

Kolorektal Kanser Tanısı Konmuş Olgularda ve Birinci Derece Yakınlarında DNA Hasarının Araştırılması

Ayfer Tozan-Beceren¹, Gülden Z. Omurtag¹, Cumhuriyet Yeğen², Semra Şardaş¹

¹Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul-Türkiye

²Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul-Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Ayfer Tozan-Beceren

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa, 34668, İstanbul-Türkiye

Telefon / Phone: +90-216-414-2962/1200 Faks / Fax: +90-216-345-2952 Elektronik posta adresi / E-mail address: ayfertozan@hotmail.com

Kabul tarihi / Date of acceptance: 27 Kasım 2011 / November 27, 2011

ÖZET

Kolorektal kanser tanısı konmuş olgularda ve birinci derece yakınlarında DNA hasarının araştırılması

Amaç: Dünyanın pek çok ülkesinde yapılan araştırmalar kalıtsal duyarlılık ve çevresel faktörlerin etkileri sonucu kolorektal kanserlerin oluştuğuna işaret etmektedir. Kolorektal kanser hastalarının birinci derece yakınlarında kansere yakalanma riskinin diğer bireylere oranla iki kat daha yüksek olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Kolorektal kanserin moleküler ve biyolojik özellikleri hakkındaki bilgilerin hızla artması patogeneze ışık tutmaktadır. Artan kanser riskinin belirlenmesi için biyogöstergelerden sıklıkla yararlanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, genotoksisite çalışmalarında DNA hasarının gösterilmesinde oldukça başarılı bir biyogösterge olan comet tekniği ile kolorektal kanser hastaları ve birinci derece yakınlarının lenfositlerindeki muhtemel genotoksik etkilerin sağlıklı gönüllüler ile karşılaştırılmasıdır.

Yöntemler: Henüz hiç tedavi görmemiş, yeni teşhis edilmiş kolorektal kanser hastalarından (n=26), birinci derece yakınlarından (n=26) ve kontrol grubundan (n=18) kan örnekleri toplandı. Comet tekniğinde her örnek için incelenen 50 hücrenin (slayt başına) her birinde kuyruktaki DNA yüzdesi oranlarının ortalaması "mean tail DNA %" (%DNA_T) görüntüleme analiz sistemi kullanılarak hesaplandı. Yapılan anket değerlendirmelerinde sosyodemografik özellikler ve DNA hasarını etkileyebilecek faktörler göz önünde bulundurulmuştur.

Bulgular: Kolorektal kanser hastaları ve birinci derece yakın bireylerin periferik kan lenfositlerinde comet tekniği uygulanması sonucunda elde edilen ortalama %DNA_T değerleri (sırasıyla 10.45±1.50 ve 9.83±1.39) olarak saptanmış olup, kontrol grubu (8.59±0.76) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (sırasıyla p <0.001, p <0.01).

Sonuç: Bu çalışmada elde edilen sonuçlar kolorektal kanser teşhisi konmuş hastalarda ve özellikle de birinci derece yakınlarında comet tekniğinin, DNA hasarını belirlemede bir biyogösterge olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: DNA hasarı, kolorektal kanser, comet tekniği

ABSTRACT

Investigation of DNA damage in patients with colorectal cancer and their first degree relatives

Objective: Studies in all over the world have reported that genetic susceptibility and environmental factors play an important role in the formation of colorectal cancer. Overall, individuals with incidence of colorectal cancer in the first-degree relatives are about twice as likely to develop colorectal cancer as those without any family history. The rapid increase about the information on molecular and biological characteristics of colorectal cancer has shed light on the pathogenesis of colorectal cancer. Biomarkers are often utilized for the determination of increased risk of cancer. The aim of our study was to investigate the potential DNA damage using by comet assay in peripheral lymphocytes of colorectal cancer patients, their first degree relatives compared with healthy subjects.

Methods: Peripheral blood samples were taken from untreated patients diagnosed with colorectal cancer (n=26), their first degree relatives (n=26) and healthy subjects (n=18) were analyzed by comet assay. A total of 50 individual cells were screened per sample (from each slide). The length of the DNA migrated in the comet tail, which is an estimate of DNA damage, was measured with image analysis system. Mean tail %DNA for each cell was calculated as 100-Head %DNA. Each participant was interviewed with a questionnaire which covered a detailed sociodemographic attributes including variables known to induce the comet frequency.

Results: The DNA damage was found significantly higher in colorectal cancer patients and their first degree relatives (respectively 10.45±1.50, 9.83±1.40) as compared with the control group (8.59±0.76) (respectively p <0.001, p <0.01).

