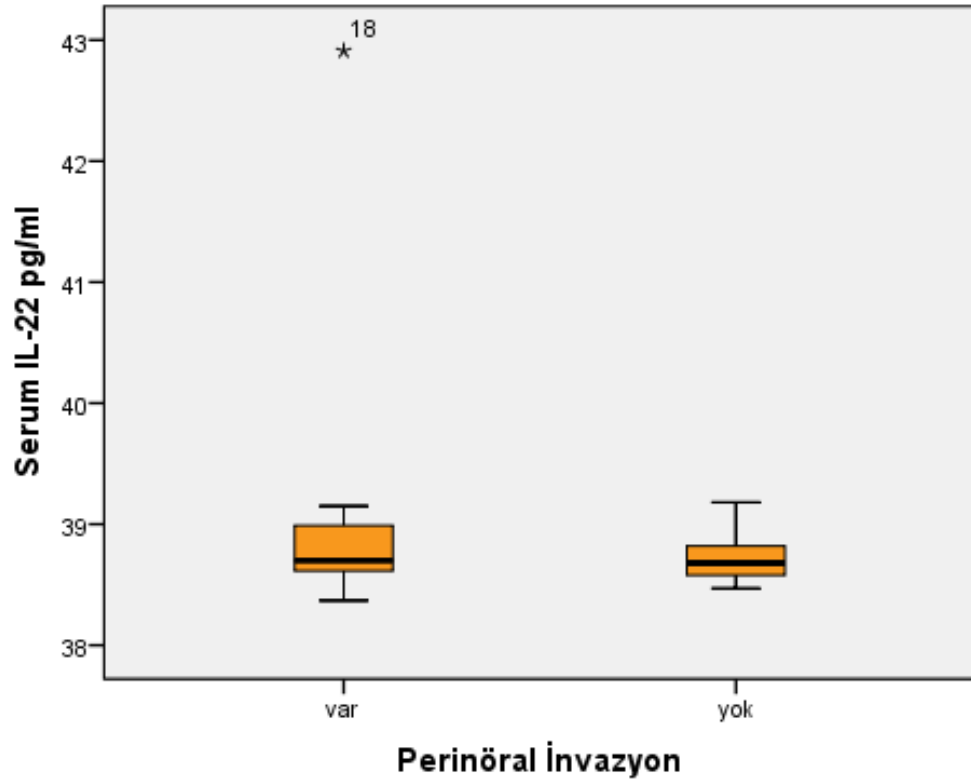
#### 4.3.4. Perinöral invazyon ile Sitokinlerin Serum Düzeyleri arasındaki ilişki

Sitokinlerin ekspresyon düzeylerinin perinöral invazyonun varlığı ile artış gösterip göstermediği kesitsel olarak incelendi (Tablo 4.8). IL-17A sonuçları değerlendirildiğinde, perinöral invazyon olan grupta, olmayan gruba göre IL-17 serum düzeyi daha yüksek olarak bulundu[(sırası ile; 3,14 (2,99-3,73) pg/ml ve 3,10 (3,01-3,25) pg/ml)] ama bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). Bununla birlikte en yüksek ekspresyon gösteren hasta, perinöral invazyonun olduğu grupta yer alıyordu. Bu iki grup arasında hasta dağılımının eşit olmaması, sonucu etkilemiş olabilir (Şekil 4.13).



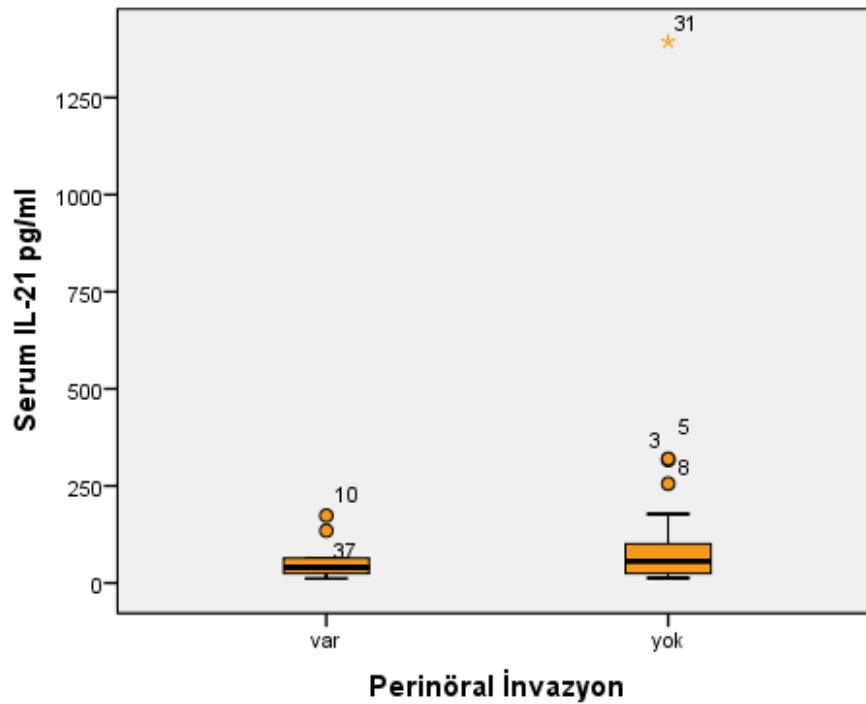
Şekil 4.13. Perinöral invazyon ile IL-17A serum düzeylerinin ilişkisi.

IL-22 serum düzeyleri ile IL-17 serum düzeylerinin dağılımına benzer bir karakter gösteriyordu. Perinöral invazyonu olan grupta serum düzeyi daha yüksek olma eğilimindeydi. Perinöral invazyon olan grupta ekspresyon düzeyleri 39,12 (38,37 - 42,91) pg/ml ve olmayan grupta 33,69 (38,47 - 39,18) pg/ml olarak bulundu ama istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** Perinöral invazyon ile IL-22 serum düzeylerinin ilişkisi.

