



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



KOLOREKTAL KANSERDE PERİSİTLERİN BEVASİZUMAB İLAÇ DİRENCİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Merve BAKIRCI

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Filiz ÇAY ŞENLER**

**ANKARA
2018**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLOREKTAL KANSERDE PERİSİTLERİN
BEVASİZUMAB İLAÇ DİRENCİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Merve BAKIRCI

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Filiz ÇAY ŞENLER**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
BAP-17L0230008 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA
2018**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kolonorektal Kanserde Perisitlerin Bevasizumab İlaç Direnci Üzerindeki Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Merve BAKIRCI

Tarih: 09.01.2018

İmza:



KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalında
Merve BAKIRCI tarafından hazırlanan “Kolorektal Kanserde Perisitlerin
Bevasizumab İlaç Direnci Üzerindeki Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri
tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / ~~OY~~ÇOKLUĞU ile
kabul/~~ret~~ edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 09/01/2018

İmza

Prof. Dr. Hakan AKBULUT

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof.Dr.Filiz ÇAY ŞENLER

Ankara Üniversitesi

Üye

İmza

Prof. Dr. Saadettin KILIÇKAP

Hacettepe Üniversitesi

Üye

Tez Hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür

Vekili

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi

1.GİRİŞ	1
1.1.Kanser	1
1.1.1. Kolorektal Kanser	1
1.1.1.1. Epidemiyolojisi	1
1.1.1.2. Etiyolojisi	3
1.1.1.3. Kolon ve Rektumun Anatomisi	3
1.1.1.4. Kolorektal Karsinogenez	4
1.1.1.5. Lokalizasyon	6
1.1.1.6. Tümör Yayılımı ve Metastaz	6
1.1.1.7. Evreleme	6
1.1.1.8. Tedavi	7
1.1.1.9. Prognoz	8
1.1.2. Tümör Anjiogenezi	8
1.1.2.1. Anjiyogenik Aktivatörler ve İnhibitörler	9
1.1.2.2. Anjiogenez Oluşum Basamakları	10
1.1.2.3. VEGF ve VEGFR Ailesi	11
1.1.2.4. Perisitler	13
1.1.2.5. Monoklonal Antikorlar	16
1.1.2.6. Bevasizumab	17

2. GEREÇ VE YÖNTEM	19
2.1. Hasta özellikleri	19
2.2. Deneylerde kullanılan malzeme ve gereçler	19
2.1.1. Kullanılan Gereçler	19

2.1.2. Kullanılan Kitler	20
2.3. Primer-Prob Tasarımı	20
2.4. Parafine Gömülü Doku Örneklerinin Elde Edilmesi	21
2.5. RNA İzolasyonu	21
2.6. RNA Konsantrasyonu ve Kalitesi Tayini	22
2.7. cDNA Sentezi	22
2.8. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR)	23
2.9. PZR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroforezi ile Kontrolü	24
2.10. İstatistik	24
3. BULGULAR	26
3.1. Hastaların Özellikleri	26
3.2. Tedavi sonuçları	27
3.3. Hasta örneklerinde kantitatif PZR sonuçları	27
3.4. Kantitatif PZR bulgularına göre tedavi sonuçları	29
3.5. Tek Değişkenli Analizde Progresyonsuz Sağkalımı (PFS) Etkileyen Faktörler	33
3.6. Tek Değişkenli Analizde Genel Sağkalımı (OS) Etkileyen Faktörler	34
3.7. Çok Değişkenli Analizde PFS'yi Etkileyen Faktörler	35
3.8. Çok değişkenli analizde OS'yi etkileyen faktörler	36
3.9. PZR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroforezi ile Kontrolü	37
4. TARTIŞMA	39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
ÖZET	42
SUMMARY	43
KAYNAKLAR	44
EKLER	50
ÖZGEÇMİŞ	52

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında amacımız kolorektal kanserli hastaların tümör dokusundaki perisit varlığının bevasizumab tedavisinin etkinliğindeki rolünü araştırmaktır. Elde edilen sonuçlara göre hastaya alternatif tedavi seçenekleri (kansere aşılı, immünoterapi, gen terapisi vb.) sunulabilecektir. Bu araştırma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün BAP-17L0230008 proje numarası ile desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, sorunlarımı sabırla dinleyip bana yol gösteren, çalışmalarım için gerekli olanakların sağlanmasındaki katkılarından dolayı çok değerli hocam tez danışmanım Prof. Dr. Filiz ÇAY ŞENLER'e ,

Tümör Biyolojisi Yüksek Lisans programıyla tanışmamı sağlayan, her türlü bilimsel soruna karşı bana güven ve cesaret veren, akademik ve insani yönleri ile yol gösterici olan ve manevi desteğini hiç eksik etmeyen çok değerli hocam Prof.Dr. Hakan AKBULUT'a,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını ve desteklerini hiç eksik etmeyen, güler yüzlü laboratuvar arkadaşlarım Cansu BABAHAN, Gizem SONÜGÜR, Samira ABDİ ABGARMİ ve Müge ÖÇAL'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvar çalışmam boyunca desteğini ve sevgisini esirgemeyen Nalan AKGÜN'e ve en zor anlarımda yardımına koşan ve pozitif enerjisiyle bana destek olan Gülten ORTAGENÇ GÜMÜŞ'e teşekkürü borç bilirim.

Her kararında yanımda olan, hayattaki en değerli varlıklarım babam Mesut BAKIRCI, annem Hülya BAKIRCI, ablalarım Tuğba AKBULUT ve Esra UYSAL'a, değerli dostlarıma ve sevgili nişanlım Ozan Sinan BESLER'e destekleri ve varlıkları için çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
μL	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
5-FU	5 Florourasil
ADCC	Antikora bağlı hücresel sitotoksiste
Ang	Anjiopoietin
AJCC	Amerikan Kanser Ortak Komitesi
bFGF	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
bp	Baz çifti
CEA	Karsinoembriyonik Antijen
CDC	Komplemana bağlı sitotoksiste
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CSPG4	Kondroitin Sülfat Proteoglikanları
DCC	Kolorektal kanserde silinen bölge geni
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Endotel hücre
EGF	Epidermal büyüme faktörü

EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent deneyi
EtOH	Etanol
EZ-PZR	Eş zamanlı- polimeraz zincir reaksiyonu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FOLFOX	Folinik asit-5FU-Okzaliplatin
FOLFİRİ	İrinotekan-5FU-Lökovorin
GA	Güven aralığı
gr	Gram
HBA	Human Beta Aktin
HNPCC	Hereditör Nonpolipozis Kolon Karsinomu
KRK	Kolorektal Kanser
L	Litre
mAB	Monoklonal Antikorlar
ml	Mililitre
MMP	Matriks metalloproteinazları
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
ng	Nanogram
OS	Genel sağ kalım

PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PDGFR-β	Platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü beta
PFS	Progresyonsuz sağ kalım
PIGF	Plasental büyüme faktörü
qPZR	Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
sn	Saniye
TBE	Tris/Borat/EDTA
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UICC	Uluslararası Kanser Savaş Örgütü
UV	Ultraviyole
VEGF-A	Vasküler endotelyal büyüme faktörü-A
VEGFR	Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Tüm Yaş Gruplarındaki Erkeklerde En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları	2
Şekil 1.2.	Tüm Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları	2
Şekil 1.3.	Kalın Bağırsağın Kısımları	4
Şekil 1.4.	Kolorektal Karsinogenez	5
Şekil 1.5.	Anjiyogenez oluşum basamakları	11
Şekil 1.6.	VEGF reseptörleri	12
Şekil.1.7.	Tümör hücreleri, stroma hücreleri, perisitler ve endotel hücreleri arasındaki intraselüler sinyalizasyon	14
Şekil 1.8.	Tümör neoanjiogenezinde perisit regülasyonu	15
Şekil 1.9.	Bevasizumab mekanizmasının şematik gösterimi	18
Şekil 3.1.	VEGFA/HBA'ya göre Progresyonsuz Sağkalım(PFS) Grafiği	31
Şekil 3.2.	VEGFA/HBA'ya göre Genel Sağkalım(OS) Grafiği	31
Şekil 3.3.	CSPG4'e Göre Genel Sağkalım(OS) Grafiği	32
Şekil 3.4.	CSPG4'e Göre Progresyonsuz Sağkalım(PFS) Grafiği	32
Şekil 3.5.	HBA ve VEGFA geni için qPZR amplifikasyonu yapılan bazı örneklerin %2'lik jelde yürütülmesi	38
Şekil 3.6.	CSPG4 geni için qPZR amplifikasyonu yapılan bazı örneklerin %2'lik jelde yürütülmesi	38

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Kolon Kanserinde Evreleme	7
Çizelge 1.2.	Anjiyogenez Modölatörleri	9
Çizelge 1.3.	Günümüzde kolon kanseri tedavisi için onaylı monoklonal antikorlar	17
Çizelge 2.1.	Dizaynı yapılan primer ve prob dizileri	21
Çizelge 2.2.	qPZR reaksiyon koşulları	24
Çizelge 3.1.	Hastaların özellikleri	26
Çizelge 3.2.	Tedavi sonuçları	27
Çizelge 3.3.	Hasta örneklerinde kantitatif PZR sonuçları	28
Çizelge 3.4.	VEGFA ve CSPG4 için Objektif Yanıt Oranı	29
Çizelge 3.5.	Tek değişkenli analizde PFS'yi etkileyen faktörler	34
Çizelge 3.6.	Tek değişkenli analizde genel sağkalımı (OS) etkileyen faktörler	35
Çizelge 3.7.	Çok değişkenli analizde PFS'yi etkileyen faktörler	36
Çizelge 3.8.	Çok değişkenli analizde OS'yi etkileyen faktörler	37

1.GİRİŞ

1.1.Kanser

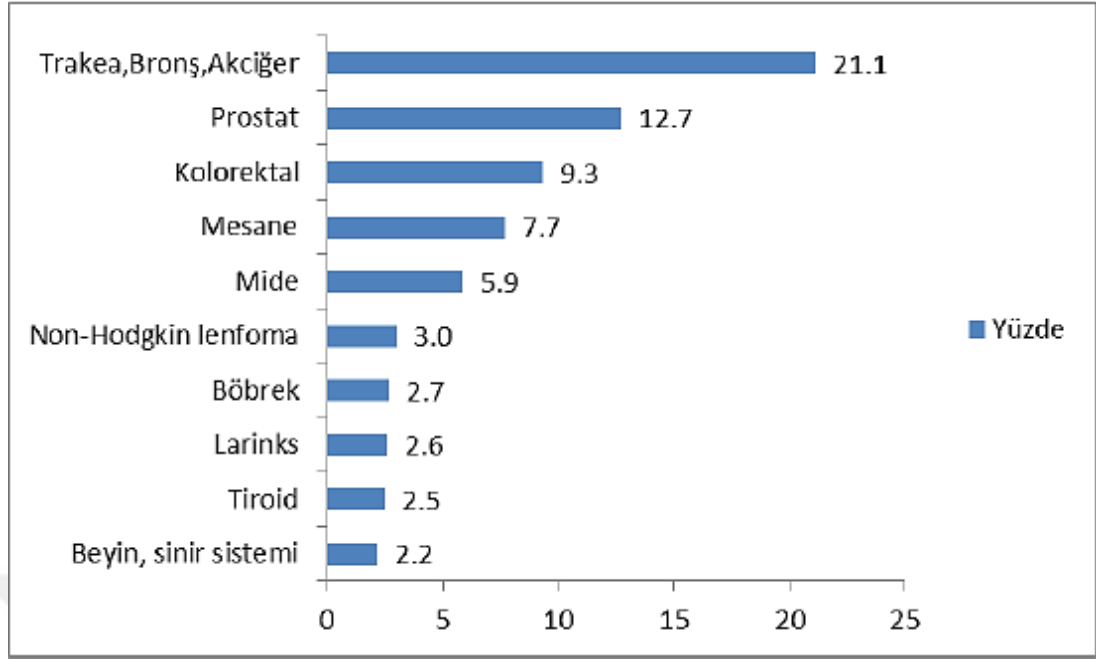
Tüm dünyada giderek artan bir sağlık sorunu haline gelen kanser, maddi ve manevi kayıplara ve ayrıca toplumlar için sosyoekonomik bir yüke yol açmaktadır.

Kanser, hücrenin büyümesi ve hücre döngüsünü kontrol eden genlerin mutasyonu veya anormal aktivasyonu ile meydana gelmektedir (Williams, 2001). Genel olarak sistemik, çevresel ve genetik faktörlerin birbiri ile etkileşimi sonucunda gelişme göstermektedir (Yokuş, 2012).

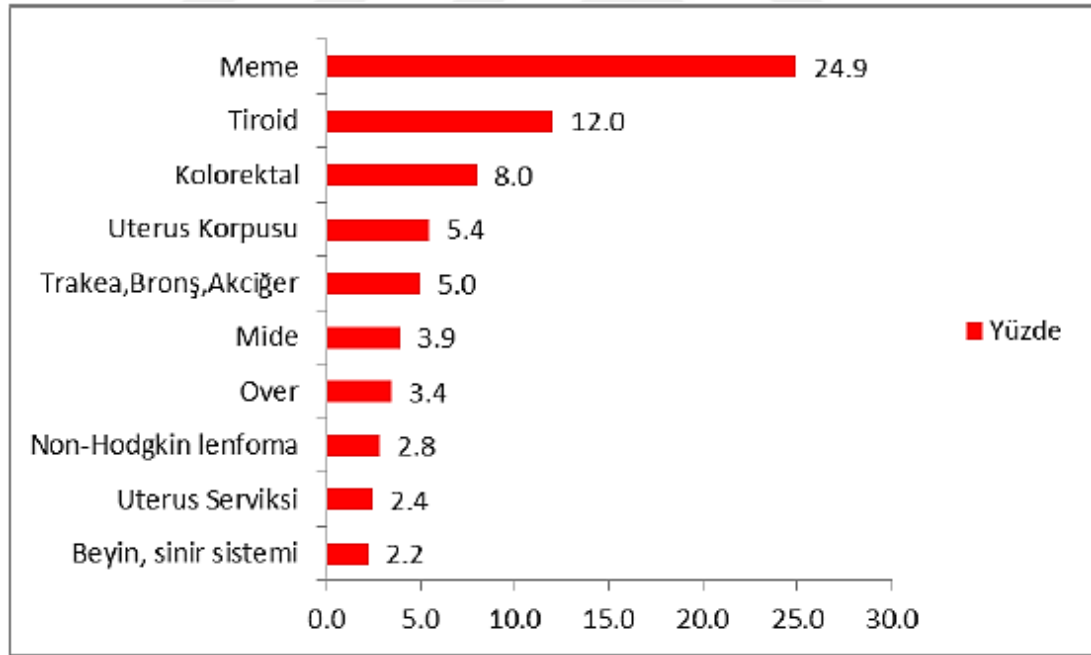
1.1.1. Kolorektal Kanser

1.1.1.1. Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2015 yılında yayınladığı verilere göre, dünyada kanser ölümlerinde kolorektal kanserler (KRK) dördüncü sırayı almıştır. Bizde ise tüm yaş gruplarındaki erkeklerde ve kadınlarda üçüncü sırada gelmektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı., 2017).