Conclusion: In this study, our results demonstrate that comet assay can be used as a biomarker for detecting DNA damage in patients diagnosed with colorectal cancer and especially in to demonstrate the damage in their first degree relatives.

Key words: DNA damage, colorectal cancer, comet assay

GİRİŞ

Tüm dünyada kanser en önemli ölüm nedeni olmakla birlikte kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %30'u önlenebil-

mektedir. En sık görülen kanser türleri kadında ve erkekte farklılık göstermektedir. Tüm dünyada kanser ölümlerinin artmaya devam edeceği ve 2030 yılında 12 milyon ölümlün kanser nedeniyle olacağı tahmin edilmektedir (1).

Her yıl dünyada yaklaşık bir milyon yeni kolorektal kanser (KRK) vakası görülmektedir ve bu sayı tüm kanser vakalarının %9.5'ini oluşturmaktadır. Dünyadaki kanser vakaları incelendiğinde KRK 3. sırada yer alırken, kanserden ölüm nedenlerinde ikinci sırada yer almaktadır (2). Tüm dünyada KRK'e bağlı ölümler erkeklerde akciğer ve prostat kanseri, kadınlarda akciğer ve meme kanserinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. 2010'da ise erkek ve kadınlarda 142.570 (72.090 erkek, 70.480 kadın) yeni KRK vakası saptanmış olup bunların da 51.370'nin KRK nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html#survival>, 17.10.2011). Türkiye'de ulusal düzeyde kansere bağlı gerçekleşmesi beklenen ölüm sayıları erkekler için 2020 yılında 61.076 ve 2030 yılında 89.117 olarak tahmin edilmektedir. Kadınlarda, kansere bağlı gerçekleşmesi beklenen ölüm sayıları ise 2020 yılı için 31.099 ve 2030 yılı için 39.094 olarak tahmin edilmektedir (1). Günümüzde dünya genelinde kansere bağlı ölümlere ait hızın gelişmiş ülkelerde, gelişmekte olan ülkelere oranla iki katı fazla olduğu bildirilmektedir. Bunun nedeni olarak, gelişmiş ülkelerde sigara epidemisinin daha önce ortaya çıkması, mesleki karsinojenlere daha erken maruziyet, batı tipi beslenme alışkanlıkları ve yaşam biçimi gösterilmektedir. Bununla birlikte kanser olgularına ait morbidite ve mortalite hızlarının gelişmekte olan ülkelerde de arttığı bildirilmektedir (2,3). Kolorektal kanserde cinsiyet dağılımındaki farkların dikkat çektiği ve erkeklerde daha sık görüldüğü bildirilmesine rağmen (4) günümüzde yapılan araştırmalar ışığında görülme oranının yaşla beraber arttığı, kolon kanserinin her iki cinsiyette aynı frekansta görüldüğü ancak rektal kanserlerin erkeklerde kadınlara göre iki kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (2). Birçok çevresel kökenli hastalıkta olduğu gibi KRK gelişiminde de yaşam tarzı, maruziyet hikayesi önem taşımaktadır. Kolorektal karsinom patogenezinde dengesiz beslenmeye bağlı koruyucu maddelerin eksikliği ve karsinogenik etkenlerin, kolon mukoza epitel hücrelerinde rejenerasyon direncinin ve mukus kalitesinin kaybına neden olduğu ve bunun genetik ve somatik mutasyonlarla kalıcı hale gelmesi sonucunda karsinogenezin başladığı bildirilmiştir (5).

Kolorektal kanserin moleküler ve biyolojik özellikleri hakkındaki bilgilerin hızla artması, genetik yatkınlık ve çevresel etkiler arasındaki etkileşimin aydınlatılması patogeneze ışık tutmaktadır (6,7). Genetik faktörler hakkında yapı-

lan çalışmalar, KRK oluşumunda %35 oranında kalıtsal faktörlerin rol oynadığını göstermektedir (8). Genel olarak; çeşitli KRK tiplerine (örneğin ailesel polipozis veya kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser gibi) yatkınlığa neden olduğu bilinen herhangi bir genetik sendrom gözlenmemiş ancak birinci derece yakınlarında KRK'e rastlanan bireylerin KRK geliştirme insidansının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (4,9).