IL-21 serum düzeylerinde ise diğer iki sitokine göre tam tersi bir görünüm vardı. Perinöral invazyonu olan grupta 58,25 (11,87-173,60) pg/ml, invazyon olmayan gruba göre 127,27 (12,84-1394,0) pg/dl daha düşük düzeyler bulundu ama istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). Bu sonucun gruplara göre hasta dağılımının eşit olmamasından kaynaklanabileceği düşünüldü (Şekil 4.15).



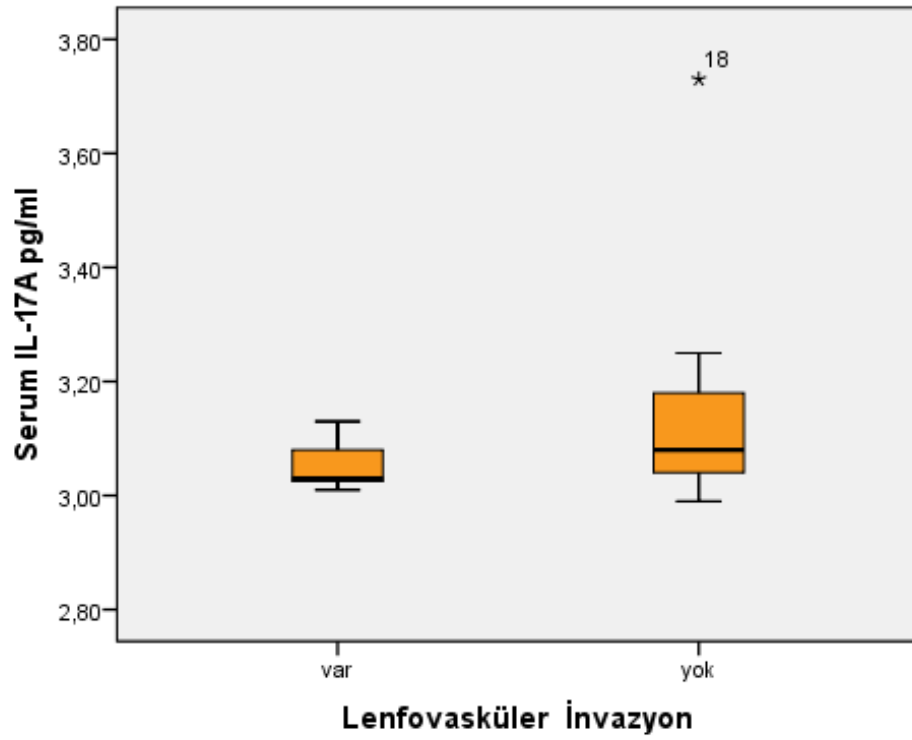
**Şekil 4.15.** Perinöral invazyon ile IL-21 serum düzeylerinin ilişkisi.

**Tablo 4.8.** Sitokin serum düzeyleri ile perinöral invazyon arasındaki ilişki.

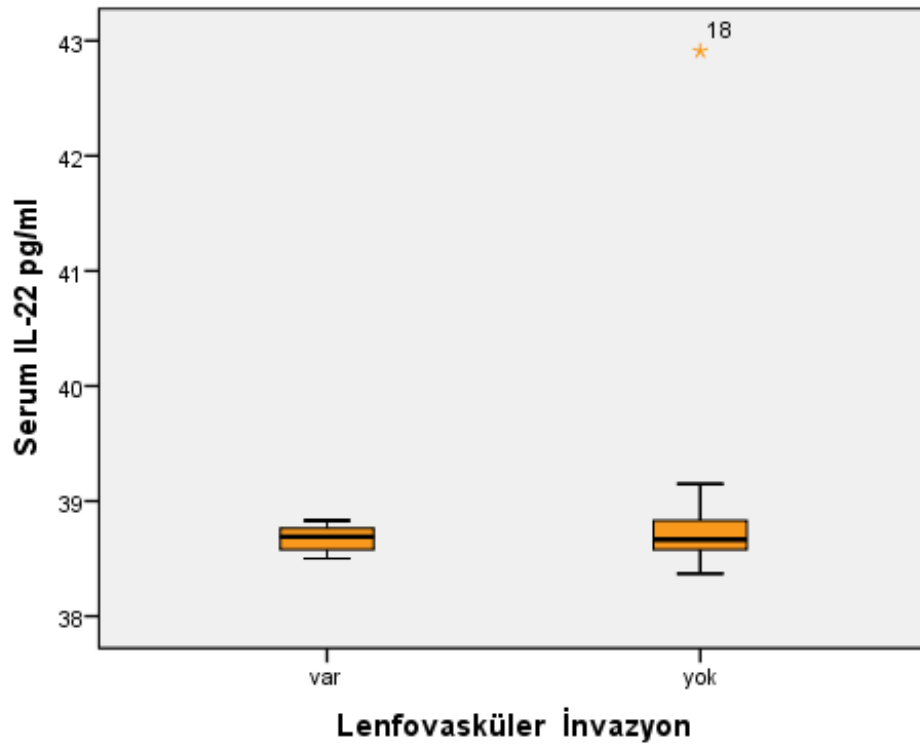
Perinöral İnvazyon	n	IL-17A (pg/ml)	IL-21 (pg/ml)	IL-22 (pg/ml)
Var	11	3,14(2,99-3,73)	58,25(11,87-173,60)	39,12(-38,37-42,91)
Yok	29	3,10(3,01-3,25)	127,27(12,84-1394,0)	38,69(38,47-39,18)
<b>p</b>		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05