Şekil 1.1. Tüm Yaş Gruplarındaki Erkeklerde En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (T.C. Sağlık Bakanlığı., 2017)



Şekil 1.2. Tüm Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (T.C. Sağlık Bakanlığı., 2017)

1.1.1.2. Etiyolojisi

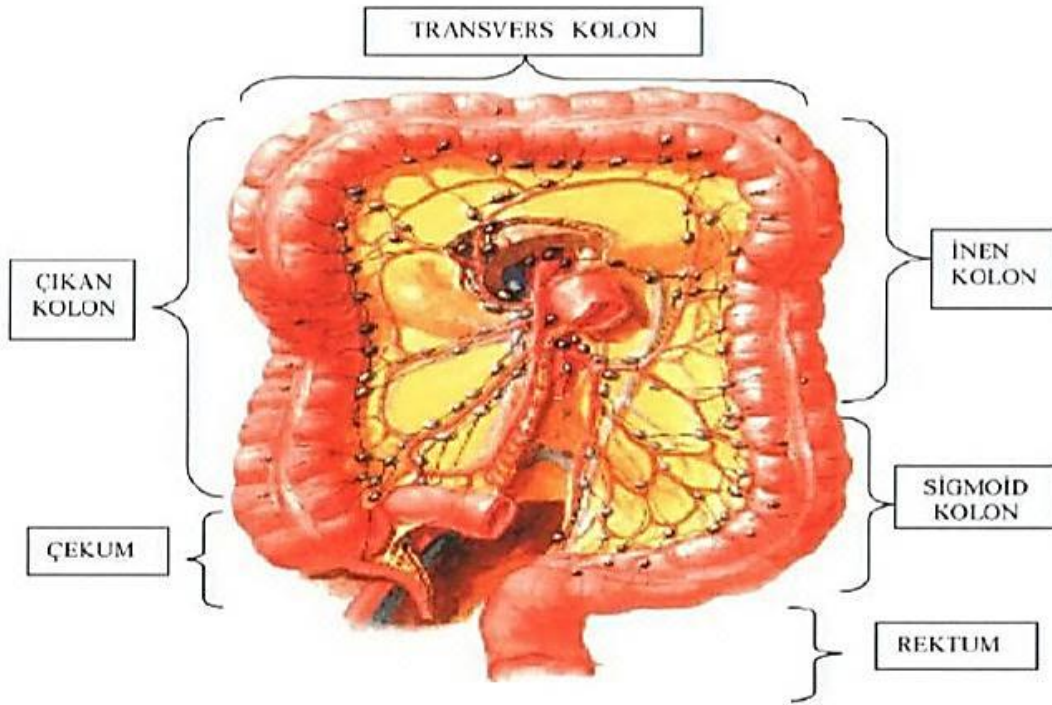
Kolon kanserinin meydana gelmesinde çevresel faktörler, yaş, diyet, adenom ve karsinom öyküsü, özellikle inflamatuvar bağırsak hastalıkları, predispozan hastalıklar ve aile öyküsü etkilidir (Papamichael ve ark., 2013).

Kolon kanser insidansı, farklı coğrafik alanlarda geniş çaplı olarak değişiklik göstermektedir; Asya, Afrika ve Latin Amerika ülkelerinde kısmen daha az, Kuzey Avrupa, Avusturalya, Yeni Zelanda ve Amerika'yı da içine alan Batı ülkelerinde daha fazladır (Smith ve ark., 2002 ; Rupnarain ve ark., 2004).

1.1.1.3. Kolon ve Rektumun Anatomisi

Kalın bağırsak, ileumun bitiminden anüse kadar uzanmaktadır ve ortalama 1.5 m uzunluğundadır. Sindirim kanalının beşte birini oluşturur. Anatomik olarak çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdan oluşur. Rektum yaklaşık olarak 10-14 cm uzunluğundadır ve sigmoid kolon ile sakrum eğilimini takip eden anal kanal arasında yer alır. (Premkumar, 2015;Gordon ve Nivatvongs, 2007).

Kalın bağırsağın tabakaları; mukoza, submukoza, kas tabakası ve seroza olmak üzere dört bölgeye ayrılır.. Kolonun mukozası katlamalar ya da villuslar içermeyen bir yapıya sahiptir. Çok sayıdaki düz, tübüler bezler ya da Lieberkühn kriptaları kolon mukozası için karakteristik özellik taşır (Ross ve Pawlina, 2014).



Şekil 1.3. Kalın Bağırsağın Kısımları (Netter, 2011)

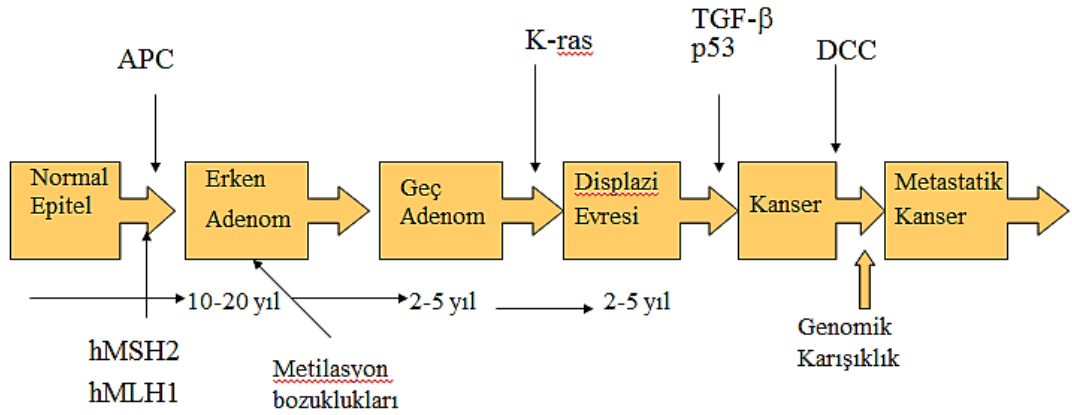
1.1.1.4. Kolorektal Karsinogenez

Birden çok sayıda mutasyonun aşamalı olarak birikiminin gözlemlendiği kolorektal karsinogenez için iki farklı yol vardır. Bu mutasyonlar birikim mekanizmaları ve gerçekleştikleri genlere göre değişiklik gösterir (Belluco ve ark., 2002).

Birinci yol olan APC/B-cathenin yoludur. Süreç lokalize bir epitel proliferasyon ile başlar, displazi derecesinin artmasıyla küçük adenomlar oluşur, ardından progresif olarak büyümeye devam eder ve sonunda invaziv kanser halini alır (Belluco ve ark., 2002).

İkinci yol ise sporadik vakaların %10-15'inde tespit edilen DNA tamir genlerinin inaktive olmasıyla ilişkilidir. (Belluco ve ark., 2002). DNA tamir mekanizması ile ilişkili, hMSH2, hMLH1, hPMS1ve hPMS2 genlerinde oluşan herhangi bir kalıtsal mutasyon HNPCC (Hereditier Nonpolipozis Kolon Karsinomu) ailesel sendromundan sorumludur (Kumar ve ark., 2013). Kolon kanseri ve adenomlarda en sık görülen aktive onkogen K-RAS genidir. Bu gen hücre içi sinyal transdüksiyonunda görev alır (Kumar ve ark., 2005). 17p kromozomunda oluşan delesyon ise hücre siklusunun düzenlenmesinde önemli rol oynayan p53 genini etkilemektedir (Kumar ve ark., 2005).

Sonuçta KRK karsinogenezinin oluşumunda birçok faktör anahtar rol oynamaktadır. Adenomdan karsinoma gidişte meydana gelen mutasyonlar sırasında, bir takım ek mutasyonlar oluşmaktadır. Ancak bunların mutlaka sırası ile oluşması için zorunluluk yoktur. Sadece tek bir olaylar dizisi değil, genomdaki değişimlerin tamamının birikimi ile neoplastik lezyonun boyutlarının, displazi seviyesinin ve invazyon potansiyelinin artışı gerçekleşir (Kumar ve ark., 2013).



Şekil 1.4. Kolorektal Karsinogenez

1.1.1.5. Lokalizasyon

Karsinomların %50'si rektosigmoid bölgede meydana gelir. Fakat son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar anatomik dağılımın distalden proksimale yer değiştirme eğiliminde olduğunu göstermektedir. (Rosai J., 2004 ; Figen D., 2005). Yapılan çalışmalarda sol kolon karsinomlarında 5 yıllık yaşam sürelerinin uzadığı; fakat tedavi ve teşhis tekniklerindeki gelişmelerin sağ kolon karsinomlarının yaşam sürelerine katkı sağlamadığı bulunmuştur (Tang ve ark., 1999). Multisentrik olarak gelişebilen kolorektal karsinomlar için bu oran %3-6'dır (Rosai J., 2004).

1.1.1.6. Tümör Yayılımı ve Metastaz

Metastatik yayılım en fazla karaciğerde ve bölgesel lenf nodlarında görülür. Yüksek infiltratif büyüme paterni gösteren ve az diferansiye alanları olan tümörlerde lenf nodu metastazı daha sık gözlenir. (Dalton ve Chandrasoma, 1999; Cooper Hs, 2004 ; Rosai J, 1996).

1.1.1.7. Evreleme

Kolorektal karsinomları evrelemek için 3 farklı sistem bulunmaktadır:

- Dukes sistemi
- Astler-Coller sistemi
- TNM sistemi

Günümüzde American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve International Union Against Cancer (UICC) tarafından yapılan TNM (T: Tümör invazyonu, N: Lenf nodu tutulumu, M: Metastaz) evrelemesi kullanılmaktadır (International Union Against Cancer (UICC), 2009).

Çizelge 1.1. Kolon Kanserinde Evreleme(International Union Against Cancer (UICC),, 2009)

Evre	TNM	Dukes sınıflaması	Tümör invazyon derecesi	5 yıllık yaşam
0	T0,N0,M0		Gözle görülür tümör yok	%97
I	T1,N0,M0	A	Tümör mükülaris mukoza ve submukoza sınırlı	%90
I	T2, N0,M0			
II	T3,N0,M0	B1 B2	Tümör mükülaris propriaya sınırlı	%78
II	T4,N0,M0			%63
III	T1-4,N1,M0	C1 C2	Tümör serozaya ulaşmış, komşu organ tutulumu olabilir.	%56-65
III	T1-4,N2,M0			%26-37
IV	T1-4,N1-2,M1	D	Uzak metastaz var	%1
Tıs: İnsitu karsinom T1: Submukoza invazyonu T2: Mükülaris propriaya invazyon T3: Seroza invazyonu T4: Komşu organ invazyonu			N0: Lenf nodu tutulumu yok N1: 1-3 lenf nodu tutulumu N2: > 4 lenf nodu tutulumu M0: Uzak metastaz yok M0: Uzak metastaz var	

1.1.1.8. Tedavi

Kolorektal karsinomlarda primer tedavi cerrahi rezeksiyondur. Çıkarılacak segmentin boyutları kanserli kolon kesimini besleyen damarlara göre belirlenir (Kalaycı G., 2002).

Cerrahi tedavi sonrasında ilk üç yıl içinde nüksler olabilmektedir. İrinotekan, oksaliptatin gibi yeni kemoterapi ajanları ve bevasizumab ve setuksimab gibi monoklonal antikörler son yıllarda metastatik kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Böylelikle hastaların sağ kalımında önemli gelişmeler gözlenmiştir (Doğan ve Akbulut, 2009).

Postoperatif kemoterapi ve radyoterapinin kombine kullanımı, lokal rekürrens riskini azaltmaktadır (Rosai J., 2004). Kemoterapi ilacı olan 5-FU (5- Florourasil) sıklıkla 1957 yılından itibaren kullanılmaktadır (Skibber ve ark., 2001). Bunun

yanısıra oksaliplatin, irinotekan ve katesitabin sitotoksik ajan olarak, bevasizumab, setuksimab ve panitumumab ise biyolojik ajan olarak son on yıldır tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır. Fluoropirimidin temelli kombinasyon tedavisi metastatik hastalıkta standart tedavidir. Genellikle 5-FU, Oksaliplatin ve Lökovorin kombinasyonu: FOLFOX ya da 5-FU, İrinotekan ve Lökovorin kombinasyonu (FOLFİRİ) kullanılmaktadır (Zuckerman ve , Clark, 2008).

1.1.1.9. Prognoz

Kolorektal karsinomun 5 yıllık sağ kalım oranı, küratif rezeksiyon sonrası %40-60 arasındadır. İlk iki yılda rekürrenslerin %71'i, beş yılda %91'i meydana gelmektedir (Rosai J., 2004).

Kolorektal karsinomlarda prognozla ilişkili olarak aşağıdaki faktörler çalışılmıştır:

Yaş, cinsiyet, serum CEA düzeyi, tümör lokalizasyonu ve boyutu, obstrüksiyon ve perforasyon varlığı, tümör sınırları ve inflamatuvar reaksiyonu, vasküler invazyon, perinöral invazyon, mikroskopik tümör tipi, nöroendokrin hücre varlığı, lenf nodu tutulumu, evre ve anjiogenez gibileri prognostik önemdedir.

1.1.2. Tümör Anjiogenezi

Anjiogenez kanser prognozunda çok önemli bir süreçtir. Endotel hücrelerinin kümelenmesi ile oluşan kapillerlerin dallanması ve genişlemesi ve küçük damarların büyüüp filizlenmesine 'anjiogenez' adı verilir. Kısaca, yeni damar gelişimi olarak tanımlanmaktadır (Folkman ve Shing, 1992). Kan damarlarının gelişmesini proanjiogenik ve antianjiyojenik faktörler arasındaki denge belirlemektedir. Embriyonik gelişme, yara iyileşmesi ve üreme gibi fizyolojik durumlarda rolü olan anjiogenez tümörlerin progresyonu, invazyonu ve metastazında da oldukça önemlidir (Folkman J., 1995).

Tümör hücreleri oksijenin diffüzyon mesafesi olan 200-300 mikron mesafeye kadar kapiller damarların çevresinde dizilirler. Fakat en fazla 2-3 mm büyüklüğe kadar ulaşabilirler. Bu büyüklükten daha fazla büyüebilmeleri için anjiyogenez süreci başlamalıdır (Folkman J., 2006).

1.1.2.1. Anjiyogenik Aktivatörler ve İnhibitörler

Anjiyogenez, pek çok proanjiyogenik ve antianjiyogenik molekülün düzenlediği oldukça kompleks ve dinamik bir süreçtir. Proanjiyogenik faktörler ile antianjiyogenik faktörler arasında olan dengenin proanjiyogenik faktörler lehine değişmesi sonucu yeni damar oluşumu meydana gelir. Anjiyogenezi inhibe eden ve uyaran faktörler Çizelge 1.2.'de gösterilmiştir.