Kolorektal kanserin tedavisi erken evrelerinde mümkün olmasına rağmen, tümör semptomları genellikle ileri evrede ortaya çıktığından mortalite oldukça yüksektir (10). Kanser riskinin belirlenmesi için biyogöstergelerden sıklıkla yararlanılmaktadır. Biyogösterge verilerinin kullanımında asıl amaç; hastalıkları erken teşhis etmek, uzun dönemde oluşabilecek sağlık problemlerini belirlemek, çeşitli maruziyetleri değerlendirmek ve toksisiteye neden olan etkenler hakkında bilgiye sahip olabilmektir (11,12). Kanser antijenlerinden karsinoembriyonik antijen (CEA), kanser antijeni 19-9 (CA 19-9), CA 50 ve CA 19-5 değerlerinin kolon ve rektum kanserinde yükselbileceği bildirilmiştir. CA 19-9, ilk olarak fare kolon kanseri hücrelerine karşı geliştirilen bir biyogösterge dir. CA 72-4'ün, insan adenokarsinoması ile ilgili bir antijen olduğu ve özellikle mide ve kolon kanserlerinde yükseldiği bildirilmiştir (11,13).

Genotoksisite çalışmalarında periferik kan lenfositlerinin hedef dokulardaki biyolojik etkileri temsil ettiği düşünülmektedir. Kromozomal hasar mekanizmasının farklı dokularda benzer olduğu düşünülürse, lenfositlerdeki hasar seviyesi kansere yatkın dokularını yansıtır kanser riskini belirlemede kullanılabilir. Bu yüzden periferik kan lenfositleri, hedef dokuyu da yansıtır şekilde DNA hasarlarının değerlendirilmesini ve genotoksik riskin belirlenmesini mümkün kılar (14-16). Bu nedenle çalışmamızda genotoksik etkiler periferik kanda araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalar, sitotoksisite ve genotoksisitede kullanılan biyogöstergelerin kanserin erken teşhisinde de biyogösterge olarak kullanılabilirliğini göstermektedir (16-18). Ayrıca kolorektal kanserde sitogenetik aberasyonlar (sayısal ve yapısal anormallikler) olduğu gösterilmiştir (19-23).

Popülasyonlar arası ırksal farklılıklar, çevresel faktörler ve yaşam tarzında farklılıklar bulunan toplumda halk sağlığı ve ülke ekonomisi açısından önem taşıyan kanserin önlenmesi ve erken tanısının sağlanması için genetik yat-

kınlığın araştırılması önem taşımaktadır. Bazı bireylerin DNA hasarına karşı daha duyarlı ve kanser gelişimine daha yatkın olma nedeninin, bireysel duyarlılığa bağlı DNA onarım mekanizmalarındaki farklılıklardan kaynaklandığı gösterilmiştir. Kansere yatkınlığı olan riskli bireylerin teşhisinde çeşitli analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden DNA hasarı ile kanser riskinin gösterilmesinde ve böylece hastalığın önlenmesi ve kontrolünün sağlanmasında kullanılan biyogöstergeleler mevcuttur. Bu biyogöstergelelerden tek hücre jel elektroforezi (single cell gel electrophoresis, SCGE) veya comet tekniği, DNA hasarının gösterilmesinde kullanılan, hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip oldukça başarılı bir genotoksisite yöntemidir (24,25). Günümüzde comet tekniği insan biyoizleme çalışmalarında sıklıkla lökosit ya da lenfosit, bukkal, nazal, gözyaşı kanalı, epitel ve sperm hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinde çalışılabilir olanağı sağlamaktadır (25). Comet tekniğinde, değerlendirme gözle ya da görüntüleme programı kullanılarak yapılmaktadır. Gözle değerlendirmede göç eden hücreler kuyruk uzunluğuna göre sınıflandırılırken, görüntüleme programları kullanılarak kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi gibi parametrelerin de belirlenmesi mümkündür (26). Günümüzde doz cevap ilişkisini daha iyi yansıtmaya sebebiyle kuyruktaki DNA yüzdesinin (%DNA_T) belirlenmesi diğer parametrelere göre daha çok tercih edilmektedir (27).

Bu çalışmanın amacı, kolorektal kanser hastaları ve birinci derece yakınlarının lenfositlerindeki muhtemel DNA hasarının comet tekniği ile incelenmesi ve bu tekniğin bir biyogösterge olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırılmasıdır.