#### 4.3.5. Lenfovasküler İnvazyon ile Sitokinlerin Serum Düzeyleri arasındaki ilişki

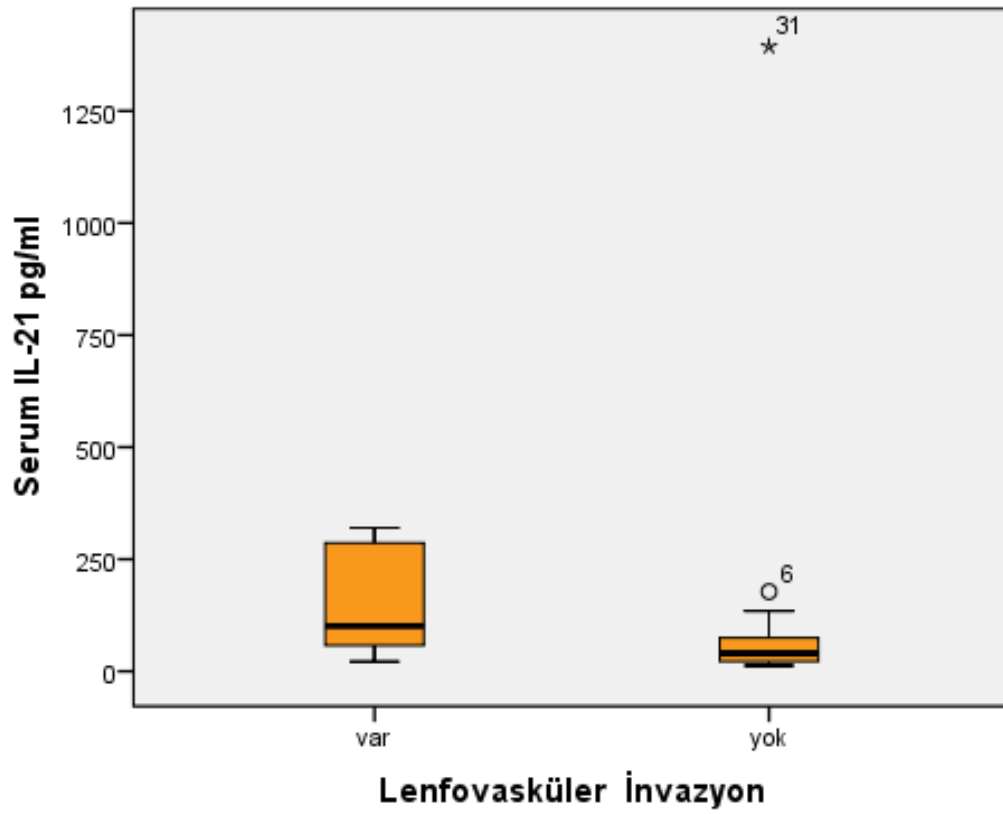
Hastaların IL-17A, IL-21 ve IL-22 serum düzeyleri ile lenfovasküler invazyonun varlığı arasında herhangi bir ilişki tesbit edilemedi ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.9). Hastaları çalışmaya rastgele dahil etmemiz nedeniyle lenfovasküler invazyon olan grupta hasta sayısı olmayan gruba göre iki kat daha fazlaydı. Bu durum sonuçların istatistiksel olarak anlamlı çıkmasını etkilemiş olabilir. IL-21 analizlerinde ortalamadan çok fazla sapma gösteren hasta değerinin çıkarılarak yapılan analizler de sonuçları değiştirmemiştir.



Şekil 4.16. Lenfovasküler invazyon ile IL-17A serum düzeylerinin ilişkisi.



Şekil 4.17. Lenfovasküler invazyon ile IL-22 serum düzeylerinin ilişkisi.



**Şekil 4.18.** Lenfovasküler invazyon ile IL-21 serum düzeylerinin ilişkisi.

**Tablo 4.9.** Sitokin serum düzeyleri ile perinöral invazyon arasındaki ilişki.

Lenfovasküler İnvazyon	n	IL-17A (pg/ml)	IL-21 (pg/ml)	IL-22 (pg/ml)
Var	12	3,07 (3,01-3,17)	123,86 (11,87-319,93)	38,72 (38,50-39,03)
Yok	28	3,12 (2,99-3,73)	101,62 (12,84-1394,0)	38,85 (38,37-42,91)
<b>p</b>		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05

#### 4.3.6 Metastaz ile Sitokinlerin Serum Düzeyleri Arasındaki İlişki

Uzak metastaz ile sitokinlerin serum düzeyleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilemedi. Metastaz olan hasta sayısının beş olmasına karşın metastazı olmayan hasta sayısının 35 olması iki grup arasında serum düzeyleri açısından sağlıklı bir karşılaştırma yapmayı güçleştiriyordu. Daha uzun bir süreçte uzak metastazı olan ve olmayan hasta sayısını eşitleyerek yapılacak bir çalışmada analiz sonuçları farklı olabilir.

**Tablo 4.10.** Sitokin serum düzeyleri ile uzak metastaz arasındaki ilişki.

Metastaz	n	IL-17A (pg/ml)	IL-21 (pg/ml)	IL-22 (pg/ml)
var	5	3,09(3,06-3,17)	70,91(11,87-173,60)	38,80(38,61-39,03)
yok	35	3,11(2,99-3,73)	113,63(12,84-1394,00)	38,81(38,37-42,91)
<b>p</b>		P> 0,05	P> 0,05	P> 0,05

## 5. TARTIŞMA

Kolorektal kanserler bugün bütün dünyada en sık görülen kanserler arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Kanser ilişkili ölümlerde ise dördüncü sıradadır (79). Yaşla birlikte görülme sıklığı artmakla birlikte tarama programları ile önlenebilir kanserler arasında yer almaktadır. Bunun için hastalığı tanımlayacak veya prognozu belirleyecek biyobelirteçlere gereksinim duyulmaktadır. Kolorektal kanserlerin patogeneğinde rol alan faktörlerin bilinmesi erken tanıda veya hedeflenmiş tedavilerin belirlenmesinde önem taşımaktadır.