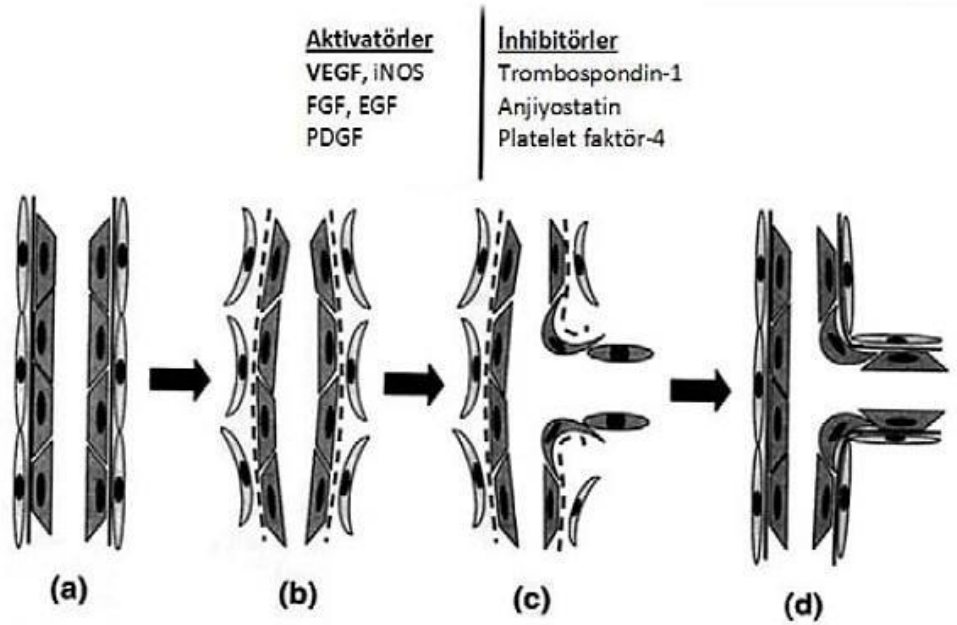
Çizelge 1.2. Anjiyogenez Modülatörleri (Vasudev ve Reynolds, 2014)

Anjiyogenezi İnhibe Edenler	Anjiyogenezi Uyaranlar
Trombospondin	Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF)
Anjiostatin (plasminojen kısmı)	Bazik Fibroblast büyüme faktörü (bFGF)
Endostatin (kollajen XVIII kısmı)	Asid Fibroblast büyüme faktörü (sFGF)
AaAt (antithrombin III kısmı)	Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)
Vazostatin	Hepatosit büyüme faktörü
Troponin 1	İnsulin-benzeri büyüme faktörü
Prolaktin	Epidermal büyüme faktörü (EGF)
Anjiopoetin-2	TGF- α
Alfa interferon	TGF- β
İnterlökin 12	TNF- α
Gamma interferon	PIGF
Fibronektin	Anjiopoetin-1
Metalloproteinaz doku inhibitörleri	Anjiogenin
Plazminojen aktivatör inhibitör 1 (PAI-1)	Pleotrofin
Platelet faktör 4 (PF 4)	Leptin
Pigment epitelial hücre faktörü	Granulosit-koloni uyarıcı faktör (G-CSF)
Retinoik asit	Proliferin
Dopamin	İnterlökin 8
2-Metoksi-östradiol	

Bu düzenleyicilerle birlikte ayrıca hipoksi, düşük pH, inflamasyon, hipoglisemi, tümör baskılayıcı genlerin delesyonu ve onkogen aktivasyonu anjiyogenez oluşumunu etkileyen faktörler arasındadır (Fidler ve ark., 2001).

1.1.2.2. Anjiogenez Oluşum Basamakları

Anjiogenez oluşum basamakları dört aşamadan meydana gelir. İlk olarak endotel hücrelerin kan damarını çevreleyen bazal laminada bir açıklık oluşturması gerekmektedir; bu sebeple bazal membran ve ekstrasellüler matriksin yıkılması için proteazlar üretilir. Aktif endotel hücrelerden ve stromadan salınan matriks metalloproteinazları (MMP) bu yıkımda görev alır. Endotel hücrelerinin sinyal kaynağına doğru hareket etmeleri ikinci aşamadır. Bunun hemen ardından endotel proliferasyonu görülür. Son aşama ise tüpsü yapının oluşmasıdır. Proliferasyon sona erer ve hücreler birbirlerine sıkıca tutunup morfolojilerini değiştirerek bir lümen oluştururlar. Vasküler düz kas hücrelerin ve perisitlerin endotelyuma katılması ve yeni bazal membranın sentezlenmesiyle anjiogenez oluşumu sona erer (Schulz WA, 2005).



Şekil 1.5. Anjiyogenez oluşum basamakları (Liao D ve Johnson, 2007) (a) endotel hücre (koyu gri), bazal lamina (siyah çizgi) ve perisit (açık gri) birlikteliğindeki normal damar yapısı. (b) bazal membran yıkımının ardından perisit ayrılması. (c) anjiyogenik uyarana doğru endotelial hücrelerin göçü. (d) bazal membranın konumlanması, perisit tutunması ve lümen oluşumu.

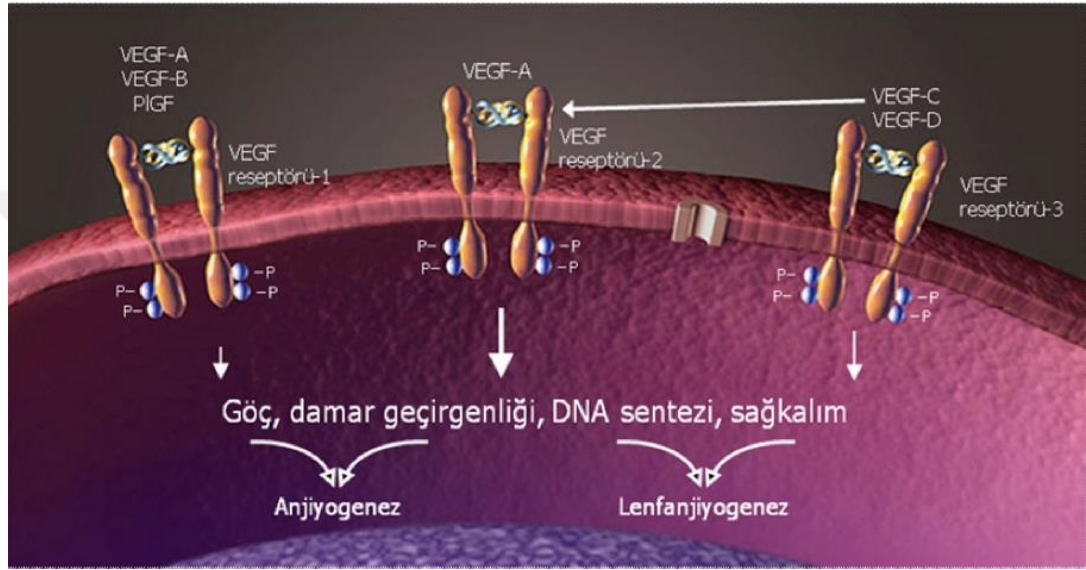
Perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerinin komşu oldukları endotel hücreleri için VEGF kaynağı oluşturdukları düşünülmektedir. Tümör damarlarını saran perisitler ve vasküler düz kas hücreleriyle endotel ilişkisinin kesinleşmesi hem tümör anjiyogenezinin hem de doğru antianjiyogenik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkıda bulunabilecektir.

1.1.2.3. VEGF ve VEGFR Ailesi

VEGF, platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) ailesine ait bir proteindir ve altıncı kromozomun 6p12 lokasyonunda bulunmaktadır. Vasküler geçirgenliği arttırma, anjiyogenezi ve vaskülogenezisi uyarma, endotel hücre proliferasyonunu arttırma ve apoptozisi engelleme gibi görevleri bulunmaktadır (NCBI, 2017).

VEGF, endotel hücrelerinin aktivasyonunda esas rol oynamaktadır. VEGF molekül ailesi ligandları (VEGF-A (VEGF), VEGF-B, -C, -D, -E) ve plasental

büyüme faktörü PlGF-1 ve PlGF-2 endotel hücreleri üzerinde bulunan reseptörlerine bağlanırlar. Üç tane VEGF reseptörü tanımlanmıştır. Bunlar VEGF ligandlarını bağlar (Bergsland E, Dickler, 2004). VEGFR-2 anjiyogenez ve lenfanjiyogenezden, VEGFR-3 ise lenfanjiyogenezden sorumludur (Ferrara ve Davis-Smyth, 1997).



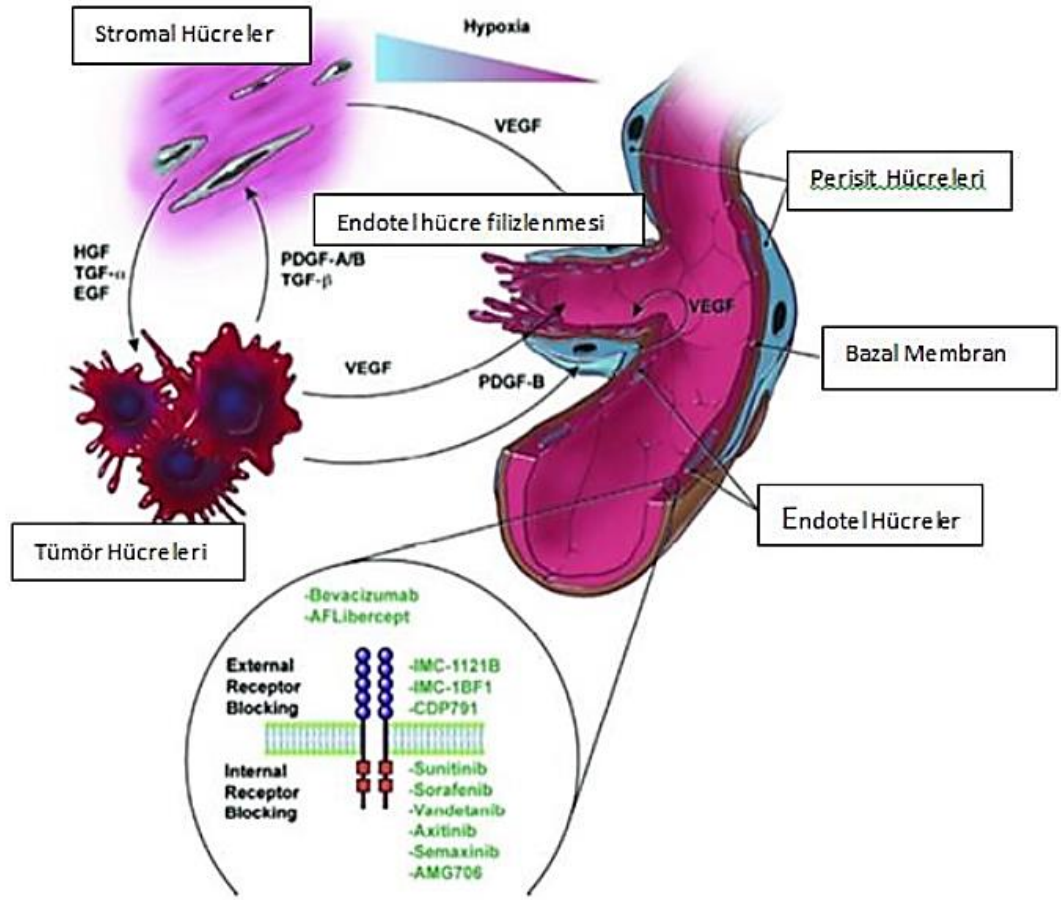
Şekil 1.6. VEGF reseptörleri (Ferrara N., 2003)

Bağlı olmayan-VEGF'nin Bevasizumab direncinde rolü olduğu düşünülmektedir fakat bu konu kesinlik taşımamaktadır. Öncelikle kolorektal kanser olmak üzere bu ilişki bazı tümörlerde gösterilememiştir (Akbulut ve Aktaş, 2014). Brauer ve ark.'larının yaptığı çalışmada, VEGF sinyal yolağında bulunan genler olan VEGF-bağımlı genler (VBG)'in dokuda mikrodizinin analizi ile incelenmesi fare tümör modellerinde ve bazı klinik çalışmalardan elde edilen hastaların doku örneklerinde bu genlerin ifadesindeki artış ile anti-VEGF tedavilerden fayda sağlanabileceği gösterilmiştir (Brauer ve ark., 2013).

1.1.2.4. Perisitler

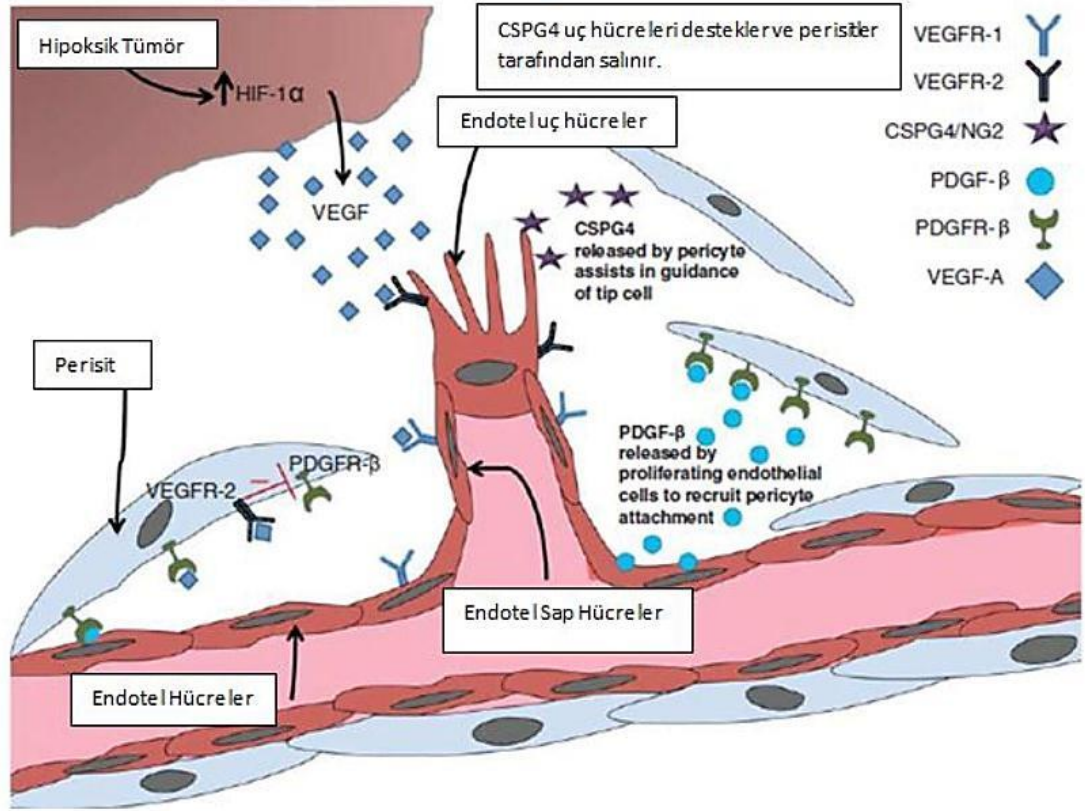
Perisitler, kapiller damarların çevresinde bazal laminanın dışında, onları çevreleyen mezankimal hücrelerdir. Endotel bazal laminasıyla kendilerine ait eksternal laminaları kaynaşır. Perisitler ikiye ayrılan bazal membranın içinde bulunur ve endotel hücreleri ile yakın temas halindedirler. Endotel hücrelerini fizyolojik ve mekanik açıdan desteklerler. Perisitler kontraktıl özelliğe sahiptirler ve biyolojik olarak aktif maddeleri sentez edebilirler. Kan akımının düzenlenmesi, endotel proliferasyonu, anjiogenez süreçlerine katılabildikleri, perisit yokluğunda ise endotel hiperplazisi, anormal anjiogenez ve artan kan-beyin bariyeri geçirgenliğine sebep olduğu gösterilmiştir (Armulik ve ark., 2010).

Tümör hücreleri, endotel hücreleri, perisitler ve stroma hücreleri arasındaki intraselüler sinyalizasyon Şekil 1.7.'de gösterilmiştir. A1 ve Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu VEGF tarafından indüklenir ve böylelikle fosfoinositid 3- kinaz/Akt sinyal yolu aktive olur. Ayrıca prostasiklini ve nitroz oksidi uyararak, fokal adezyon kinaz tirozin fosforilasyonunu artırarak endotel hücreleri için antiapoptotik rol oynar (Alvarez ve ark., 2011). Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF); timidini timine defosforilleyerek serbest radikal oluşumunu artırır ve böylelikle anjiogenez genlerini aktive eder (Gasparini G, Harris, 1995). Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β); endotel hücreleri üzerinde kemotaktik etki gösterir (Breier ve ark., 2002).



Şekil 1.7. Tümör hücreleri, endotel hücreleri, perisitler ve stroma hücreleri arasındaki intraselüler sinyalizasyon (Alvarez ve ark., 2011)

Normal dokuda perisitler, durgun haldeki endotele parakrin destek sinyalleri sağlarlar. Örneğin; perisitler tarafından salgılanan Ang-1 anti-proliferatif sinyaller taşır. Ang-1 de endotel hücrelerin yüzeyinde eksprese olan Tie-2 reseptörüne bağlanır. Bazı perisitler ayrıca düşük seviyede VEGF üretir (Gaengel ve ark., 2009). Perisitler tarafından salınan CSPG4/ NG2 (Kondroitin Sülfat Proteoglikanları/ NG2) anjiogenez sürecinde tüpsü yapı oluşturmayı sağlayan endotel uç hücrelerini hipoksik tümör yönüne yönlendirir (Şekil 1.8.). Bu nedenle perisitler tümör anjiogenezinin erken döneminde damar destabilizasyonunun başlatılmasında ve endotel uç hücrelerinin oluşumunda ve göçünde önemli bir basamakta rol oynar (Volz ve ark., 2015).