MATERYAL VE METOD

Çalışma grubu;

Henüz hiç tedavi görmemiş kolorektal kanser tanısı konmuş hastalardan (n=26), birinci derece yakınlarından (n=26) ve sağlıklı kontrol grubundan (n=18) periferik kan örnekleri alınarak oluşturulmuştur. Çalışmada saklama koşullarından oluşabilecek hata payını azaltmak amacıyla kan alındıktan sonra 1-2 saat içinde çalışma yapılmıştır. Comet analizinde incelenen 100 hücrenin (bir lam için 50 hücre) her birinde kuyruktaki DNA yüzdesi oranlarının

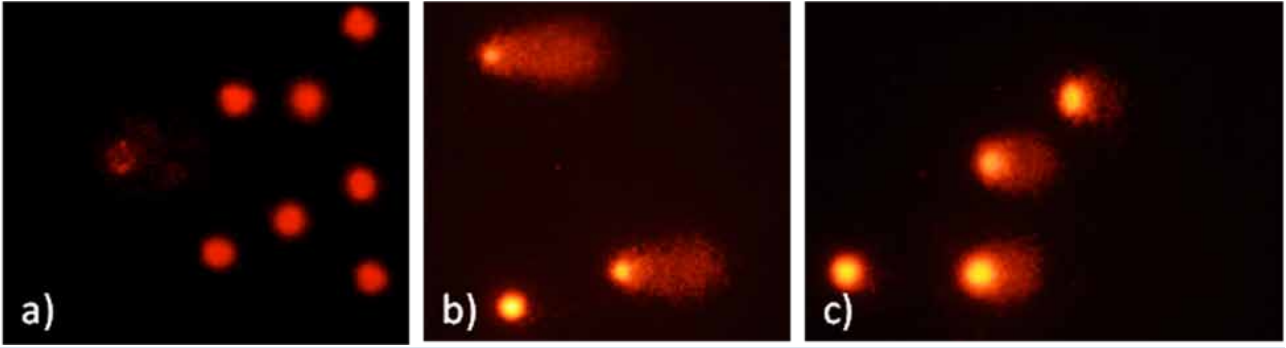
ortalaması "mean tail DNA%" (%DNA_T) olarak hesaplanmıştır. Yapılan anket değerlendirmelerinde sosyodemografik özellikler ve DNA hasarını etkileyebilecek faktörler göz önünde bulundurulmuştur. Bu çalışma "Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu"nun 25.01.2008 tarih ve MAR-YÇ-2007-0281 protokol nolu raporu ile onaylanmıştır.

Comet Tekniği (24)

Çalışmaya başlamadan önce %0.65'lik yüksek kaynama dereceli agar (HMA) distile suda hazırlandı. Lamlar agara batırıldı, oda sıcaklığında kurutuldu. Her örnek için iki lam çalışıldı. Her lam için bir ependorf tüpüne 1'er ml fosfat tamponu (PBS) konuldu (+4°C). 100 µl kan, tüplerdeki PBS (+4°C) üzerine eklendi. Karıştırıldı ve 10-15 dak. bekletildi. 100 µl histopak tüpün dibine eklendi. 1640 rpm, +4°C'de 5 dak. santrifüj edildi. Tripkan mavisi canlılık testi izole edilen lenfositlere uygulandığında canlılık oranları ≥99% olarak saptandı. Ayrılan lenfositlerden 100 µl alındı. Hücreler 37°C'deki 100 µl PBS içinde hazırlanmış %0.65'lik düşük kaynama dereceli agar (LMA) ile karıştırılarak önceden HMA ile kaplanıp kurutulmuş lama yayıldı. 32x64mm lamelle kapatılarak buzdolabında agar katılaşana kadar bekletildi. Lamel lamın yüzeyinden çekilerek liziz çözeltisinde bir gece +4°C'de bekletildi. Soğuk elektroforez çözeltisi tankın içine dolduruldu. 25 Volt 300 mA olacak şekilde çözelti miktarı ayarlandı. Lamlar tank içinde 20 dak. bekletildi. 30 dk 25 V, 300 mA'de elektroforez uygulandı. Elektroforezden çıkartılan lamlar 3 defa nötralizasyon tamponunda 5'er dak. bekletilerek nötrale edildi. Bu işlem sonrasında alkolle fiksasyon yapıldı. Bunun için önce %50'lik sonra %75'lik ve en son %100'lük alkol çözeltisi ile 5'er dak. bekletildi. Lamlar karanlık ortamda kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamlar serin karanlık ortamda saklandı.

Mikroskopta Değerlendirme

Hazırlanan her lam üzerine floresan renk vermesi için 90 µl etidyum bromür (EB) çözeltisinden damlatılarak ve lamelle kapatılarak boyaması yapıldı. Lamlar boyandıktan sonra Olympus BX51 marka floresan mikroskopta 'Comet Görüntü İşleme ve Analiz Programı Sistemi' (BAB Bs 200 Pro) programı kullanılarak değerlendirme yapıldı (Şekil 1).