Kolorektal tümör dokusuna infiltre olan immün hücre tipi, miktarı ve salgıladığı sitokinler de tümör gelişimini etkilemektedir. Özellikle T hücreler önem taşımaktadırlar. Yapılan çeşitli araştırmalarda CD4+ T hücre ve CD8+ T hücrelerin sayısının artması iyi prognozla ilişkili bulunmuştur (80). Bu nedenle hastalığın prognozu ve tedaviye yanıtı hastadan hastaya çok farklılık göstermektedir. Bazı araştırmalar, T hücre alt grubunda yer alan Th17 hücrelerinin ve eksprese ettiği IL-17'nin mide kanseri, over kanseri, meme kanseri ve küçük hücre-dışı akciğer kanserinde rolü olduğunu göstermişlerdir (81,82,83,84,85). Th17 hücrelerinden salınan proinflamatuvar IL-17A ve diğer sitokinlerin ekspresyonu bu nedenle önem taşımaktadır. Bazı araştırmalarda ise kolorektal kanserlerde Th17 hücrelerinin bulunması ve artmış IL-17A ekspresyonunun olması prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (86,87,88). Th1 ve Th17 hücre gen ekspresyon düzeyleri arasındaki dengenin hastaların klinik verilerini etkilediği ama bunun tutarlı olmadığı görülmüştür. Ayrıca yapılan çalışmalarda IL-17A'nın Th17 dışında NK, innate lenfoid ve  $\gamma\delta$  T hücrelerinden de salınıyor olması da bu sitokinin prognostik değeri hakkında tartışmaya yol açmaktadır (73). *Amicarella F.* ve arkadaşları kolorektal tümörlerde Th17 hücre dansitesinin tüm yaşam süresini artırdığını ileri sürerken, *Tosolini* ve arkadaşları Th17 gen ekspresyon düzeylerinin tumor dokusunda artmasının azalmış hastalısız sağ kalımla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (89,90).

Bu nedenlerle IL-17A dışında diğer Th17 ile ilgili sitokinlere bakılması Th17'nin prognostik göstergesini kuvvetlendirecek bir yaklaşım olabilir. Biz bu düşünceden hareketle kolorektal kanser hastalarında IL-17A ile birlikte Th17 den

eksprese olan IL-21 ve IL-22 sitokinlerinin serum düzeylerinin nasıl değiştiğini ve bunların hastanın klinikopatolojik verileriyle olan ilişkisini araştırdık.

Bizim alışmamızda kolorektal kanser hastalarında IL-17A serum düzeylerini kontrol grubunun serum düzeylerine göre daha yüksek olarak bulduk ( $p<0.001$ ) ve bu sonuç daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile de uyumluydu (86,87,88). IL-22 serum düzeylerine bakıldığında kontrol grubu hastalara göre hasta grubunda bu sitokin de serum düzeyleri artmış olarak bulundu ( $p<0.001$ ). Daha önce yapılan çalışmalarda da kolon epiteli üzerine inflamatuvar etkileri olduğu, fare ile yapılan araştırmalarda kolon tümörü gelişiminde etkin rol oynadığı gösterilmiştir (65,67). Ayrıca IL-22'nin serum düzeyleri yüksek olan kolorektal kanser hastalarının tedaviye verdikleri yanıtın, düşük serum düzeyi olan hastalara göre daha kötü olduğu da gösterilmiştir (66). IL-21 düzeylerine baktığımızda ise hastalarda serum düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde olduğu tespit edildi. inflamatuvar barsak hastalığı sonrası gelişen kolorektal kanserlerde IL-21'in etkisi gösterilmekle beraber sporodik kanserlerdeki etkisi henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (90). Bizim beklentimiz Th17 hücrelerinin dokudaki dansitesinin artışına bağlı olarak IL-21 düzeylerinin de artmasıydı ama literatüre baktığımızda da bununla ilgili çelişkili çalışmalar bulunduğunu gördük. Bu durum Th17 hücrelerinin aktivasyon mekanizmalarının sekrete edilecek sitokini de etkilediğini düşündürmektedir. Bu nedenle kolorektal kanser hastalarının serumunda IL-17A ve IL-22 serum düzeyleri artış gösterirken IL-21 azalmış olabilir.

Bu sitokinlerin birbiri ile olan ilişkisine bakıldığında ise IL-17A ile IL-22'nin serum düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu tespit edildi. Her iki sitokinin salınımını etkileyen mekanizmaların aynı olabileceği düşünüldü. Bu sitokinlerin serum düzeyleri ile IL-21 serum düzeyleri arasında ise ters bir korelasyon vardı. Bu durum IL-17A, IL-22 ile IL-21 sinyal iletim yolakları arasında ki olası kontrol mekanizmaları açısından araştırılabilir. Diğer taraftan IL-21 eksprese eden Th17 dışındaki NK, CD8+ T hücre, B lenfosit gibi hücrelerin aktivitelerinin baskılanması ve sayılarının tümör dokusunda azalması da IL-21 serum düzeylerinin azalmasına neden olabilir, bu konu da göz önünde bulundurulmalıdır.



IL-17A ve IL-22 serum düzeyleri için bir eşik-değerin bu çalışmada belirlenmesi (IL-17A için 2.755 pg/ml, IL-22 için 35.63 pg/ml ), bu iki sitokinin kolorektal kanser tanısı açısından kullanılabilir biyobelirteçler arasında yer alabileceğini düşündürmektedir. Her ikisinin birden yüksek olması kanser tarama programlarında, hastanın kolorektal kanser açısından ileri tetkikler ile araştırılmasını sağlayabilir. Bu durum erken tanı açısından önemlidir ve hastalığın tedavi edilebilirliğini artıracaktır. Daha fazla hasta ile yapılacak olan eşik-değer belirleme çalışmalarında bu serum düzeyleri değişebilir.