Şekil 1.8. Tümör neoanjiogenezinde perisit regülasyonu (Volz ve ark., 2015)

Son yıllarda yapılan dikkatli mikroskopik çalışmalar perisitlerin, gevşek de olsa, tümörlerin pek çoğunda görülen yeni damar oluşumuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bergers ve ark., 2010). Hem endotel hem perisitleri hedefleyen bazı çalışmalar yapılmıştır. Tümör vaskülatöründe perisit ve endotel hücrelerin kinaz inhibitörleriyle ya da tek başına perisitler ile hedeflenmesinin tümör anjiogenezi ve büyümesini engellediği gösterilmiştir (Lu ve ark., 2007). Az sayıdaki klinik çalışma düşük perisit yoğunluğunun daha çok kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir (O’Keeffe ve ark., 2008). Perisitlerin bozulmasının ise metastaz artışını desteklediği bildirilmiştir (Xian ve ark., 2006).

1.1.2.5. Monoklonal Antikorlar

Kanserde immünoterapi yöntemlerinden olan monoklonal antikorların (mAb) etkinliği üç temel mekanizmaya dayanır.

Bu mekanizmalar;

- 1) Kanser hücrelerinin bölünme ve anjiyogeneze kullandıkları sinyal yollarını harekete geçiren reseptörlerin antikor bağlanmasıyla inhibe edilmesini,
- 2) Antikora bağlı hücrel sitotoksiteyi (ADCC) ve
- 3) Kompleman aktivasyonu ile komplemana bağlı sitotoksiteyi (CDC) içerirler (Elloumi ve ark. 2012).

Günümüzde ilaç olarak üretilen ve kanser tedavisinde kullanılan başlıca monoklonal antikorlar arasında Trastuzumab, Setuksimab, Rituximab, Alemtuzumab ve Bevacizumab yer almaktadır. Hedefledikleri başlıca kanserler kolon kanseri, meme kanseri ve çeşitli kan kanserleridir (Elloumi ve ark., 2012).

Geleneksel tedavinin aksine monoklonal antikorlar, antikor aracılığıyla tümör antijenlerini hedeflerler ve bu sebeple hem toksisiteyi azdır hem de spesifiktirler. Buna karşın monoklonal antikorların çeşitli yan etkileri olabilmektedir. Ateş, yorgunluk, baş ve kas ağrıları, nefes alma zorluğu ve kanamaların artması buna örnek olarak verilebilir (Elloumi ve ark, 2012).

Çizelge 1.3. Günümüzde kolon kanseri tedavisi için onaylı monoklonal antikörler (Vacchelli ve ark., 2013)

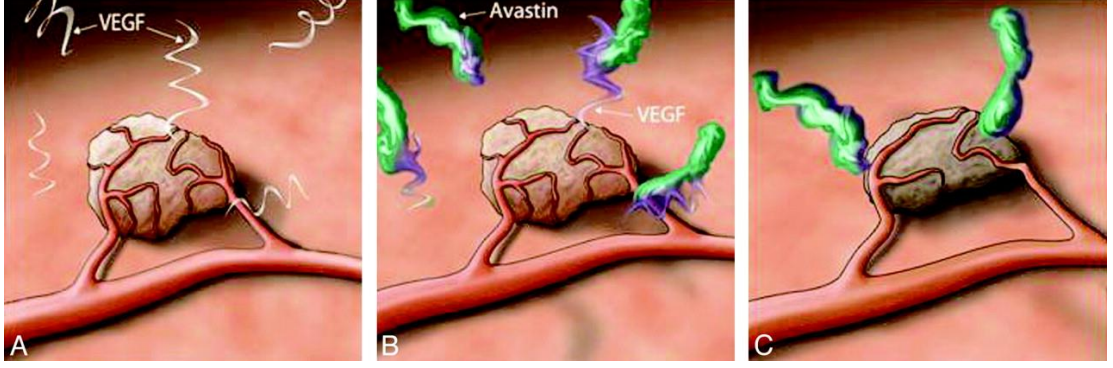
Hedef Antijen	Monoklonal Antikör	Antikörün Tipi	Kullanıldığı başlıca kanser türleri
Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)	Setuksimab	Kimerik, IgG1	Metastatik kolorektal kanser ve skuamöz hücre kanserler
EGFR	Panitumumab	İnsan, IgG2	Metastatik kolorektal kanser
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	Bevasizumab	Humanize, IgG1	Metastatik kolorektal kanser, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve over kanser

1.1.2.6. Bevasizumab

Bevasizumab IgG1 izotipinde olan humanize bir monoklonal antikördür. Bu antikör anjiogenezi VEGFA'ya bağlanarak inhibe eder (Los ve ark., 2007). Metastatik kolorektal kanserli hastalarda kemoterapiyle birlikte uygulanan Bevasizumab sağ kalım oranını anlamlı derecede artırmıştır (Hurwitz ve ark., 2004).

Klinik çalışmalarda oxaliplatinin ve irinotekanın bevasizumab ve diğer anti-anjiyojenik ilaçlarla kombine edilerek test edilmesi önerilmektedir. Bevasizumab klinik kullanımda metastatik kolorektal kanser ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri için 2004 yılından itibaren, over kanseri için 2011 yılından beri Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylıdır (Vacchelli E, Eggermont A, Galon J, 2013). Bevasizumab tedavisinde en fazla rastlanılan toksisite reverzibl hipertansiyon ve proteinüridir (Wolpin ve Mayer, 2008).

Kolon kanseri ve diğer kanser türlerinde bevasizumab kullanıldığında ilk başta yanıt elde edilen hastalarda zamanla tümör yanıtında bir duraklama ve ardından tümörde büyüme gözlenmektedir. Bu durum 'klinik ilaç direnci' olarak isimlendirilir. Fakat günümüzde bevasizumab için kesin olarak tanımlanabilen ilaç direnç mekanizmaları yoktur.



Şekil 1.9. Bevasizumab mekanizmasının şematik gösterimi. A, VEGF proteini ile çevrili hipervasküler bir tümör. B, bevacizumab bileşiği serbest VEGF'ye bağlanır ve serbest VEGF konsantrasyonunu düşürür. C, Mevcut VEGF'nin azaltılması tümörün kan akımının azalmasına ve tümörün küçülmesine neden olur (Mukherji, S, 2010).

Antianjiyogenik ajanlara direnç gelişiminde hipoksi ve HIF bağımlı cevapların önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Mancuso ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada, tek ajanlı antianjiyogenik tedavi ile uyarılmış hipoksinin diğer proanjiyogenik faktörleri arttırmak suretiyle ilaca direnç gelişimi meydana getirdiği bildirilmiştir (Mancuso ve ark., 2006).

Bevasizumab ilacına karşı antikor cevabı gelişip gelişmediği ve gelişebilecek bu antikor cevabının ilaç direnci üzerine etkisi kesin olarak bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmada vitreus içine uygulanan bevasizumaba karşı nötralizan antikorlar gelişebildiği gösterilmiştir. (Forooghian ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında amacımız kolorektal kanserli hastaların tümör dokusundaki perisit varlığının bevasizumab tedavisinin etkinliğindeki rolünü araştırmaktır. Elde edilen sonuçlara göre hastaya alternatif tedavi seçenekleri (kanser aşıları, immünoterapi, gen terapisi vb.) sunulabilecektir.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hasta özellikleri

Bu araştırmada, Ankara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde uygun parafin blokları bulunan ölçülebilir lezyonu olan ve rutin kemoterapi protokolüne ek olarak en az 2 ay bevasizumab kullanmış olan ve radyolojik olarak tedavi yanıtı değerlendirilmiş olan, metastatik veya nüks 50 kolorektal kanserli hasta dahil edilmiştir. Çalışma retrospektif olarak planlanmış olup A.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji kliniğinde tedavi ve takipleri olan hastalar alınmıştır. Etik kurul onayını takiben hastaların Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan parafinize tümör doku örnekleri kullanılmıştır. Etik kurul raporu Ek.1’de sunulmaktadır.

2.2 Deneylerde kullanılan malzeme ve gereçler

2.1.1. Kullanılan Gereçler

- Santrifüj cihazı
- -80°C soğutucu
- -20°C soğutucu
- Hassas tartı
- Santrifüj tüpleri
- Otomatik pipet
- Kuru ısı bloğu
- Elektroforez cihazı
- Jel görüntüleme cihazı
- Spektrofotometre
- PCR cihazı (Thermal Cycler)
- qPCR cihazı

2.1.2. Kullanılan Kitler

- Parafin Bloktan RNA İzolasyon Kiti (Qiagen, RNeasy FFPE Kit)
- cDNA Sentez Kiti (Solis Biodyne, FIREScript cDNA Synthesis KIT)
- qPCR Mix (Solis Biodyne, 5x Hot FirePol Probe Mix Plus)

2.3. Primer-Prob Tasarımı

Tümör anjiyogenez sürecinde önemli rolleri olan Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü-A (VEGFA), Kondroitin Sülfat Proteoglikanları (CSPG4) ve referans geni olarak insan Beta-aktin (HBA) için EZ-PZR (eş zamanlı- polimeraz zincir reaksiyonu) deneyinde kullanılmak üzere ileri ve geri primer ve FAM-TAMRA ile boyalı prob tasarımları yapılmıştır.

Primer ve prob tasarımı için Primer3web (version 4.0.0) programı kullanılmıştır(Koressaar ve Remm 2007). Dizaynı yapılan primer ve problemlerin istenilen gene spesifik olup olmadığının kontrolü için Primer-BLAST(Ye ve ark., 2012),NCBI Blast (Altschul ve ark., 1990) primerlerin ve probun kendileri veya birbirleriyle olan homodimer ve heterodimer bağlanmaların hangi düzeyde olduğunun kontrolü için ise IDT OligoAnalyzer 3.1 (Owczarzy ve ark., 2008) ve PerlPrimer (Marshall, 2004) programları kullanılmıştır. Çizelge 2.1’de bu programlarla tasarlanan primer ve prob dizileri gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Dizaynı yapılan primer ve prob dizileri

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Prob
HBA	5'-CCCTGGAGAAGAGCTACGAG-3'	5'-AAGGTAGTTTCGTGGATGCC-3'	5'-CCAGCCTTCCTTCCTGGGCA-3'
VEGF-A	5'-TACTGCCATCCAATCGAGAC-3'	5'-GAGGAGTCCAACATCACCAT-3'	5'- ATGCGGGGGCTGCTGCAATGA-3'
CSPG4	5'-TGACCCTGACTATGTTGGCC-3'	5'-GCAGGTCTATGTCGGTCAGA-3'	5'-CCGCGGCTTCCTTCTCGGTGA-3'

2.4. Parafine Gömülü Doku Örneklerinin Elde Edilmesi

Hastalara ait parafin bloklardan mikrotom cihazı (Thermo Fisher Scientific Shandon Finesse) kullanılarak 8 mikronluk 5'er kesit alınarak Eppendorf tüplere konuldu ve daha sonra RNA izolasyonuna geçildi.

2.5. RNA İzolasyonu

Eppendorf tüplere alınan parafin doku örneklerinden RNA izolasyonu yapmak için ticari kit (Qiagen RNeasy FFPE Kit, Almanya) kullanılmıştır. Kısaca, parafini uzaklaştırmak için 1ml ksilen tüplere eklendi v 18000rpm'de 2dk santrifüj edildi. Pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice alınıp atıldı. Sonrasında eppendorflardaki pelet üzerine 1 ml etanol eklenip vortexlendi. 18000rpm'de 2dk santrifüj edildi. Pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice alınıp atıldı. Etanolü tamamen uzaklaştırmak için Eppendorf tüpler kapakları açık bırakılarak oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Daha sonra 150 µl PKD buffer ve 10 µl proteinaz K eklenerek önce 56°C de 15 dakika sonra 80 °C de 15 dakika inkübe edildi.

Sonrasında tüpler buz üzerine alınarak 3 dakika inkübe edildi. Örnekler 13500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Peletlere dokunmadan süpernatant yeni bir eppendorf tüpe alındı. 25 µl DNase Booster Buffer ve 10 µl DNase I solüsyonu eklenip, tüpler ters düz edilerek karıştırıldı. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Eppendorflara 320 µl RBC buffer ve 720 µl etanol eklenerek pipetaj yapılarak karıştırıldı. Tüm örnekler RNeasy Minelute spin kolonlara aktarıldı. 10000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Kolon membranından alt kısma geçen sıvı atıldı. Spin kolonuna 500 µl RPE yıkama tamponu eklenerek 15 sn santrifüj yapıp alt kısma geçen sıvı atıldı. Sonrasında yine 500 µl RPE yıkama tamponu eklenerek 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip, toplama tüpü atıldı. Etanol kalıntısını tamamen uzaklaştırmak için kolonlar yeni toplama tüplerine alınarak hiçbir şey eklenmeden 13000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Kolonlar yeni eppendorf tüplere konulup 20 µl RNaz içermeyen su eklenerek 13000 rpm'de 1 dakika çevrilerek, membrana bağlı bulunan RNA'nın elüsyonu sağlandı.

2.6. RNA Konsantrasyonu ve Kalitesi Tayini

İzolasyonu yapılan RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonları spektrofotometre cihazı (Beckman Coulter, DU730 Life Science UV/Vis Spektrofotometre) ile ölçüldü. RNA saflıkları, $2.1 \geq \lambda_{260}/\lambda_{280} \geq 1.8$ arası olan örnekler çalışmaya alındı. Ayrıca RNA örnekleri %2 lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

2.7. cDNA Sentezi

Genlerin mRNA ekspresyonlarını saptayabilmek için total RNA'lar komplementer DNA'ya (cDNA) çevrildi. Bunun için de RNA'sı izole edilen her bir örnekten 250 ng RNA alınacak şekilde hesaplama yapıldıktan sonra ticari olarak satın alınan kit (Solis Biodyne FIREScript cDNA Synthesis KIT, Estonya) protokolüne uygun bir şekilde genomik DNA eliminasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Kısaca, iki basamaktan oluşan kit protokolünün ilk basamağında RNA

örnekleri son hacmi 14 µl olacak şekilde RNaz içermeyen su ile tamamlandı ve her bir RNA örneği için random primerler ve oligo-dT primerlerin bulunduğu karışımdan 1'er µl eklendi. Sonrasında örnekler 65°C'de 5 dk inkübe edilip, ardından 5dk buz üzerinde bekletildi. Protokolün ikinci basamağında ise, RT buffer with DTT solüsyonundan 2 µl , dNTP'den 0.5 µl, FIREScript RT solüsyonundan 1 µl ve RNase inhibitörden 0.5 µl eklenip bir karışım hazırlandı. Bu karışım, inkübe edilen RNA örneklerinin üzerine eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlandı ve 25 °C 10 dk, 50 °C 60 dk ve 85 °C 5 dk inkübe edildi. Bu adım sonunda komplementer cDNA'nın sentezi tamamlanmıştır. Reaksiyon sonunda hacmi 20 µl olan cDNA örnekleri, RNaz-DNaz içermeyen su (Solis Biodyne, Estonya) ile 50 µl son hacime tamamlandı.