Şekil 1: Comet görüntü analiz sistemi kamerası ile görüntülenen fotoğraflar
a) Kontrol grubundan bir bireye ait PKL-Comet görüntüsü
b) Kolorektal kanser tanılı bir olgunun PKL-Comet görüntüsü
c) Bir hasta yakınının PKL-Comet görüntüsü

Tablo 1: KRK hastaları, birinci derece yakınları ile kontrol grubunun genel özellikleri

	KRK Hasta (n=26)	Birinci Derece Yakın (n=26)	Kontrol (n=18)	P değeri
Yaş (Ort±SS)	64.69±8	38.77±12.42	50.67±21.47	P <0.001
Cinsiyet n (%)				
Erkek	13 (50)	13 (50)	9 (50)	P >0.05
Kadın	13 (50)	13 (50)	9 (50)	
Sigara n (%)				
İçmeyen	26 (100)	26 (100)	15 (83)	P <0.01
İçen (adet/gün)	0 (0)	0 (0)	3 (17)	

Ort±SS: ortalama±standart sapma,

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler, SPSS 17 programı kullanılarak analiz edildi. Her veri grubu için ortalama değer, standart sapma (\pm), frekans (%), en büyük ve en küçük değer arasındaki fark dahil olmak üzere kategorik değişkenler, tanımlayıcı istatistik ile belirlendi. Analiz sonucunda verilerin normal dağılım varsayımına uygun olup olmadığı Shapiro Wilk testi uygulanarak incelendi. Normal dağılıma uymayan bağımsız ikili gruplar arasındaki farklılıklar Mann Whitney U testi ile ölçülürken 3 veya daha fazla grubun karşılaştırılması için de Kruskal-Wallis testi uygulandı. Kruskal-Wallis test çözümü sonucunda farkın anlamlı bulunduğu veri gruplarında farka neden olan grubu belirlemek amacı ile Post-hoc ikili kıyaslamaları Tukey testi ile gerçekleştirildi. Risk faktörlerinin patoloji gelişimi ile ilişkisini belirlemek amacıyla ki kare testi uygulandı. İstatistiksel değerlendirme sonunda, $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Demografik özelliklerden yaş, cinsiyet, boy, kilo, mesleki maruziyet, sigara kullanımı, pasif içicilik durumu, alkol kullanımı, genetik hastalık hikayesi, vitamin ve ilaç kullanımı, beslenme şekli, röntgen (X ışınına maruziyet) arasındaki farkın anlamlılığı istatistiksel olarak değerlendirilmiş yaş hariç anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Gruplar arasındaki yaş ortalamaları kıyaslandığında birinci derece yakın grubunun yaş ortalamalarının düşük olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$). Hasta yakını grubu özellikle KRK hastalarının sağlıklı ve genç olan aile bireylerinden (oğlu/kızı) olması nedeniyle yaş ortalamaları daha küçük bulunmuştur.

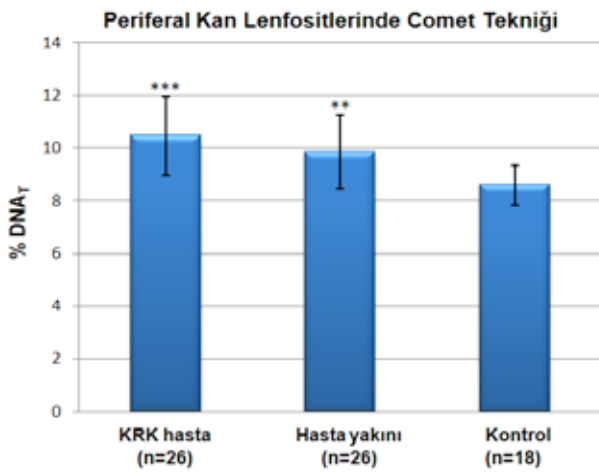
Tablo 1’de KRK hastaları, birinci derece yakınları ile kontrol grubu yaş, sigara içme durumu, cinsiyet gibi kriterler bakımından karşılaştırılması gösterilmektedir.