Bu çalışmada IL-17A, IL-22 ve IL-21 serum düzeylerinin prognoz açısından önemini tespit edebilmek amacıyla, elde edilen verilerin hastaların klinikopatolojik bulguları ile nasıl bir ilişki gösterdiği analiz edildi. Bunun için hastaların patoloji ve radyoloji raporları kullanıldı. Evreleme için Modifiye Astler-Coller (MAC) sınıflamasından yararlanıldı. Evreye, diferansiyasyona, patolojik lenf nodu tutulumuna, lenfovasküler ve perinöral invazyona, uzak metastaza göre sitokin serum düzeylerindeki değişim değerlendirildi. Bizim sonuçlarımıza göre MAC evresi ile her üç sitokinin serum düzeyleri arasında bir ilişki tesbit edemedik. *Wang J.* ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise ileri evre hastalarda IL-17A düzeylerinin düştüğünü tespit etmişlerdir (92). *Sharp S.P.* ve arkadaşları ise ileri evrelerde IL-17A'nın erken evrelere göre daha fazla salgılandığını göstermişlerdir (93). Bizim araştırmamızda çalışmaya alınan hastaların evrelere göre dağılımının nominal olmaması veya hasta sayısının az olması anlamlı bir sonuç elde edilmesini etkilemiş olabilir. Kolorektal kanserlerde lenf nodu tutulumu hasta prognozu açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle ameliyat sırasında çıkarılan total lenf nodu (TLN) sayısı, patolojik lenf nodu (PLN) sayısı ve PLN/TLN oranı prognozu belirlemede kullanılmaktadır. Biz hastaları bu bulgulara göre değerlendirdiğimizde IL-17A, IL-22 ve IL-21 serum düzeyleri arasında herhangi bir ilişki tespit edemedik. Ayrıca diferansiyasyon, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve uzak metastaz ile araştırdığımız interlökinlerin serum düzeyleri arasında da bir ilişki bulunamadı. Bu gruplar arasındaki dağılımın homojen olmamasından veya hasta sayısının az olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Sonuç olarak Th17 hücrelerinden salgılanan IL-17A ve IL-22 serum düzeylerinin kolorektal kanser hastalarında artmış olarak bulunması onların tanıda olası biyobelirteçler olarak kullanılabilmelerini sağlayabilir. Ayrıca hedef tedaviler açısından da iyi birer hedef molekül olabilirler. Her hastanın tümör özelliklerinin farklı olması nedeniyle (farklı evre, farklı diferansiyasyon, farklı invazyon düzeyleri) bu tedavilerin kullanımına IL-17A ve IL-22 serum düzeylerine bakılarak karar verilebilir. Bu konuda yüksek hasta sayıları ile yapılacak genişletilmiş çalışmaların planlanması ortak tedavi stratejilerinin belirlenmesi konusunda da yardımcı olabilir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- IL-17A serum düzeyleri hasta grubunda, kontrol grubuna göre artmıştır ( $p<0,01$ ).
  - IL-22 serum düzeyleri hasta grubunda, kontrol grubuna göre artmıştır ( $p<0,01$ ).
  - IL-21 serum düzeyleri hasta grubunda, kontrol grubuna göre azalmıştır ( $p<0,01$ ).
  - IL-17A ve IL-22 için eşik-değeri tesbit edilmiştir. IL-17A için 2.755 pg/ml, IL-22 için 35.63 pg/ml .
  - IL-17A ve IL-22 serum düzeyleri arasında pozitif yönde bir korelasyon tespit edilmiştir ( $r=0,479$ ,  $p=0,01$ ).
  - IL-17A, IL-22 ile IL-21 serum düzeyleri arasında negatif korelasyon eğilimi tespit edilmesine karşın istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).
  - IL-17A, IL-22 ve IL-21 serum düzeyleri ile diferansiyasyon derecesi arasında ilişki saptanamamıştır ( $p>0,05$ ).
  - IL-17A, IL-22 ve IL-21 serum düzeyleri ile modifiye Astler- Coller sınıflaması arasında bir ilişki saptanamamıştır ( $p>0,05$ ).
  - IL-17A, IL-22 ve IL-21 serum düzeyleri ile patolojik lenf nodu sayısı arasında bir ilişki saptanamamıştır ( $p>0,05$ ).
  - IL-17A, IL-22 ve IL-21 serum düzeyleri ile lenfovasküler invazyon arasında bir ilişki saptanamamıştır ( $p>0,05$ ).
  - IL-17A, IL-22 ve IL-21 serum düzeyleri ile perinöral invazyon arasında bir ilişki saptanamamıştır ( $p>0,05$ ).
  - IL-17A, IL-22 ve IL-21 serum düzeyleri ile uzak metastaz arasında bir ilişki saptanamamıştır ( $p>0,05$ ).
- Bu bulgular dikkate alındığında aşağıdaki çalışmalar planlanabilir;
- IL-17A ve IL-22 için eşik-değer belirlemek amacıyla hasta sayısı artırılarak çalışma sonuçları tekrar değerlendirilebilir.
  - Ameliyatla tümör dokusu çıkarıldıktan sonra IL-17A, IL-22 ve IL-21 serum düzeyleri ölçülerek değişim değerlendirilebilir.