2.8. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR)

Sentezlenen cDNA örneklerinden optimizasyon sonucu en iyi sonuç alınan 3 µl hacimde örnekler kullanıldı. Doksan altı kuyucuklu plateler ile çalışılacak her bir gen için (HBA, VEGFA ve CSPG4) her bir primer ve FAM-TAMRA boyalı Taqman problemlerinden (10 pmol/µl) 0,3'er µl, qPCR Mix (Solis Biodyne 5x Hot FirePol Probe Mix Plus (No Rox), Estonya) 2 µl ve son hacmi 10 µl'ye tamamlamak için 4,1 µl RNaz-DNaz içermeyen su (Qiagen, Almanya) eklendi. Daha sonra Çizelge 2.2'da gösterilen reaksiyon koşullarında amplifikasyon yapıp, qPCR cihazında (Biorad C1000 Thermal Cycler CFX96 RealTime System) ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu sonunda elde edilen Cq değerleri ve amplifikasyon eğrileri kaydedildi.

Çizelge 2.2. qPZR reaksiyon koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Polimeraz Aktivasyonu	95 °C	15 dk	1
Denatürasyon	95 °C	20 s	40
Bağlanma- Uzama	60 °C	60 s	
Soğuma	37 °C	10 dk	1

2.9. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Kontrolü

Kantitatif PZR ile elde edilen ürünlerin amplifiye olup olmadıkları, %2’lik agaroz jelde yürütülerek tespit edilmiştir. Bunun için 50 bp DNA ladder (Bioron, 304007) ve 5X’lik yükleme boyası (Promega, M791A) kullanılarak jelde yürütülen örnekler daha sonra jel görüntüleme cihazında (Bio-Rad Gel Doc XR, ABD) kaydedilmiştir.

2.10. İstatistik

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 20 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 10.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanılmıştır. Değişkenler ortalama±standart sapma ile yüzde ve frekans değerleri kullanılmıştır. Ayrıca parametrik testlerin ön şartlarından varyansların homojenliği “Levene” testi ile kontrol edildi. Normallik varsayımına ise “Shapiro-Wilk” testi ile bakıldı. İki grup arasındaki farklılıklar değerlendirilmek istendiğinde parametrik test ön şartlarını sağladığı durumda “Student’s t Test”; sağlamadığında ise “Mann Whitney–U testi” kullanıldı. Üç ve daha fazla grup karşılaştırması için Tek Yönlü Varyans Analizi ve çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey HSD testi ile sağlanmadığında ise Kruskal Wallis ve çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni-Dunn testi kullanılmıştır.

Sağkalım analizi Kaplan Meier yöntemiyle, faktörlerin sağkalım sürelerinin değişkenlerin kategorileri arasında karşılaştırılması ise Log Rank Mantel Cox testiyle değerlendirilmiştir. Çalışmada bağımsız değişkenler ve bağımlı değişken (Sağkalım Durumu) arasındaki ilişkinin modeli de ortaya konmak için Cox Regresyon analizi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler Fisher's Exact Test ve Ki Kare testi ile analiz edilmiştir.

İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.



3. BULGULAR

3.1. Hastaların Özellikleri

Çalışmaya yaşları 34-76 arasında değişen toplam 50 hasta dahil edilmiştir. Hastaların cinsiyet, yaş, primer tümör lokalizasyonu, tanıda metastaz, nüks, metastaz bölgeleri, KRAS mutasyon durumu, tanıda CEA düzeyi, Bevasizumab'ın uygulandığı basamak, Bevasizumab ile birlikte uygulanan kemoterapi şemaları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hastaların özellikleri

Parametre	N (%)
Kadın/Erkek	16/34
Medyan yaş (dağılım)	59 (34-76)
<50	34
>50	89
Primer tümör lokalizasyonu	
Sağ kolon	15
Sol kolon	35
Primer tümör lokalizasyonu	
Kolon	30
Rektum	20
Tanıda metastaz	34
Nüks	16
Metastaz bölgeleri	
Karaciğer	40
Akciğer	14
Lenf nodu ve yumuşak doku	14
Periton-omentum-mezenter	9
KRAS mutasyon durumu	
Mutant	23
Wild tip	20
Bilinmeyen	7
Tanıda CEA düzeyi	
Yüksek	29
Normal	21
Bevasizumabın uygulandığı basamak	
1. Basamak	39
2. Basamak	5
3. Basamak	4
4. Basamak	2

Çizelge 3.1. Devam. Hastaların özellikleri

Bevasizumab ile birlikte uygulanan kemoterapi şemaları	
Oksaliptatin tabanlı	4 (8,0)
İrinotekan tabanlı	43 (86,0)
Floropirimidin	3 (6,0)

3.2. Tedavi sonuçları

Hastaların tedavi sonuçları Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Tedavi sonuçları (Ortalama ± Standart Hata)

Parametre	
Medyan Bevasizumab kür sayısı (dağılım)	4 (2-18)
Objektif Yanıt oranı	%31.1
Medyan yanıt süresi, Ay (%95 GA)	5,6±0,4 (4,7–6,5)
Medyan PFS süresi, Ay (%95 GA)	8,72±0,8 (7,1 – 10,3)
Medyan OS süresi, Ay (%95 GA)	17,0±2,8 (11,4 – 12,6)

PFS: progresyonsuz sağkalım; OS: genel sağkalım; GA: Güven aralığı

3.3. Hasta örneklerinde kantitatif PZR sonuçları

Hastaların qPCR sonuçları çizelge 3.3.'te gösterilmiştir. Kantitatif PZR sırasında her bir hasta üç tekrarlı yapıldığı için elde edilen Cq değerlerinin aritmetik ortalamaları alınmış ve bu değerlerin $\Delta\Delta Ct$ metodu (yaklaşım methodu) ile insan β -aktin geni (HBA) referans alınıp normalize edilerek hesaplanmıştır.

Çizelge 3.3. Hasta örneklerinde kantitatif PZR sonuçları

Hasta No	Ortalama HBA Cq	Standart hata	Ortalama CSPG4 Cq	Standart hata	Ortalama $2^{-\delta\text{CSPG4Cq}}$	Standart hata	Ortalama VEGFA Cq	Standart hata	Ortalama $2^{-\delta\text{VEGFA Cq}}$	Standart hata
1	32,224	0,088					31,559	0,196	1,6106	0,218
2	31,858	0,304					32,306	0,244	0,756	0,136
3	30,627	0,400	37,0287	1,4245	0,0119	0,0024	32,011	0,507	0,4329	0,146
4	28,334	0,048					28,658	0,166	0,8068	0,087
5	33,714	0,441	36,0469	2,2134	0,1979	0,0143	34,054	0,428	0,8546	0,227
6	26,980	0,360					26,548	0,169	1,3667	0,149
7	34,758	0,752					33,123	2,206	7,5107	6,836
8	32,994	0,513					34,387	0,615	0,4498	0,174
9	27,840	0,419					28,539	0,283	0,4397	0,123
10	27,166	0,073					27,442	0,229	0,8497	0,140
11	28,172	0,098					28,159	0,478	1,1175	0,342
12	32,487	0,584					33,335	0,218	0,5692	0,087
13	33,915	0,385					34,582	1,362	0,9349	0,689
14	28,571	0,675					30,595	0,407	0,2669	0,079
15	37,153	1,946								
16	37,000	0,938					35,468	0,782	2,8907	0,247
17	36,176	0,291					28,060	0,468	278,146	1,214
18	31,767	0,399					32,039	0,109	0,8344	0,064
19	35,826	0,200					38,956	2,120	0,1145	0,012
20	32,507	1,110					34,874	0,319	0,2043	0,048
21	28,910	0,401					29,563	0,153	0,6425	0,064
22	32,273	0,407					32,817	0,315	0,7191	0,167
23	31,424	0,0901					31,472	0,299	1,0058	0,203
24	28,755	0,333					28,340	0,726	1,6431	0,596
25	35,195	0,284					35,230	0,115	0,9757	0,078
26	34,483	0,210					36,369	1,028	0,3414	0,209
27	29,615	0,298					30,749	0,272	0,4726	0,079
28	27,9185	0,309	35,683	1,0234	0,0046	0,0002	28,1778	0,074	0,8386	0,044
29	31,990	4,286								
30	31,177	0,345					32,505	0,240	0,4097	0,064
31	30,751	0,090					31,775	0,028	0,4913	0,009
32	29,732	0,551					30,580	0,781	0,7069	0,287
33	30,389	0,621					33,991	0,711	0,1001	0,035
34	29,9605	0,385	35,0095	1,1782	0,0302	0,0012	31,0027	0,153	0,491	0,053
35	29,385	0,026					30,597	0,157	0,435	0,044
36	29,2544	0,766	34,4922	1,2412	0,0264	0,0013	33,7382	0,098	0,0448	0,003
37	29,6718	0,459	34,0852	1,2682	0,0469	0,0012	33,5852	0,366	0,0704	0,016
38	30,775	0,493					35	0,369	0,055	0,014
39	30,956	0,933					34,909	0,873	0,0647	0,014

Çizelge 3.3. Devam. Hasta örneklerinde kantitatif PZR sonuçları

40	28,642	0,330					30,600	0,195	0,2615	0,032
41	26,941	1,461					30,834	0,532	0,0768	0,027
42	25,890	0,373					28,557	0,284	0,1633	0,029
43	28,692	1,025					31,347	0,817	0,2042	0,079
44	29,1368	0,795	33,0715		0,0655	0,0014	32,4833	0,3347	0,1043	0,026
45	29,151	0,653					31,895	0,148	0,1507	0,015
46	29,536	0,338					32,740	0,372	0,1163	0,030
47	26,978	0,726					27,133	0,015	0,8991	0,009
48	29,425	0,119								
49	28,941	0,664								
50	29,602	0,931								

3.4. Kantitatif PZR bulgularına göre tedavi sonuçları

VEGFA ve CSPG4 için Objektif Yanıt Oranı Çizelge 3.4.'te gösterilmiştir. Hastaların genel sağkalım (OS) ve progresyonsuz sağkalımları (PFS) HBA, VEGFA ve CSPG4 genlerinin ifadesine göre Kaplan Meier yöntemiyle analiz edilmiş ve Şekil 3.1. , Şekil 3.2. , Şekil 3.3. ve Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. VEGFA ve CSPG4 için Objektif Yanıt Oranı

	Objektif yanıt oranı	P
VEGFA_düşük(VEGF/HBA<0.5)	%39.1	0.235
VEGFA_yüksek(VEGF/HBA>0.5)	%22.7	
CSPG4_pozitif	%36.6	0.054
CSPG4_negatif	%0	

VEGFA_düşük ile VEGFA_yüksek ifade edilen hastalar arasında objektif yanıt oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p= 0,235).

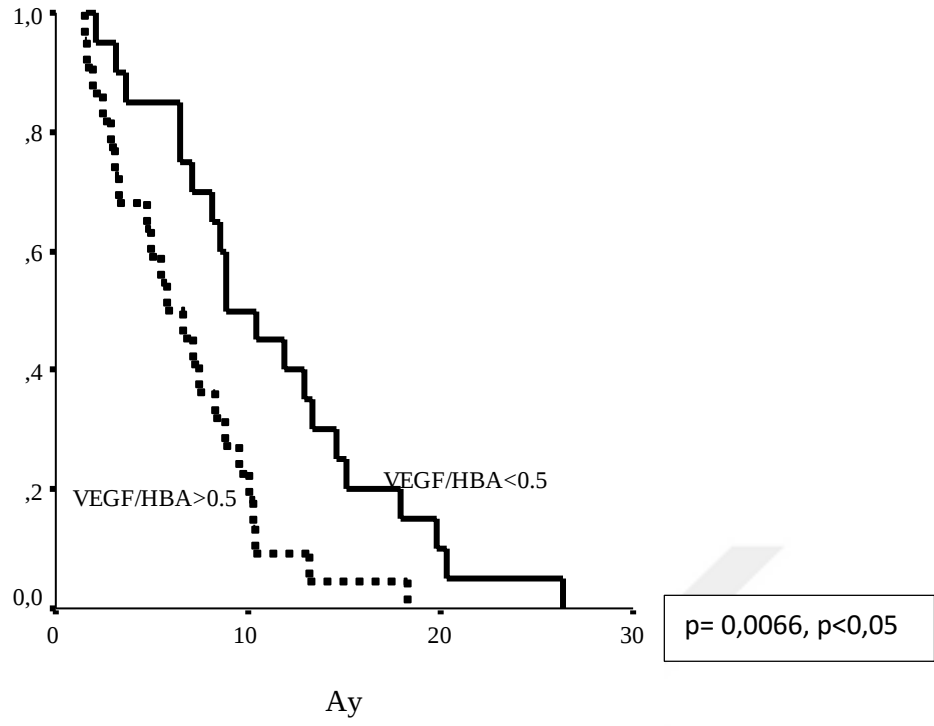
CSPG4_pozitif ile CSPG4_negatif ifade edilen hastalar arasında objektif yanıt oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p=0,054$).

Şekil 3.1.'e göre VEGF/HBA >0.5 olan grubun progresyonsuz sağkalım süresi VEGF/HBA <0.5 olan gruba göre daha azdır ($p= 0,0066$, $p< 0,05$).

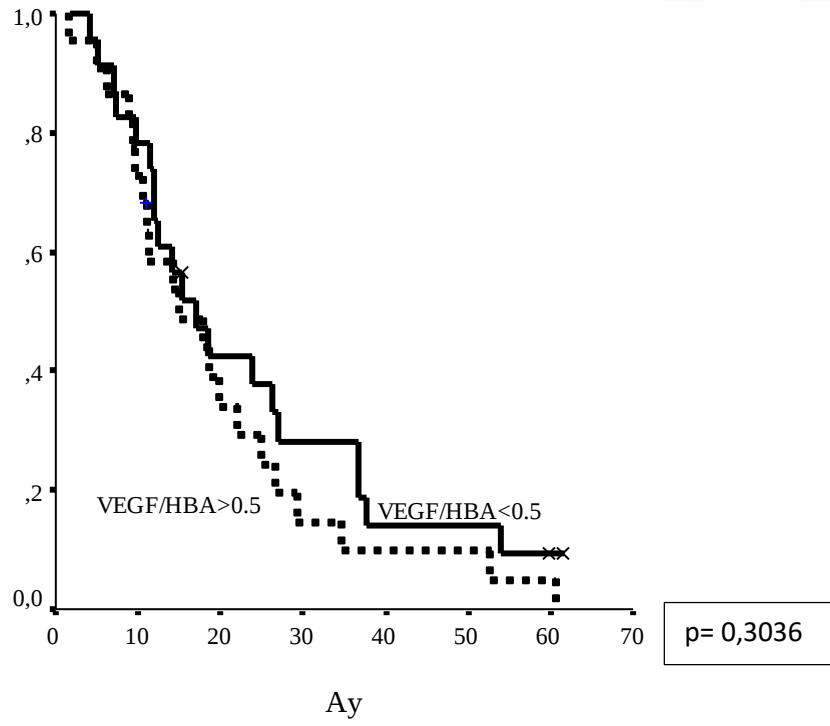
Şekil 3.2.'e göre VEGF/HBA >0.5 olan grubun genel sağkalım süresi VEGF/HBA <0.5 olan gruba göre daha az olmakla birlikte çok büyük farklılıklar bulunmamaktadır.

Şekil 3.3.'e göre CSPG4 ifadesi pozitif olan grubun genel sağkalım süresi CSPG4 ifadesi negatif olan gruba göre daha iyi görünmekle birlikte, anlamlı değildir ($p= 0,5038$).