Periferik kan lenfositlerinde (PKL) comet tekniği uygulanması sonucunda KRK hastalarında elde edilen ortalama

Tablo 2: KRK tanısı konmuş olgular, birinci derece yakınları ve kontrol grubundaki bireylerin periferik kan lenfositlerinde comet tekniği ile elde edilen kuyruktaki %DNA_T değerlerinin kadın/erkek dağılımına göre grup içinde karşılaştırılması

	n	% DNA _T Ort±SS	P değeri
Kontrol	18	8.59±0.76	
Erkek	9	8.74±0.79	P >0.05
Kadın	9	8.43±0.74	
KRK hastaları	26	10.45±1.50	P <0.001 ^a
Erkek	13	10.63±1.69	P >0.05
Kadın	13	10.28±1.33	
Birinci derece yakın bireyler	26	9.83±1.40	P <0.01 ^b
Erkek	13	10.03±1.49	P >0.05 ^c
Kadın	13	9.63±1.33	P >0.05

Ort±SS: ortalama±standart sapma, a: KRK hastası ile kontrolün karşılaştırılması, b: Birinci derece yakın bireyler ile kontrolün karşılaştırılması, c: KRK hastası ile birinci derece yakın bireylerin karşılaştırılması



Şekil 2: KRK hasta, hasta yakını ve kontrol gruplarında PKL Comet değerlerinin (Ort±SS) karşılaştırılması; KRK hastaları ve hasta yakınlarının kontrole göre anlamlılığı sırasıyla *** p<0.001, ** p<0.01

%DNA_T değerleri (10.45±1.50), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (8.59±0.76) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p <0.001). Benzer şekilde KRK hastalarının birinci derece yakınları (9.83±1.40) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır (p <0.01). KRK hastaları ile birinci derece yakınları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p>0.05) (Tablo 2). Şekil 2'de KRK hastası, hasta yakını ve kontrol gruplarında PKL comet değerlerinin karşılaştırılması gösterilmektedir. KRK hastalığına bağlı olarak ortaya çıkan DNA hasarına ek olarak cinsiyet ve sigaranın DNA hasarı üzerindeki etkisini göstermek amacıyla değerlendirme yapıldığında iki risk faktörünün de etkisinin grup içi ve gruplar arası istatistiksel bir farklılığa sebep olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda KRK gelişiminin cinsiyete göre farklılık göstermesi açısın-

dan grup içi değerlendirilme yapıldığında erkek bireyler ile kadın bireyler arasında ortalama %DNA_T değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir (p >0.05) (Tablo 2). Sigara içme durumuna göre kontrol grubunda ortalama %DNA_T değerleri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir (p >0.05). Tüm çalışma gruplarından birer gönüllüye ait comet tekniğinin mikroskopta değerlendirilen görüntüleri Şekil 1'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

KRK'in, batılı toplumlarda sık görülen önemli sağlık problemlerinden biri olduğu dünyada erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen kanserler arasında üçüncü sırada yer aldığı bildirilmiştir (28). Hastaların %75'inde KRK'nın sporadik formu görülürken, %25'inde genetik faktörlerin (gen ve çevresel faktörler) rol oynadığı bildirilmiştir. Bu oranın %5-6'sının ise hastalığın sadece kalıtsal mutasyonlardan kaynaklandığı bildirilmektedir (29-31). Birçok çevresel kökenli hastalıkta olduğu gibi KRK gelişiminde de genetik faktörler, yaşam tarzı ve maruziyet hikayesi kadar önem taşımaktadır. Bireyin genetik duyarlılığının KRK gelişiminde son derece önemli olduğu, bazı bireylerin KRK'ya daha yatkın olduğunun gösterilmesi ile doğrulanmaktadır (31,32). Son yıllarda yapılan birçok çalışma ile bazı bireylerin neden kansere daha yatkın olduğu sorusunun cevabının bulunması için çalışmalar yapılmakta ve bu amaçla genetik polimorfizmin kansere yakalanma riski ile ilişkisi araştırılmaktadır. Duyarlılık ile ilgili, geniş popülasyonların dahil edildiği uluslararası çalışmalarda sonuçların istatistiksel olarak daha anlamlı olabilmesi için ksenobiyotik metabolizmasında ve

DNA onarımında rol oynayan enzimlerin incelenmesinin yanında, maruziyetin ve erken dönem genotoksik etkilerin değerlendirilmesinin de gerekli olduğu bildirilmiştir (33).

Kanser gelişiminde rol oynayan bireysel duyarlılığın iyi anlaşılması, gerek ailesel geçiş gösteren gerekse kendiliğinden ortaya çıkan KRK'nın önceden belirlenmesi için önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar KRK'nın 50 yaşından sonra ailede en az bir vakada görülmesinin kolorektal kanser riskini 2-3 kat, 45 yaşın altında görülmesinin ise 3-6 kat artırdığını göstermektedir. Ailede en az iki jenerasyonda tutulum olmasının ise genetik yatkınlıkla ilgili genlerde mutasyonların olduğunu düşündürmektedir (31). Kolon kanserli hastaların birinci derece yakın akrabalarında kansere yakalanma riskinin daha yüksek olduğu Foulkes et al (1996)'nın yaptığı çalışma ile gösterilmiştir (4).