- Bu serum ekspresyon düzeylerinin gen ekspresyon düzeyleriyle uyumlu olup olmadığını araştırmak için dokuda q-PCR ile mRNA düzeylerine bakılabilir.
- Bu sitokinlerin kaynağının hangi hücreler olduğunu tespit etmek için dokudaki hücre dağılımına bakılabilir.
- Tümör dokusunda Th17 dansitesine immünohistokimya ile bakılabilir.
- Periferik dolaşımdaki Th17 miktarına bakılabilir, flow sitometri ile fonksiyonları değerlendirilebilir.
- Tümör dokusundan Th17 hücreleri izole edilerek primer hücre kültürü yapılarak fonksiyon analizi yapılabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Hurtado CG, Wan F, Housseau F, Sears CL. Roles for Interleukin 17 and Adaptive Immunity in Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2018;155:1706–1715
2. Wang J., Xu K., Wu J., Luo C. , Li Y., Wu X. et al. The changes of Th17 cells and the related cytokines in the progression of human colorectal cancers. *BMC Cancer* 2012, 12:418.
3. Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, et al. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;138:1429–40.
4. Galon J, Fridman WH and Pages F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Cancer Res*, 2007. 67(5): p. 1883-6.
5. Kojima M, Ochiai A. Special cancer microenvironment in human colonic cancer: Concept of cancer microenvironment formed by peritoneal invasion (CMPI) and implication of subperitoneal fibroblast in cancer progression. *Pathol Int.* 2016. 66(3): 123–131.
6. Hanahan D., Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144: 646–74.
7. Chao H, Hong L, Xiuli G, Bin W, Dan C, Jinyuan L, Fengliang H. Analysis of different components in the peritumoral tissue microenvironment of colorectal cancer: A potential prospect in tumorigenesis. *Molecular Medicine R.* 2016. 14:p 2555-65.
8. Danese S, Malesci A, Vetrano S. Colitis-associated cancer: the dark side of inflammatory bowel disease. *Gut*, 2011. 60(12):1609-10
9. Omrane I, Benammar-Elgaaied A. The immune microenvironment of the colorectal tumor: Involvement of immunity genes and microRNAs belonging to the TH17 pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2015. 1856(1):28-38.
10. Naschberger E, Liebl A, Schellerer VS, Schütz M, Britzen-Laurent N, Kölbl P. Matricellular protein SPARCL1 regulates tumor microenvironment-dependent endothelial cell heterogeneity in colorectal carcinoma. *J Clin Invest.* 2016. 126(11):4187-4204
11. Abbas A.K, Lichtman A.H., Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* Seventh Edition (2012).
12. Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, Lawson DH, Ford ML. Exogenous IL-2 Induces FoxP3+ Th17 Cells In Vivo in Melanoma Patients. *J Immunother.* 2016. 39(9):355-366
13. West NR, McCuaig S, Franchini F, Powrie F. Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 2015. 15, 615–629.

14. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B: TGF- $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006, 24:179–189
15. Fabre J, Giustiniani J, Garbar C, Antonicelli F, Merrouche Y, Bensussan A ve ark. Targeting the Tumor Microenvironment: The Protumor Effects of IL-17 Related to Cancer Type. *Int J Mol Sci.* 2016. 30;17(9).
16. Cui G, Yuan A, Goll R, Florholmen J. IL-17A in the tumor microenvironment of the human colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Scand. J. Gastroenterol.* 2012. 47, 1304–1312.
17. Mohan SM, Pierre M, Srinivasa VK, Jagadeesh B. Th17 Cells Biology, Pathogenesis of Autoimmune and Inflammatory Diseases, and Therapeutic Strategies. *The American Jour. of Pathology,* 2012, 181:8-18
18. Ankathatti MM, Deng Y, Mulligan SJ, Xiang J. Th17 and Th17-stimulated CD8<sup>+</sup> T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2011. 60(10):1473-84.
19. Punt S, Fleuren GJ, Kritikou E, Lubberts E, Trimbos JB, Jordanova ES, Gorter A. Angels and demons: Th17 cells represent a beneficial response, while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervical cancer. *Oncoimmunology.* 2015. 4(1):e984539.
20. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009. 27:485–517
21. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD ve ark. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007. 8:950-957.
22. Geginat J, Paroni M, Kastirr I, Larghi P, Pagani M, Abrignani S. Reverse plasticity: TGF- $\beta$  and IL-6 induce Th1-to-Th17-cell transdifferentiation in the gut. *Eur J Immunol.* 2016. 46(10):2306-2310.
23. Bettelli E., Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, ve ark. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* 2006. 441: p. 235–8.
24. Geis AL, Fan H, Wu X, Wu S, Huso DL, Wolfe JL ve ark. Regulatory T-cell Response to Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Colonization Triggers IL17-Dependent Colon Carcinogenesis. *Cancer Discov.* 2015. 5(10):1098-109.
25. Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, Lawson DH, Ford ML. Exogenous IL-2 Induces FoxP3<sup>+</sup> Th17 Cells In Vivo in Melanoma Patients. *J Immunother.* 2016. 39(9):355-366.
26. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S ve ark. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood.* 2009. 114:1141–1149.

27. Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternik M, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. *Reprod Immunol*. 2012 Mar; 93(2):75-81.
28. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, ve ark. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005; 129:50-65.
29. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2006. 203:1685–1691
30. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006. 177:566–573
31. Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2009 Nov; 137(5):1736-45.
32. Esplugues E, Huber S, Gagliani N, Hauser AE, Town T, Wan YY, ve ark. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* 2011, 475:514–518
33. Zenewicz LA, Antov A, Flavell RA. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. *Trends Mol Med* 2009, 15:199–207
34. Punkenburg E, Vogler T, Büttner M, Amann K, Waldner M, Atreya R, ve ark. Batf-dependent Th17 cells critically regulate IL-23 driven colitis-associated colon cancer. *Gut*. 2016. 65(7):1139-50
35. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*. 2009. 9(8):556-67.
36. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010. 10:248–256
37. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010. 140:845–858.
38. Deng Z, Mu J, Tseng M, Wattenberg B, Zhuang X, Egilmez NK, ve ark. Enterobacteria-secreted particles induce production of exosome-like S1P-containing particles by intestinal epithelium to drive Th17-mediated tumorigenesis. *Nat Commun*. 2015. 24;6:6956.
39. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol*. 1986. 136, 2348–2357.
40. Ghilardi N, Ouyang W. Targeting the development and effector functions of Th17 cells. *Semin. Immunol*. 2007. 19, 383–393.