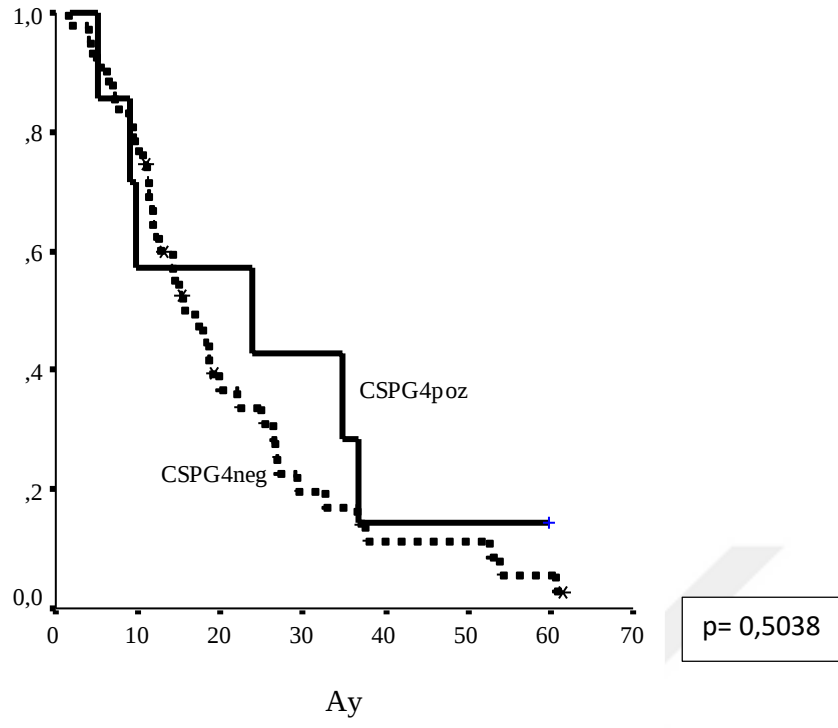
Şekil 3.4.'e göre CSPG4 ifadesi pozitif olan grubun progresyonsuz sağkalım süresi CSPG4 negatif olan gruba göre daha iyi görünmekle birlikte çok büyük farklılıklar bulunmamaktadır.



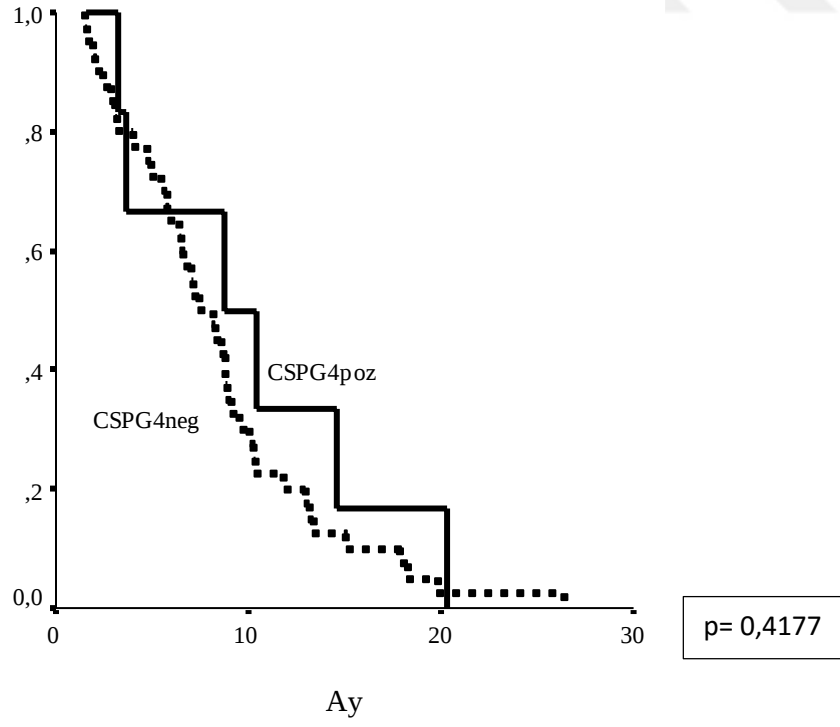
Şekil 3.1. VEGFA/HBA 'ya göre Progresyonsuz Sağkalım (PFS) Grafiği



Şekil 3.2. VEGFA/HBA 'ya göre Genel Sağkalım (OS) Grafiği



Şekil 3.3. CSPG4'e Göre Genel Sağkalım (OS) Grafiği



Şekil 3.4. CSPG4'e Göre Progresyonsuz Sağkalım (PFS) Grafiği

3.5. Tek Değişkenli Analizde Progresyonsuz Sağkalımı (PFS) Etkileyen Faktörler

Tek değişkenli analizde PFS'yi etkileyen faktörler Çizelge 3.5.'te gösterilmiştir. Buna göre ;

Primer tümör lokalizasyonu kategorileri arasında (Sağ kolon ile Sol kolon) arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,5697$).

Primer tümör lokalizasyonu kategorileri arasında (Kolon ile Rektum) arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,1714$).

Yaş kategorileri arasında (≤ 50 ile >50) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,7965$).

Tedavi öncesi CEA düzeyi kategorileri arasında (≤ 5.0 ng/ml ile >5.0 ng/ml) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p=0,0420$).

Kras durumu kategorileri arasında (Mutant ile Wild tip) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,8394$).

VEGFA ifadesi kategorileri arasında (Düşük ile Yüksek) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p=0,0066$).

CSPG4 ifadesi kategorileri arasında (Pozitif ile Negatif) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,4177$).

Çizelge 3.5. Tek değişkenli analizde PFS'yi etkileyen faktörler

Parametre	Medyan PFS (%95 GA)	P
Primer tümör lokalizasyonu Sağ kolon Sol kolon	7,1±1,4 (4,3–9,8) 8,9±0,9 (7,2-10,5)	0,5697
Primer tümör lokalizasyonu Kolon Rektum	6,6±1,1 (4,5–8,7) 8,8±1,1 (6,7-10,9)	0,1714
Yaş ≤ 50 >50	8,1±2,5 (3,2–13,1) 8,3±1,0 (6,2-10,3)	0,7965
Tedavi öncesi CEA düzeyi ≤5.0 ng/ml >5.0 ng/ml	6,4±0,7 (5,1–7,8) 8,8±0,7 (7,3 -10,3)	0,0420
Kras DURUMU Mutant Wild tip	7,4±1,1 (5,3–9,6) 8,8±1,3 (6,2–11,4)	0,8394
VEGFA ifadesi Düşük Yüksek	8,9±1,8 (5,3–12,4) 5,7±1,3 (3,2–8,3)	0,0066
CSPG4 Pozitif Negatif	7,4±0,9 (5,6–9,3) 8,8±4,2 (0,6–16,9)	0,4177

3.6. Tek Değişkenli Analizde Genel Sağkalımı (OS) Etkileyen Faktörler

Tek değişkenli analizde OS'yi etkileyen faktörler Çizelge 3.6.'da gösterilmiştir. Buna göre;

Primer tümör lokalizasyonu kategorileri arasında (Sağ kolon ile Sol kolon) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0,5624).

Primer tümör lokalizasyonu kategorileri arasında (Kolon ile Rektum) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0,1413).

Yaş kategorileri arasında (≤ 50 ile >50) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0,8570).

Tedavi öncesi CEA düzeyi kategorileri arasında (≤5.0 ng/ml ile >5.0 ng/ml) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0,0781).

Kras durumu kategorileri arasında (Mutant ile Wild tip) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p=0,8324$).

VEGFA ifadesi kategorileri arasında (Düşük ile Yüksek) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p=0,3036$).

CSPG4 ifadesi kategorileri arasında (Pozitif ile Negatif) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p=0,5038$).

Çizelge 3.6. Tek değişkenli analizde genel sağkalımı (OS) etkileyen faktörler

Parametre	Medyan OS (%95 GA)	P
Primer tümör lokalizasyonu Sağ kolon Sol kolon	15,4±4,2 (7,2–23,5) 18,7±3,7 (11,3–26,1)	0,5624
Primer tümör lokalizasyonu Kolon Rektum	14,1±3,5 (7,2–21,0) 22,1±7,2 (7,9–36,2)	0,1413
Yaş ≤ 50 >50	11,4±5,9 (0–22,9) 17,0±2,5 (12,1 - 21,9)	0,8570
Tedavi öncesi CEA düzeyi <5.0 ng/ml >5.0 ng/ml	14,1±3,2 (7,7–20,4) 17,9±3,4 (11,1–24,6)	0,0781
KRAS mutasyon durumu Mutant Wild tip	15,4±4,2 (7,1–23,6) 17,9±4,0 (9,9–25,8)	0,8324
VEGFA ifadesi Düşük (0.5 den az) Yüksek (0.5 den çok)	17,0±3,3 (10,6–23,4) 15,1±4,9 (5,4–24,7)	0,3036
CSPG4 Pozitif Negatif	23,9±18,9 (0–60,5) 15,4±2,8 (9,9–20,8)	0,5038

3.7. Çok Değişkenli Analizde PFS'yi Etkileyen Faktörler

Çok değişkenli analizde PFS'yi etkileyen faktörler Çizelge 3.7.'de gösterilmiştir. Buna göre;

VEGFA ekspresyonu yüksek olanların düşük olanlara göre riski istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p=0,016$) 2,384 kat daha fazladır.

Tümör lokalizasyonu (rektum vs kolon) kategorileri arasında risk açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p=0,450).

Yaş (<50 vs >50) kategorileri arasında risk açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p=0,934).

KRAS (Mutant vs Wild tip) kategorileri arasında risk açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p=0,693).

Çizelge 3.7. Çok değişkenli analizde PFS'yi etkileyen faktörler

Parametre	HR (%95 GA)	P
VEGFA ekspresyonu (Yüksek vs Düşük)	2,384 (1,178–4,827)	0,016
Tümör lokalizasyonu (rektum vs kolon)	1,340 (0,627–2,865)	0,450
Yaş (<50 vs >50)	0,961 (0,373–2,479)	0,934
KRAS (Mutant vs Wild tip)	0,845 (0,365–1,955)	0,693

HR: Hazard (risk) oranı; GA: güven aralığı

3.8. Çok değişkenli analizde OS'yi Etkileyen Faktörler

Çok değişkenli analizde OS'yi etkileyen faktörler Çizelge 3.8.'de gösterilmiştir. Buna göre;

VEGFA ekspresyonu (Yüksek vs Düşük) kategorileri arasında risk bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0,327).

Tümör lokalizasyonu rektum olanların kolon olanlara göre riski istatistiksel olarak anlamlı şekilde (p=0,011) 0,291 kat daha fazladır.

Yaş (<50 vs >50) kategorileri arasında risk bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0,468).

KRAS (Mutant vs Wild tip) kategorileri arasında risk bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0,420).

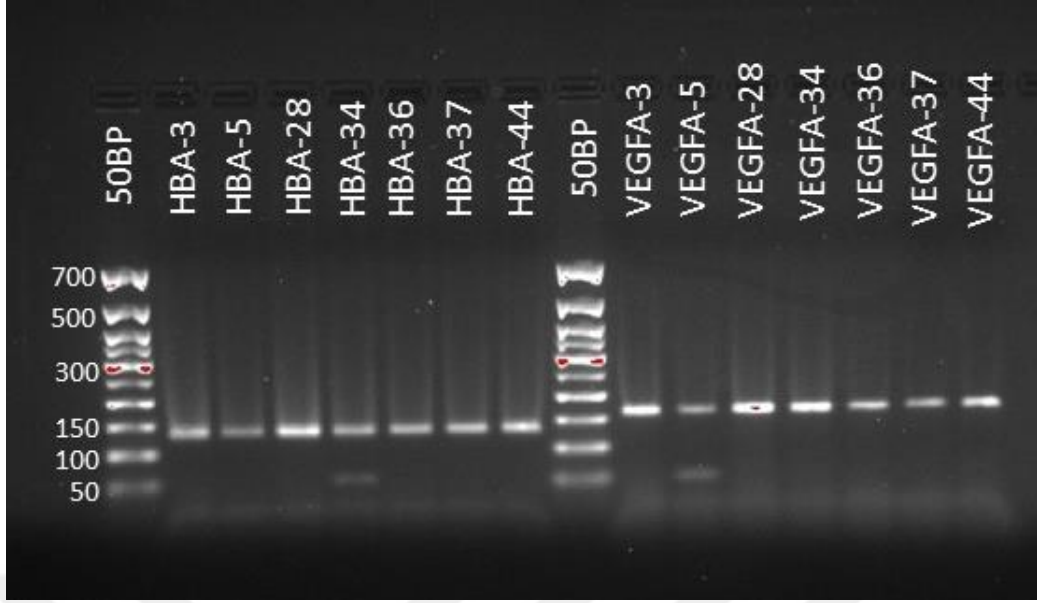
Çizelge 3.8. Çok değişkenli analizde OS'yi etkileyen faktörler

Parametre	HR (%95 GA)	P
VEGFA ekspresyonu (Yüksek vs Düşük)	1,676 (0,596–4,715)	0,327
Tümör lokalizasyonu (rektum vs kolon)	0,291 (0,113–0,755)	0,011
Yaş (<50 vs >50)	0,709 (0,280–1,755)	0,468
KRAS (Mutant vs Wild tip)	0,686 (0,275–1,715)	0,420

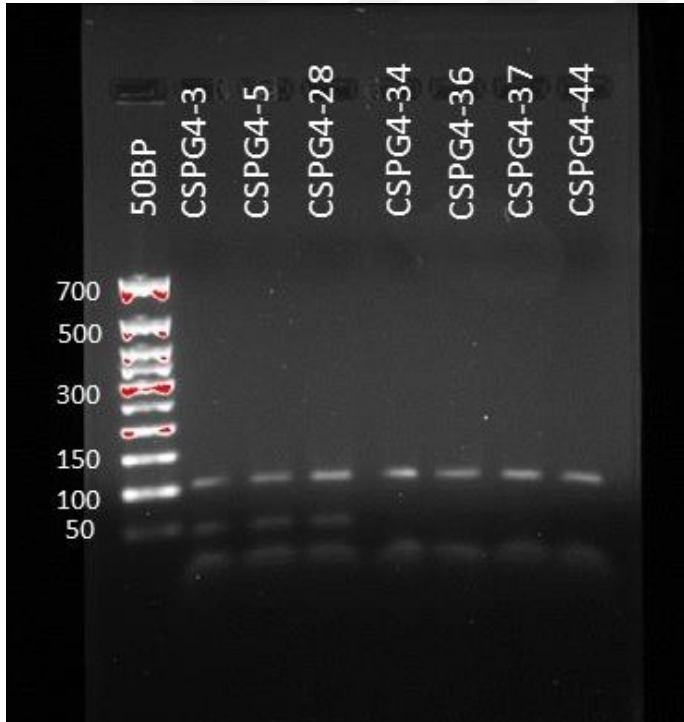
HR: Hazard (risk) oranı; GA: güven aralığı

3.9. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

qPZR amplifikasyonu yapılan örneklerde amplifikasyon olan kuyucukların bazı örnekleri doğrulama amacıyla %2'lik agaroz jelde yürütülerek doğrulanmıştır. Şekil 3.5 ve Şekil3.6'da gösterilmiştir. Genlerin ürün uzunlukları ile DNA Ladder bant uzunlukları birbirleriyle uyumlu olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.5. HBA ve VEGFA geni için qPZR amplifikasyonu yapılan bazı örneklerin %2'lik jelde yürütülmesi



Şekil 3.6. CSPG4 geni için qPZR amplifikasyonu yapılan bazı örneklerin %2'lik jelde yürütülmesi

4. TARTIŞMA

Kanser tedavisinde antianjiyogenik tedavilerden yarar sağlanmasına karşın, hangi hastada direnç gelişeceğini tam olarak bilinmemesi bu tedavinin kullanım alanını sınırlı hale getirmektedir. Tümörlerin antianjiyogenik tedavilerden kaçış mekanizmaları kesin olarak bilinmemektedir.