Kolorektal karsinogenezde genetik olayların tanımlanmasında son yıllarda çok hızlı ilerlemeler olmuştur. Bu bilginin oluşmasının başlıca nedeni moleküler genetikteki ilerlemelerdir (6). Günümüzde genotoksikite yöntemleri de dâhil birçok yöntemle malign değişimlerle ilişkili olan kromozomal değişiklikler, DNA hasarı ve bu değişimlerde bireysel duyarlılığın etkisi izlenebilmektedir. Çalışmamızda KRK hastalarında, birinci derece yakınlarında ve kontrol grubunda, periferik kan lenfositlerinde DNA hasarı comet tekniği uygulanarak belirlenmiştir.

Comet tekniği çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun tayinini amaçlayan in vivo ve in vitro biyoizleme çalışmalarında kullanılan ve genetik toksikolojide yaygın kullanım alanı olan bir biyogösterge olarak ve ayrıca çeşitli kanser türlerinde genomik instabilitenin gösterilmesinde kullanılmaktadır (34-36). Çalışmamızda periferik kan lenfositlerinde comet tekniği uygulanması sonucun-

da kolorektal kanser hastalarında elde edilen ortalama %DNA₊ değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur (p <0.001). Benzer şekilde KRK hastalarının birinci derece yakınları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (p <0.001). Kolorektal kanser hastaları ile birinci derece yakınları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (p >0.05).

Çalışmamıza benzer şekilde, Baltacı ve ark (2003)'nın 20 kolorektal kanserli hastada sitogenetik aberasyon ve comet tekniği ile yaptıkları çalışma sonucunda kontrole kıyasla anlamlı düzeyde yüksek aberasyon (4 kişide sayısal ve 6 kişide yapısal aberasyon) ve DNA hasarı görüldüğü bildirilmiştir (21).

Sonuç olarak, KRK hastalarında ve birinci derece yakınlarında grup içi değerlendirme yapıldığında DNA hasarının cinsiyete bağlı anlamlı düzeyde değişmediği (p >0.05) ancak kontrole kıyasla KRK patolojisi varlığında DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı bir farka yol açtığı ayrıca sağlıklı bireylere kıyasla birinci derece yakın olan bireylerde daha yüksek düzeyde DNA hasarı bulunduğu gösterilmiştir. Bireyin genetik duyarlılığı KRK gelişiminde son derece önemlidir. KRK'e yatkınlığın ve sağlık riskinin öngörülmesinde DNA hasarının comet tekniği ile belirlenmesinin oldukça yararlı olabileceği gösterilmiştir.

Teşekkür

Dr. Ayfer Beceren'in doktora tezi Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı (SAG-C-DRP-030108-0010) tarafından projelendirilmiş olup bu makale tez kaynaklıdır.

KAYNAKLAR

1. Yardım N, Mollahaliloğlu S, Bora Başara B. Türkiyede Kanser Durumu ve Uluslararası Göstergeler İle Uyumun Değerlendirilmesi. İçinde: Türkiye'de Kanser Kontrolü. Eds. Tuncer AM, Özgül N, Olcayto E, Gültekin M. T.C. Sağlık Bakanlığı, Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Koza Matbaacılık, Ankara, 2009. p. 51-63.
2. Potter JD, Hunter D. Colorectal Cancer: Epidemiology. In: Genetics of Colorectal Cancer. Eds: Potter JD, Lindor NM, Springer, USA, 2009. p.5-25.
3. Kılıç S, Kömürçü Ş, Rzaev M, Özet A, Kır T, Arpacı F, Açık CH, Öztürk B, Oğur R, Ataergin S, Kuzhan O, Hadse M. Gata Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda izlenen hastaların bazı sosyodemografik özellikleri ve tanıları. Gülhane Tıp Derg. 2004;46(2):115-124.
4. Foulkes WD, Bolduc N, Lambert D, Ginsburg O, Olien L, Yandell DW, Tonin PN, Narod SA. Increased incidence of cancer in first degree relatives of women with double primary carcinomas of the breast and colon. J Med Genet. 1996;33:534-539.
5. Taşçıoğlu N, Taheri S, Saatçi Ç, Özkul Y. Gastrointestinal sistem kanserlerinde metilentetrahidrofolat redüktaz geni 677C→T polimorfizminin incelenmesi. Sağlık Bilimleri Dergisi. 2006;15(1): 41-45.
6. Eraslan E, Turkyay C. Kolorektal kanser etyolojisi ve predispozan faktörler. Güncel Gastroenteroloji. 2007;11:19-26.
7. Polat MH, Caner M. Kolon kanserli hastalarda dermatoglik bulgular. Ege Tıp Dergisi. 2000;39:39-44.
8. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer. N Engl J Med. 2000;343(2): 78-85.
9. Slattey ML, Kerber RA. Family history of cancer and colon cancer risk: the Utah Population Database. J Natl Cancer Inst. 1994;86(21):1618-1626.