41. Illarregui JM, van Beelen AJ, Fehres CM, Bruijns SCM, García-Vallejo JJ, van Kooyk Y. New Roles for CD14 and IL- $\beta$  Linking Inflammatory Dendritic Cells to IL-17 Production in Memory CD4<sup>+</sup> T Cells. *Immunol Cell Biol* 2016. 94 (10), 907-916
42. Liu Z, Huang Y, Cao BB, Qiu YH, Peng YP. Th17 Cells Induce Dopaminergic Neuronal Death via LFA-1/ICAM-1 Interaction in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*. 2016. 14
43. Shimada M, Andoh A, Hata K, Tasaki K, Araki Y, Fujiyama Y, Bamba T. IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators. *J Immunol* 2002;168: 861–8.
44. Chabaud M, Lubberts E, Joosten L, Den Berg W, Miossec P. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2001;3:168–77.
45. Hsieh HG, Loong CC, Lui WY, Chen A, Lin CY. IL-17 expression as a possible predictive parameter for subclinical renal allograft rejection. *Transpl Int*. 2001;14:289–98.
46. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology*. 2005. 6:1133–1141.
47. Kim BS, Park YJ, Chung Y. Targeting IL-17 in autoimmunity and inflammation. *Arch Pharm Res*. 2016. 39(11):1537-1547.
48. Monin L, Gaffen SL. Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 Apr 2;10(4)
49. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, et al. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 2009. 30, 108–119.
50. Chung AS, Wu X, Zhuang G, Ngu H, Kasman I, Zhang J, et al. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Med* 2013. 19:1114-1123.
51. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003. 52:65–70.
52. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, et al. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol* 2005. 175:6177–6189
53. Ye J, Livergood RS, Peng G. The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity. *Am J Pathol* 2013. 182:10-20.



54. Shapiro M, Nandi B, Pai C, Samur MK, Pelluru D, Fulciniti M, ve ark. Deficiency of IL-17A, but Not the Prototypical Th17 Transcription Factor ROR $\gamma$ t, Decreases Murine Spontaneous Intestinal Tumorigenesis. *Cancer Immunol Immunother* 2015. 65 (1), 13-24.
55. Liu Z, Yang L, Cui Y, Wang X, Guo C, Huang Z, ve ark. IL-21 enhances NK cell activation and cytolytic activity and induces Th17 cell differentiation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009. 15(8):1133-44
56. Wurster AL, Rodgers VL, Satoskar AR, Whitters MJ , Young DA , Collins M , Grusby MJ. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon  $\gamma$ -producing Th1 cells. *J Exp Med*. 2002. 196: 969–977.
57. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, ve ark. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*. 2000. 408:57–63.
58. Maeda M, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Minami K, Nakamaru Y, Takagi D, Fukuda S, Onoe K. IL-21 enhances dendritic cell ability to induce interferon-gamma production by natural killer T cells. *Immunobiology*, 2007. 212(7): p. 537-47.
59. Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature*, 2009. 457(7225): p. 36-37.
60. Jauch D, Martin M, Schiechl G, Kesselring R, Schlitt HJ, Geissler EK, Fichtner-Feigl S. Interleukin 21 controls tumour growth and tumour immunosurveillance in colitis-associated tumorigenesis in mice. *Gut*, 2011. 60(12): p. 1678-86.
61. Rutz S, Eidenschenk C, Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol Rev*. 2013. 252(1):116-32
62. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces of IL-22. *Nat Immunol*, 2011. 12:383–90.
63. Spits H, Di Santo J.P. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat. Immunol*, 2011. 12:21–27.
64. Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, ve ark. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol*, 2006. 36:1309–1323.
65. Zenewicz L.A, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, Flavell RA. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity*, 2008. 29:947–957.

66. Wu T, Cui L, Liang Z, Liu C, Liu Y, Li J. Elevated serum IL 22 levels correlate with chemoresistant condition of colorectal cancer. *Clin. Immunol.* 2013. 147: 38–39
67. Kirchberger S, Royston DJ, Boulard O, Thornton E, Franchini F, Szabady RL, Harrison O, Powrie F. Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *The Journal of Experimental Medicine*, 2013. 210:917–931
68. Zhu X, Mulcahy LA, Mohammed RA, et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.* 2008;10:R95
69. Sharp SP, Avram D, Stain SC, Lee EC. Local and systemic Th17 immune response associated with advanced stage colon cancer. *J Surg Res.* 2017 Feb;208:180-186
70. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2011;71:1263–1271.
71. De Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2006 Jan;6(1):24-37.
72. Karczmarczyk A, Karp M, Giannopoulos K. The role of Th17 cells in tumor immunity. *Acta Haematologica Polonica.* 2014 June; 45(2): 155-160
73. 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 Elsevier 2003.
74. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2016.* *CA Cancer J Clin.* 2016. 66(1):7-30.
75. Baykan A, Zorluoğlu A, Geçim E, Terzi C. *Kolon ve Rektum Kanseri.* İstanbul, Türkiye: Seçil Ofset Matbaacılık; 2010.
76. Netter F.H. *The Netter Collection of Medical Illustrations, Vol 3, Digestive System Part II.* 9<sup>th</sup> ed. New York, USA: Saunders- Elsevier Inc.; 2006.
77. Gordon P.H, Nivatvongs S. *Neoplasm of the Colon, Rectum and Anus.* 2nd ed. New York, USA: Informa Healthcare USA, Inc; 2007.
78. Küpelioglu 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.
79. Douaiher J, Ravipati A, Grams B, et al. Colorectal cancer- global burden, trends, and geographical variations. *J Surg Oncol* 2017;115:619–630.
80. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313:1960–1964.