VEGF, tümörlerin istirahat halindeki endotel hücrelerini bölünmeye teşvik eder ve yeni kan damarları oluşturmalarını sağlar (Bergsland, 2004). Perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerinin komşu oldukları endotel hücreleri için VEGF kaynağı oluşturdıkları bildirilmiştir (Guo ve ark., 2003). Bu sebeple endotel hücreler ile tümör damarlarını saran perisitler ve vasküler düz kas hücrelerinin ilişkisinin belirlenmesi çok önemlidir. Böylelikle hem tümör anjiyogenezinin hem de doğru antianjiyogenik tedavi yaklaşımların geliştirilmesi açısından değerli bilgiler elde edilebilecektir.

Metastatik kolorektal kanserli hastalarda Bevasizumab kemoterapiyle birlikte kombine edilerek uygulandığında sağ kalım oranını anlamlı derecede artırmaktadır (Hurwitz ve ark., 2004). Bu ilaçlarla sağkalım artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunsa da hastaların önemli bir kısmı da (yaklaşık %50-60 kadarı) tedaviden yarar sağlamamaktadır. Tedavi maliyetleri ve vasküler komplikasyonları ele alındığında hastaların yaklaşık olarak yarısından fazlası hiçbir yarar beklenmemesine rağmen tedavi toksisitesine uğramaktadır. Bu durum ülke ekonomisine de yük getirmektedir. Bu nedenle anti-anjiyogenik tedavilerden fayda sağlayabilecek hastaların önceden belirlenebilmesi büyük önem taşımaktadır. Anti-anjiyogenik tedavi etkinliğini önceden belirlemeye yarayacak biyomarker geliştirme çalışmaları yoğun bir şekilde devam etmekle birlikte bugüne kadar klinikte kullanılabilecek önemli bir marker bulunamamıştır.

Anjiyogenezde önemli rol oynayan perisitlerin antianjiyogenik tedavi etkinliğindeki rolü bilinmemektedir. Tümör anjiyogenezinin erken döneminde damar destabilizasyonunun başlatılmasında ve endotel uç hücrelerinin oluşumunda ve göçünde önemli bir basamakta rol oynayan perisitlerin, tümörlerin pek çoğunda görülen yeni damar oluşumuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Perisitleri hedefleyen

alışmalar az sayıdadır. Perisitlerin kolorektal kanserlerde prognoz ve metastazla ilişkili özellikleri tanımlanmıştır. Bu tez çalışmamızda amacımız kolorektal kanserli hastaların tümör dokusundaki perisit varlığının bevasizumab tedavisinin etkinliğindeki rolünü araştırmaktır.

Tez alışmamamızda 50 hasta için HBA, VEGFA ve CSPG4 genlerinin ifadelerine bakılmıştır. VEGFA geni için objektif yanıt oranı bakımından VEGFA_düşük ile VEGFA_yüksek ifade edilen hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,235$). OS oranları açısından VEGFA_yüksek ($VEGF/HBA>0.5$) olan grubun sağ kalım süreleri VEGFA_düşük ($VEGF/HBA<0.5$) olan gruba göre daha az olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. VEGF ifadesi düşük olan grupta PFS anlamlı olarak daha uzun bulunmuştur ($p= 0.0066$; $p<0,05$). Bu sonuçları bulmamızda hasta sayımızın az olmasının etkili olabileceği kanısındayız.

Az sayıdaki klinik çalışma düşük perisit yoğunluğunun daha çok kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir (O’Keeffe ve ark., 2008). Perisitlerin bozulmasının ise metastaz artışını desteklediği bildirilmiştir (Xian ve ark., 2006). Çalışmamızda ise anjiogenez sürecinde perisitler tarafından salınan CSPG4 geni ifadesi analiz edilmiştir. Bevasizumab yanıtı açısından istatistik olarak anlamlı fark bulunmamakla birlikte, CSPG4_pozitif olan hastalarda yanıt daha iyi bulundu ($p=0,054$). Örneklem sayısı arttırılarak anlamlı bir fark oluşturulması olası görülmektedir. OS ve PFS oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmamakla birlikte, CSPG4_pozitif olan grubun sağ kalım süreleri CSPG4_negatif olan gruba göre daha uzun bulundu.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda OS oranları açısından VEGFA_yüksek ($VEGF/HBA > 0.5$) olan grubun sağkalım süreleri VEGFA_düşük ($VEGF/HBA < 0.5$) olan gruba göre daha az olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.3036$). Hasta sayısının az olması burada sorun oluşturabilir. VEGFA ifadesi düşük olan grupta PFS anlamlı olarak daha uzun bulunmuştur ($p= 0.0066$).

CSPG4_pozitif ile CSPG4_negatif ifade edilen hastalar arasında Bevasizumab yanıtı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte, CSPG4_pozitif olan hastalarda yanıt daha iyi bulundu ($p=0,054$). Çalışılan 50 hastanın 7'sinde CSPG4 ifadesi tespit edilmiştir. Dolayısıyla örneklem sayısı artırılarak ve histopatolojik olarak desteklenerek değerlendirilmesinin daha uygun olacağı kanaatindeyiz.

Anjiyogeneizde önemli rol oynayan perisitlerin antianjiyojenik tedavi etkinliğindeki rolü bilinmemektedir. Bu proje perisitlerin ilaç direncindeki rolü üzerine etkisi açısından rutin tedavi olarak bevasizumab tedavisi alan kolorektal kanseri hastaların dahil edildiği ilk çalışmadır. Tümör mikroçevresindeki perisit varlığının Bevasizumab ilaç direnci üzerindeki etkisi açığa çıkarsa, hastaya alternatif tedavi seçenekleri (kanser aşıları, immünoterapi, gen terapisi vb.) sunulabilecektir.

ÖZET

Kolorektal Kanserde Perisitlerin Bevasizumab İlaç Direnci Üzerindeki Etkisi

Kolorektal kanserler ülkemizde Sağlık Bakanlığı 2014 yılı istatistiklerine göre erkeklerde ve kadınlarda üçüncü en sık görülen kanser türüdür. Son yıllarda hedefe yönelik tedavilerin kemoterapiye eklenmesi ile sağ kalım sonuçlarında bir miktar iyileşme sağlanmıştır. Bu ilaçlar içinde özellikle en yaygın kullanılanı anjiyogeneze çok önemli bir ligand olan VEGF' yi bağlayan bevasizumabdır. Bevasizumab hastaların ortalama %30-40'ında etkili olmaktadır. Hem ilacın etkinliğinin düşük olması ve hem de yan etkilerle birlikte maliyet dikkate alındığında bu ilacın yarar görebileceği hastaları önceden belirlemek önem taşımaktadır. Bugüne kadar bevasizumabdan yarar görebilecek hasta grubunu seçmede kullanılabilecek bir parametre ya da marker bulunamamıştır. Bevasizumabın bağlandığı VEGFA (vasküler endotelial büyüme faktörü A ligandı) endotel hücrelerinde eksprese edilen VEGFR-2 tirozin kinaz reseptörleri aracılığıyla kapiller geçirgenliği ve endotel hücre proliferasyonunu artırır.

Perisitler, kılcal damarların çevresinde bazal laminanın dışında onları çevreleyen mezankimal hücrelerdir ve endotel hücreleriyle yakın temastadır. Tümör damarlarını çevreleyen perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerinin, komşu oldukları endotel hücrelerine VEGF kaynağı oluşturdıkları düşünülmektedir. Perisitler tarafından salınan CSPG4/ NG2 (Kondroitin Sülfat Proteoglikanları) anjiogeneze sürecinde tüpsü yapıyı oluşturmayı sağlayan endotel uç hücrelerini hipoksik tümör yönüne yönlendirir. Son yıllarda yapılan dikkatli mikroskopik çalışmalarda perisitlerin tümörlerin pek çoğunda görülen yeni damar oluşumuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Klinik veriler, düşük perisit alanının hastalarda kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir.

Bu projede, hastaların tümör dokusundaki perisit varlığının Bevasizumab ilacının etkinliği üzerinde ve tedaviye direnç gelişimindeki etkisi araştırmak amaçlanmıştır. Böylelikle, ilaca dirençli hastaya alternatif tedavi seçenekleri (kansere aşıları, immünoterapi, gen terapisi vb.) sunulabilecektir. Ayrıca bu çalışma, perisitlerin ilaç direncindeki rolü üzerine etkisi açısından rutin tedavi olarak bevasizumab tedavisi alan kolorektal kanseri hastaların dahil edildiği ilk çalışmadır.

Tez çalışmamızda 50 hasta için HBA, VEGFA ve CSPG4 geninin ifadelerine bakılmıştır. VEGFA geni için objektif yanıt oranı bakımından VEGFA_düşük(VEGF/HBA<0,5) ile VEGFA_yüksek(VEGF/HBA>0,5) ifade edilen hastalar arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. VEGFA_düşük olan grupta PFS (progresyonsuz sağkalım) anlamlı olarak daha uzun bulunmuştur (p=0,0066; p<0,05). CSPG4_pozitif ile CSPG4_negatif ifade edilen hastalar arasında Bevasizumab yanıtı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte, CSPG4_pozitif olan hastalarda yanıt daha iyi bulundu (p=0.054). OS ve PFS açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmamakla birlikte, CSPG4_pozitif olan grubun sağ kalım süreleri CSPG4_negatif olan gruba göre daha uzun bulundu. Bu bulgulara göre perisitlerin Bevasizumab ilacı üzerindeki etkisinin örneklem sayısının artırılarak ve histopatolojik deneylerle desteklenerek değerlendirilmesinin daha uygun olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Anjiogeneze, Bevasizumab, Kolorektal Kanser, Perisit, VEGF

SUMMARY

The Impact of Pericytes on Bevacizumab Drug Resistance in Colorectal Cancer

Colorectal cancers are the third most common cancer type in men and women, according to the Ministry of Health's 2014 statistics. In particular, the mean survival of patients with metastatic disease varies between 24 and 36 months. In recent years, the addition of chemotherapy to targeted therapies has resulted in some improvement in survival outcomes. Among these drugs, the most common use is bevacizumab, which binds VEGF, a very important ligand in angiogenesis. Bevacizumab is effective on average 30-40% of patients. It is important to determine in advance the patients that this medicine will benefit when both the effectiveness of the drug is low and the cost is considered together with the side effects. Until now, no parameters or markers have been found which can be used to select the patient group that the bevacizumab will benefit from. Bevacizumab binding VEGFA (ligand of vascular endothelial growth factor A) enhances capillary permeability and endothelial cell proliferation via VEGFR-2 tyrosine kinase receptors expressed in endothelial cells.

Pericytes are mesenchymal cells surrounding capillary vessels other than basal lamina, and are in close contact with endothelial cells. Pericytes and vascular smooth muscle cells surrounding the tumor vessels are thought to form VEGF sources to neighboring endothelial cells. In careful microscopic studies in recent years, it has been shown that pericytes are associated with new vessel formation, most of which are tumors. Clinical data have shown that low pericytic area is associated with poor prognosis in patients.

In this study, the effect of the presence of pericytes in the tumor tissue of patients on the efficacy of the Bevacizumab drug and the development of treatment resistance will be investigated. Thus, alternative treatment options (cancer vaccines, immunotherapy, gene therapy, etc.) will be offered to the patient who is more resistant. This study was also the first study to include colorectal cancer patients who received bevacizumab treatment as a routine treatment in terms of their effect on the drug resistance of pericytes.

In our study, the expression of HBA, VEGFA and CSPG4 genes was examined for 50 patients. No statistically significant difference was found between patients expressing VEGFA_low (VEGF / HBA <0,5) and VEGFA_high (VEGF / HBA > 0,5) in terms of the objective response rate for the VEGFA gene. PFS (progression-free survival) was significantly longer in the VEGF_low group. ($p=0,0066$; $p<0,05$). Although there was no statistically significant difference in Bevacizumab response between CSPG4_pozitif and CSPG4_negative patients, the response was better in CSPG4_positive patients ($p=0,054$). There was no statistically significant difference between OS and PFS, but the survival time of CSPG4_positive group was longer than that of CSPG4_negative group.

Based on these findings, we believe that the effect of pericytes on the Bevacizumab drug may be better evaluated by increasing the number of samples and supporting it with histopathological experiments.

Keywords: Angiogenesis, Bevacizumab, Colorectal Cancer, Pericytes, VEGF

KAYNAKLAR

- AKBULUT, H, AKTAŞ , S, H. (2014). Kolorektal kanserde anjiyogenez ve anti-anjiyogenik tedaviler. *Türk Onkoloji Dergisi*, **29**, 67–79.
- AKTAS SH, AKBULUT H, AKGUN N, I. F. (2013). Low dose chemotherapeutic drugs without overt cytotoxic effects decrease the secretion of VEGF by cultured human tumor cells: a tentative relationship between drug type and tumor cell type response. *Cancer Biomark*, **12(3)**, 135–40.
- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, M. E. & L. D. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403–410.
- ALVAREZ RH, GUARNERI V, ICLI F. (2011). Bevacizumab treatment for advanced breast cancer. *The Oncologist*, **16**, 1684–1697.
- ARMULIK A, GENOVE G, MAE M, NİSANCIOĞLU MH, WALLGARD E, NIAUDET C, HE L, NORLIN J, LINDBLOM P, STRITTMATTER K, JOHANSSON BR, B. C. (2010). Pericytes regulate the bloodbrain barrier. *Nature*, **468**, 557–561.
- BAGLEY RG, REN Y, WEBER W, YAO M, K. L., & J, P. (2011). Placental growth factor upregulation is a host response to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res*, **17(5)**, 976–88.
- BELLUCO C, ESPOSITO G, BERTORELLE R, ALAGGIO R, GIACOMELLI L, B., & LC, NITTI D, L. M. (2002). Fas ligand is up-regulated during the colorectal Adenoma-carcinoma sequence. *EJSO*, **28**, 120–125.
- BERGERS AND SONG, 2005 RAZA, A., FRANKLIN, M.J., AND DUDEK, A. (2010). Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am. J. Hematol.*, **85**, 593–598.
- BERGSLAND E, DICKLER, M. (2004). Maximizing the potential of bevacizumab in cancer treatment. *Oncologist*, **1**, 36–42.
- BOYLE P, LEON, M. (2002). Epidemiology of colorectal cancer. *Br Med Bull*, **64**:1-25.
- BRAUER MJ, ZHUANG G, SCHMIDT M, YAO J, WU X, KAMINKER JS. (2013). Identification and analysis of in vivo VEGF downstream markers link VEGF pathway activity with efficacy of anti-VEGF therapies. *Clin Cancer Res*, **19**, 3681–92.
- BREIER G, BLUM S, PELI, J. (2002). Transforming growth factor-beta and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis. *Int J Cancer*, **97**, 142–148.
- BURKHART, DL SAGE, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*, **8**, 671–82.

- COMPTON CC. (2002). *Surgical pathology of colorectal cancer*. Totowa: Humana Press.
- COOPER HS. (2004). Intestinal Neoplasms. İçinde *Stenberg's Diagnostic Surgical Pathology*. (ss. 1543–601). Lippincott Williams&Wilkins.
- CRAWFORD JM, KUMAR, V. (2003). Ağız Bosluğu ve Gastrointestinal Sistem. İçinde *Robbins Temel Patoloji* (ss. 563–590). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- DALTON P, CHANDRASOMA, P. (1999). Colorectal Malignant Neoplasm. İçinde *Gastrointestinal Pathology* (ss. 339–65). Stamford.
- DOĞAN, M, AKBULUT, H. (2009). Kolorektal kanserde adjuvan tedavi. *T. Klinikleri Tıbbi Onkoloji Özel Dergisi* 2, 3, 49–57.
- ELLOUMI J, JELLALI K, JEMEL I, A. S. (2012). Monoclonal antibodies as cancer therapeutics. *Recent Pat Biotechnol. Recent Pat Biotechnol*, 6, 45–56.
- FAYETTE J, SORIA JC, ARMAND, J. (2005). Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer*, 41, 1109–16.
- FENOGLIO PREISER CM, NOFFSINGER AE, STEMMERMANN GN, LANTZ PE, L., & MB, RILKE, F. (1999). Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. *Gastrointestinal pathology: an atlas and text*, 909–1068.
- FERRARA N, DAVIS-SMYTH, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18, 4–25.
- FERRARA N. (2000). VEGF: An update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol*, 11, 517–24.
- FERRARA N. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9, 669–676.
- FIDLER, I. J., KERBEL, R.S., ELLIS, L. M. (2001). *Cancer Principles&Practice of Oncology*. (S. Vincent T.DeVita, Jr., Hellman & S. A. Rosenberg, Ed.) (6. baskı).
- FİĞEN D. (2005). Kolorektal karsinomda sınıflama ve prognostik faktörler. İçinde *Türk Patoloji Derneği Mezuniyet sonrası Eğitim Toplantısı Gastrointestinal Sistem Patolojisi Günleri* (ss. 47–56). İstanbul.
- FOLKMAN J, SHING, Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267, 10931–10934.
- FOLKMAN J. (1995). Clinical applications of research on angiogenesis. *N Eng J Med*, 333, 1757–63.
- FOLKMAN J. (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med*, 57, 1–18.
- FOROOGHIAN F, CHEW EY, MEYERLE CB, CUKRAS C, W. W. (2011). Investigation of the role of neutralizing antibodies against bevacizumab as mediators of tachyphylaxis. *Acta Ophthalmol*, 89(2), e206-7.