10. Libutti SK, Saltz LB, Teper JE. Colon Cancer. In: Devita, Hellman & Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. Eds: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, 8th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008. p.1233-1286.
11. Akay C. Biyomarkörlerin Toksikolojide Kullanımı. *Gülhane Tıp Dergisi*. 2004;46(1):73-83.
12. Au WW. Usefulness of biomarkers in population studies: From exposure to susceptibility and to prediction of cancer. *Int J Hyg Environ Health*. 2007;210:239-246.
13. Irvine T, Scott M, Clark Cl. A small rise in CEA is sensitive for recurrence after surgery for colorectal cancer. *Tumori*. 2007;9:527-531.
14. Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dal Pra A, De Ferrari M, Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Padovani P, Sbrana I, Vecchio D, Puntoni R. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of a future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995;79:133-135.
15. Bonassi S, Hagmar L, Stromberg U, Montagud AH, Tinnerberg H, Forni A, Heikkilä P, Wanders S, Wilhardt P, Hansteen IL, Knudsen LE, Norppa H. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res*. 2000;60:1619-1625.
16. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Stromberg U, Rossner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabia-nova E, Sram RJ, Knudsen LE, Barale R, Fucic A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res*. 2006;600:37-45.
17. Wogan GN. Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: recent progress and avenues for future research. *Environ Health Perspect*. 1992;98:167-178.
18. McKenna DJ, McKeown SR, McKelvey-Martin V. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis*. 2008;23: 183-190.
19. Pirc-Danoewinata H, Bull JP, Okamoto I, Karner J, Breiteneder S, Liebhardt A, Budinsky A, Marosi C. Cytogenetic findings in colorectal cancer mirror multistep evolution of colorectal cancer, *Wien Klin Wochenschr*. 1996;108:752-758.
20. Gebhart E, Romahn R, Schneider A, Hoffmann M, Rau D, Tittelbachl H. Cytogenetic studies in lymphocytes of patients with rectal cancer. *Environ Health Perspect*. 1993;101(3):169-175.
21. Baltacı V, Sardas S, Aytac B, Cakar S, Karakaya AE. Assessment of cytogenetic aberrations and comet assay in colorectal adenocarcinomas. *Tumori*. 2003;89:305-310.
22. Bardi G, Johansson B, Pandis N, Bak-Jensen E, Orndal C, Heim S, Mandahl N, Andrén-Sandberg A, Mitelman F. Cytogenetic aberrations in colorectal adenocarcinomas and their correlation with clinicopathologic features. *Cancer*. 1993;71:306-314.
23. Bardi G, Sukhikh T, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S. Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995;12(2):97-109.
24. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-191.
25. Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. Detection of DNA Damage in *Drosophila* and Mouse. In: The Comet Assay in Toxicology. Eds: Dhawan A, Anderson D, The Royal Society of Chemistry Publishing, UK, 2009. p. 151-170.
26. Collins AR. The Comet Assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol*. 2002;203:163-177.
27. Moller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res*. 2006;612:84-104.
28. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Small intestine & colon, Adenocarcinoma. Chapter 7, In: Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia PA. 2010.
29. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(10):2992-3003.
30. Butterworth AS, Higgins JPT, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: A meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2006;42:216-227.
31. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppede F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:1-19.
32. Ahsan H, Neugut AI, Garbowski GC, Jacobson JS, Forde KA, Treat MR, Wayne JD. Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 1998;128(11):900-905.
33. Norppa H. Genetic susceptibility, biomarker response, and cancer. *Mutat Res*. 2003;544:339-349.
34. Colleu-Durel S, Guitton N, Nourgalieva K, Legue F, Lévêque J, Danic B, Chenal C. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay): a simple technique to show genomic instability in sporadic breast cancer. *Eur J Cancer*. 2004;40(3):445-451.
35. Lou J, He J, Zheng Z, Jin L, Chen Z, Chen S, Lin Y, Xu S. Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. *Mutat Res*. 2007;617(1-2):104-110.
36. McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A. The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay): A European Review, *Mutat Res*. 1993;288:47-63.