81. Asadzadeha Z, Mohammadi H, Safarzadeh E, Hemmatzadeh M et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cellular Immunology* 322 (2017) 15–25
82. Liu X, Jin H, Zhang G, et al. Intratumor IL-17-positive mast cells are the major source of the IL-17 that is predictive of survival in gastric cancer patients. *PLoS One*. 2014;9:e106834.
83. Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, et al. Tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup> Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. *Oncol Rep*. 2011;25:1271-1277.
84. Kato T, Furumoto H, Ogura T, et al. Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282:735-738.
85. Chen X, Wan J, Liu J, et al. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer*. 2010;69:348e354.
86. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*. 2011;71(4): 1263–1271.
87. Camus M, Tosolini M, Mlecnik B, et al. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Res* 2009;69:2685–93.
88. Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, et al. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;138:1429–40
89. Hurtado CG, Wan F, Housseau F, Sears CL. Roles for Interleukin 17 and Adaptive Immunity in Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2018;155:1706–1715
90. De Simone V, Pallone F, Monteleone G, Stolfi C. Role of T<sub>H</sub>17 cytokines in the control of colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2013 Dec 1;2(12):e26617
91. Amicarella F, Muraro MG, Hirt C, et al. Dual role of tumour-infiltrating T helper 17 cells in human colorectal cancer. *Gut* 2017;66:692–704.
92. Maniati E, Soper R, Hagemann T. Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene* October 2010. 29(42):5653-62
93. Wang J, Xu K, Wu J, Luo C, Li Y, Wu X et al. The changes of Th17 cells and the related cytokines in the progression of human colorectal cancers. *BMC Cancer* 2012, 12:418.

## 8.EKLER

### EK-1. Tez Çalışması Etik Kurul İzni



T.C.  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - ~~537~~

Konu :

#### ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 10.05.2016 SALI  
**Toplantı No** : 2016/10  
**Proje No** : GO 16/149 (Değerlendirme Tarihi : 05.04.2016)  
**Karar No** : GO 16/149 - 43

Üniversitemiz Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Füsün ÖZMEN'in sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. M. Mahir ÖZMEN ve Uzm. Dr. Cem Emir GÜLDOĞAN ile birlikte çalışacakları, Nurlana İBRAHİMLİ GO 16/149 kayıt numaralı ve "Kolorektal Kanserde Th17 İlişkili IL-17, IL-21, IL-22 Ekspresyon Düzeyleri'nin Belirlenmesi" başlıklı proje önerisi araştırmının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- |  |   |
|--|---|
| 1. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Başkan) | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)         |
| 2. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Üye)         | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye)             |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARAR (Üye)     | IZINLI<br>12. Doç. Dr. Gözde GİRĞİN (Üye)     |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)         | IZINLI<br>13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye)  | 14. Yrd. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)         |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)       | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖZ (Üye)    |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)       | 16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye)            |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye)     | 17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGELEN (Üye)           |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)   | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye)                   |

## EK-2. Tez Çalışması Orijinallik Raporu

### Kolorektal Kanserlerde Th17 İlişkili IL-17, IL-21 ve IL-22 Sitokinlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

#### ORIJINALLIK RAPORU

%8	%6	%4	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	<a href="http://www.spandidos-publications.com">www.spandidos-publications.com</a> İnternet Kaynağı	%1
2	<a href="http://www.turkcerrahi.com">www.turkcerrahi.com</a> İnternet Kaynağı	%1
3	<a href="http://www.istanbulsaglik.gov.tr">www.istanbulsaglik.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	%1
4	<a href="http://www.saglik-bilgisi.net">www.saglik-bilgisi.net</a> İnternet Kaynağı	<%1
5	<a href="http://www.worldacademicunion.com">www.worldacademicunion.com</a> İnternet Kaynağı	<%1
6	Pehlivan, Erkan, Nese Karakas, Gulsen Gunes, and Ali Ozer. "Investigation of sociodemographic and health characteristics of mothers in low birth weight newborns in Malatya city center", Medicine Science   International Medical Journal, 2013. Yayın	<%1

## EK-3.Dijital Makbuz

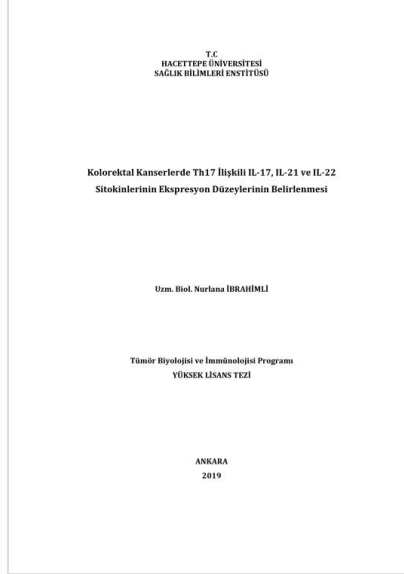


### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Nurlana Ibrahimli  
Ödev başlığı: Tez Deneme  
Gönderi Başlığı: Kolorektal Kanserlerde Th17 İlişkili...  
Dosya adı: Nurlana\_I\_brahimli\_Tez.docx  
Dosya boyutu: 3.31M  
Sayfa sayısı: 58  
Kelime sayısı: 9,046  
Karakter sayısı: 62,459  
Gönderim Tarihi: 11-Şub-2019 03:17 PM (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1076332715



## 9. ÖZGEÇMİŞ

### 1. KİŞİSEL BİLGİLER

<b>ADI, SOYADI:</b>	Nurlana İbrahimli
<b>DOĞUM TARİHİ ve YERİ:</b>	07.01.1993 Azerbaycan
<b>HALEN GÖREVİ:</b> Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji AD, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı, Yüksek Lisans Öğrencisi	
<b>YAZIŞMA ADRESİ:</b> Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı	
<b>TELEFON:</b> 05535407199	
<b>E-MAIL:</b> ibrahimli.nurlana@mail.ru	

### 2. EĞİTİM

YILI	DERECESİ	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2009-2013	Öğrenci	Nahçıvan Devlet Üniversitesi	Biyoloji öğretmenliği

### 3. AKADEMİK DENEYİM

GÖREV DÖNEMİ	ÜNVAN	BÖLÜM	ÜNİVERSİTE
2014-2016	Yüksek Lisans Öğrencisi	Temel Onkoloji AD Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi programı	Hacettepe Üniversitesi

### 4. ÇALIŞMA ALANLARI

ÇALIŞMA ALANI	ANAHTAR SÖZCÜKLER
Kolorektal Kanser, Th17	Th17 hücreleri, IL-17, IL-21, IL-22, Kolorektal Kanser