- GAENGEL, K., GENOVE , G., ARMULIK, A., AND BETSHOLTZ, C. (2009). Endothelial mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, **29**, 630–638.
- GALAND P, RODESCH F, LEROY F, CHRETIEN, J. (1967). Altered duration of DNA synthesis in nontarget tissues of mice treated with oestrogen. *Nature*, **216**, 1211–2.
- GASPARINI G, HARRIS, A. (1995). Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol*, **13**, 765–782.
- GLOBACON. (2012). No Title. Tarihinde 16 Kasım 2017, adresinden erişildi http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.a
- GORDON, PH, NIVATVONGS, S. (2007). *Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum, and Anus*. New York: Informa Healthcare.
- GUO P, HU B, GU W, XU L, WANG D, HUANG HJS, CAVENEE WK, C. S. (2003). PDGF -B enhances glioma angiogenesis by stimulating VEGF expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *Am.J.Pathol*, 162–64.
- HAMILTON SR, VOGELSTEIN B, KUDO S, RIBOLI E, NAKAMURA S, HAINAUT P, R. C., & SOBIN LH, FOGT F, WINAWER SJ, G. DE. (2000). Tumours of Colon and Rectum. İçinde *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. (1. baskı, ss. 103–143). Lyon: IARC Press.
- HARPAZ N, SAXENA, R. (2003). Gastrointestinal Tract, Large Intestine. İçinde *Modern Surgical Pathology* (ss. 749–852). Saunders.
- HURWITZ H, FEHRENBACHER L, NOVOTNY W. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, **350**, 2335–2342.
- INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER (UICC). (2009). *TNM Classification of Malignant Tumours*. (C. Sobin LH, M.K. Gospodarowicz, Wittekind, Ed.) (7. baskı). Wiley.
- JAYSON GC, DE HAAS S, DELMAR P, MILES DJ, SHAH MA, V. C. E. (2001). Evaluation of plasma VEGF-A as a potential predictive pan-tumour biomarker for bevacizumab. İçinde *Proceedings of the 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress* (ss. 23–7). Stockholm.
- KALAYCI G. (2002). Kolon Kanseri. İçinde *Genel Cerrahi* (2. baskı, ss. 1343–1359). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- KOPETZ S, HOFF PM, MORRIS JS, WOLFF RA, ENG C, GLOVER, & KY. (2010). Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol*, **28(3)**, 453–9.

- KORESSAAR T, REMM M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, **23**, 1289–1291.
- KUMAR V, ABBAS AK, ASTER, J. (2013). *Robbins Temel Patoloji*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri.
- KUMAR V, ABBAS AK, F. N. (2005). *The gastrointestinal tract. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. (7. baskı). Philadelphia: Elsevier Saunders Company.
- LIAO D, JOHNSON, R. (2007). Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **26**, 281–290.
- LOS M, ROODHART JM, VOEST, E. (2007). Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *The Oncologist*, **12**, 443–450.
- LU, C., KAMAT, A.A., LIN, Y.G., MERRITT, W.M., LANDEN, C.N., KIM, T.J., SPANNUTH, W., ARUMUGAM, T., HAN, L.Y., JENNINGS, N. (2007). Dual targeting of endothelial cells and pericytes in antivasculature therapy for ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res*, **13**, 4209–4217.
- MANCUSO MR, DAVIS R, NORBERG SM, O'BRIEN S, S., & B, N. T. (2006). Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest*, **116**(10), 2610–21.
- MARSHALL OJ. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, **20**, 2471–2472.
- MILES DW, DE HAAS SL, DIRIX L, CHAN A, PIVOT X, T. P. (2010). Phase III Study of Bevacizumab Plus Docetaxel Compared With Placebo Plus Docetaxel for the First-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer. *American Society of Clinical Oncology*, **28**, 3239–3247.
- MUKHERJI, S, K. (2010). Bevacizumab (Avastin). *American Journal of Neuroradiology*, **31** (2), 235–236.
- NCBI. (2017). VEGFA vascular endothelial growth factor A [Homo sapiens (human). Tarihinde 06 Aralık 2017, adresinden erişildi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7422>
- NETTER, F. H. (2011). *İnsan Anatomisi Atlası*. (M. Cumhuriyet, Ed.) (5. baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi.
- NUSSBAUM, R., L., MCINNES, R., R., WILLARD, H., F., BOERKOEL, C., F. (2005). *Tıbbi Genetik*. Güneş.
- O'KEEFFE, M.B., DEVLIN, A.H., BURNS, A.J., GARDINER, T.A., LOGAN, I.D., HIRST, D.G., AND MCKEOWN, S. R. (2008). Investigation of pericytes, hypoxia, and vascularity in bladder tumors: association with clinical outcomes. *Oncol. Res*, **17**, 93–101.

- OWCZARZY R, TATAUROV AV, WU Y, MANTHEY JA, MCQUISTEN KA, ALMABRAZI HG, PEDERSEN KF, LIN Y, GARRETSON J, MCENTAGGART NO, SAILOR CA, D. R. & P. A. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, **36**, W163–W169.
- PAPAMICHAEL, DEMETRIS, AND RICCARDO A. AUDISIO, EDS. (2013). Management of colorectal cancers in older people. *Springer*.
- PINO MS, CHUNG, D. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, **138**, 2059–2072.
- PREMKUMAR, K. (2015). *Anatomy and physiology*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi.
- RINGER DP, S. LE. (2001). Principles of Cancer Biology. *Clinical Oncology Atlanta: American Cancer Society*, 21–35.
- ROMOLO J.L. (1996). Embryology and anatomy of the colon. İçinde *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract* (ss. 3–16).
- ROSAI J. (1996). Gastrointestinal Tract. İçinde *Acherman's Surgical Pathology*. (ss. 729–766). Missouri: Mosby Year Book.
- ROSAI J. (2004). *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. (9. baskı).
- ROSS MH, PAWLINA, W. (2014). *Histology: A Text And Atlas*. Ankara: Palme Yayıncılık.
- RUPNARAIN, C., DLAMINI, Z., NAICKER, S., VE BHOOLA, K. (2004). Colon cancer: genomics and apoptotic events. *Biol. Chem*, **385**, 449–464.
- SCHULZ WA. (2005). *Molecular biology of human cancers*. Springer. Netherlands.
- SHOJAEI F, FERRARA, N. (2008). Role of the microenvironment in tumor growth and in refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. *Drug Resist Updat*, **11(6)**, 219–30.
- SKANDALAKIS WILLIAM C. WOOD , JOHN, E. (1995). *Surgical anatomy and technique*. Quality Medical Publishing.
- SKIBBER, J.M., MINSKY,B.D., HOFF, P. (2001). *Cancer Principles&Practice of Oncology*. (S. Vincent T.DeVita, Jr., Hellman & S. . Rosenberg, Ed.) (6. baskı).
- SMITH, G., CAREY, F.A., BEATTIE, J., WILKIE, M.J.V., LIGHTFOOT, T.J., COXHEAD, J., & GARNER, R.C., STEELE, R.J.C., AND WOLF, C. R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *PNAS*, **99**, 9433–9438.
- T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI. (2017). Türkiye Kanser İstatistikleri, Ankara 2017. Tarihinde 19 Kasım 2017, adresinden erişildi http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2014-RAPOR._uzun.pdf

- TANG WY, ELNATAN J, LEE YS, GOH HS, S. D. (1999). Kras mutations in colorectal adenocarcinomas from a country with a rapidly changing colorectal cancer incidence. *Br J Cancer*, **81**, 237–241.
- TÜİK. (2015). Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2015.
- VACCHELLI E, EGGERMONT A, GALON J. (2013). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *OncoImmunology*, **2(1)**, e22789.
- VALASTYAN, S, WEINBERG, R. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, **14;147(2)**, 275–292.
- VASUDEV NS, REYNOLDS, A. (2014). Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, **17(3)**, 471–494.
- VOLZ, N. B., STINTZING, S., ZHANG, W., YANG, D., NING, Y., WAKATSUKI, T., LENZ, H.-J. (2015). Genes involved in pericyte-driven tumor maturation predict treatment benefit of first-line FOLFIRI plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer. *The Pharmacogenomics Journal*, **15(1)**, 69–76. <https://doi.org/10.1038/tpj.2014.40>
- WILLIAMS GM. (2001). No Title. *Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment*, **14(Toxicology)**, **166 (1-2)**, 3-10.
- WOLPIN, M., MAYER, R. J. (2008). Systemic Treatment of Colorectal Cancer. *Reviews in basic and clinical gastroenterology*.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2017). Cancer. Tarihinde 07 Kasım 2017, adresinden erişildi <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- XIAN, X., HAKANSSON, J., STAHLBERG, A., LINDBLOM, P., BETSHOLTZ, C., GERHARDT, H., AND SEMB, H. (2006). Pericytes limit tumor cell metastasis. *J. Clin Invest*, **116**, 642–651.
- YE J, COULOURIS G, ZARETSKAYA I, CUTCUTACHE I, R. S. & M. T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, **13**, 134–134.
- YILMAZLAR, T., ÖZTÜRK, E. (2004). *Kolon Kanseri. Kolon & Rektal Cerrahinin El Kitabı*. (K. J. Corman ML., Allison SI., Ed.). Adana: Nobel Tıp Kitapevleri.
- YOKUŞ B, Ç. D. (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **1** :7-18.
- ZUCKERMAN, D.S., CLARK, J. (2008). Systemic Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer*, **1;112(9)**, 1879–91.

EKLER

EK 1

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kolorektal Kanserde Perisitlerin Bevasizumab İlaç Direnci Üzerindeki Etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:19-963-16	Tarih: 12 Aralık 2016		
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>M. Mellî</i>
Prof.Dr.İrfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>İrfan Soykan</i>
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Serdar Öztürk</i>
Prof.Dr.Seher DEMİRER	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>Seher Demirer</i>
Prof.Dr.Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Şule Şengül</i>
Prof.Dr.İnci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>İnci İlhan</i>
Prof.Dr.Serap SİVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Serap Sivri</i>
Prof.Dr.Zarife ŞENOC AK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>Zarife Şenocak</i>
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Banu Çakır</i>
Doç.Dr.Süha YAĞCIOĞLU	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Süha Yağcıoğlu</i>
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>Derya Öztuna</i>
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Selami Koçak Toprak</i>
Yrd.Doç.Dr.Nuket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>Nuket Kutlay</i>
Yrd.Doç.Dr.Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	H.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Önder İlgili</i>
İlfi BERKTAŞ	Matematik Mühendisliği	Türkiye Kömür İşletmeleri Genel Müdürlüğü	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>İlfi Berktaş</i>

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kolorektal Kanserde Perisitlerin Bevasizumab İlaç Direnci Üzerindeki Etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Filiz ÇAY ŞENLER			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Onkoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
FAZ 4		☐			
Gözlemsel ilaç çalışması		☐			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐			
	İlaç dışı klinik araştırma	☐			
	Diğer ise belirtiniz: Kohort Araştırma				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Ad ve Soyad: Merve BAKIRCI
Doğum Yeri: Taşköprü/ KASTAMONU
Doğum Tarihi: 06.04.1989
Uyruk: TC
Medeni Hali: Bekar
İletişim Adresi: Kültür mah. 91/9 Çankaya / ANKARA
Telefon: 0505 763 4510
E-mail Adresi: mervebkrc@gmail.com

II- Eğitimi

2015 - 2017 : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD, Tıbbi Onkoloji
BD Tümör Biyolojisi Yüksek Lisans Programı, Ankara (Not Ortalaması: 3.55 /4.00)

2012 – 2014 : Anadolu Üniversitesi/ Sağlık Kurumları İşletmeciliği

2008 – 2012 : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
(Not Ortalaması: 3.01, Şeref Öğrencisi)

Yabancı Dil: İngilizce - İyi Derece

III – Mesleki Deneyimi

2015-2017 : Başkent Hastanesi Genetik Tanı Merkezi - Biyolog
-Moleküler Genetik laboratuvarında çalışılan testlerin uygulanması.
DNA/RNA izolasyonu(kan,kemik iliği,doku,hücre kültürü, amniyon sıvısı,CVS vb),PCR uygulamaları, QF-PCR, RT-PCR, Sekans çalışmaları, Strip testleri, Jel elektroforezi uygulamaları.

01.09.14 -(8ay) : Heliks Biyoteknoloji - Satış ve Aplikasyon Uzmanı

09.2011 : Güven Hastanesi- Biyokimya Laboratuvarı ANKARA - Stajyer

Biyokimya laboratuvarında ki Tam Otomatize Analizörlerde

-İmmunolojik testlerin

-Koagulasyon Testlerin

-Biyokimyasal Testlerin uygulanması.

06.2010: Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı ve Araştırma Hastanesi Genetik Merkezi –ANKARA- Stajyer

-Rutin sitogenetik uygulamalar (amniosentez, periferik kan, kordosentez, CVS ve cilt biyopsi kültürleri, HRB bantlama)

-Moleküler genetik uygulamaları hakkında bilgilendim.

06.2010 : Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı – ANKARA- Stajyer

IV- Üyelikler

Biochemical Society

V – Bilimsel Etkinlikleri

Projeler ve aldığı burslar:

2017 - Kolorektal Kanserde Perisitlerin Bevasizumab İlaç Direnci Üzerindeki Etkisi (BAP - Ankara Üniversitesi) (Lisansüstü Tez Projesi (Yüksek Lisans))

Seminer:

Tümör Anjiyogenezinde Perisitlerin Etkisi-Ankara Üniversitesi Tıp Fak. Tümör Biyolojisi Yüksek Lisans Programı

VI – Diğer Bilgiler

2017- III. Onkolojide Güncel Gelişmeler Sempozyumu, Ankara

2016- II. Onkolojide Güncel Gelişmeler Sempozyumu, Ankara

18.03.2014 -Where Bio Begins From Gene to Protein INTERLAB and Sigma-Aldrich *Topics of the Seminar: Proteomics, RNAomics, DNAomics*

18.04.2012- ISO 9001 Kalite Yönetim Sistemi Sertifikası ISO 22000 Gıda Güvenliği Kalite Yönetim Sistemi Sertifikası ISO/IEC 17025 Eğitimi Başarı Sertifikası

19-26.04.2012- DNA Günü-2012’de görevli Hacettepe Üniversitesi

9-10.04.2011- “Moleküler Biyoloji ve Genetik Hafta Sonu VI” seminerine katılım
Boğaziçi Üniversitesi

30-31.10.2010- “Biyçeşitlilik2010:Tüm Çeşitliliği ile Yaşam” etkinliğine katılım
Orta Doğu Teknik Üniversitesi

