SEÇİL AKSOY

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2019

T.C.
BURSA ULUDAĞ
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

KODLAMA YAPMAYAN UZUN RNA'LARIN KOLON TÜMÖRLERİNDE PROGNOZ AÇISINDAN ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI

Seçil AKSOY

(Doktora Tezi)

BURSA-2019

T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KODLAMA YAPMAYAN UZUN RNA'LARIN KOLON TÜMÖRLERİNDE PROGNOZ AÇISINDAN ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI

Seçil AKSOY

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Berrin TUNCA

KUAP(T)-2014/35, DDP(T)12018/4

BURSA-2019

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum '**Kodlama yapmayan uzun RNA'ların kolon tümörlerinde prognoz açısından öneminin araştırılması**' adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Adı Soyadı
Seçil AKSOY

Tarih ve İmza
17.09.2019

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Seçil AKSOY tarafından hazırlanan kodlama yapmayan uzun rna'ların kolon tümörlerinde prognoz açısından öneminin araştırılması konulu Doktora tezi 13/09/2015 günü, 10:30 - 12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	**İmza**
Tez Danışmanı	**Prof. Dr. Berrin TUNCA**	
Üye	**Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER**	
Üye	**Prof. Dr. Ersin ÖZTÜRK**	
Üye	**Prof. Dr. Didem TURGUT ÇOŞAN**	
Üye	**Doc. Dr. Gürler AKPINAR**	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

...13.../...07.../...2015

Adı Soyadı: Seçil AKSOY
Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji
Tez Konusu: Kodlama yapmayan uzun rna'ların kolon tümörlerinde prognoz açısından öneminin araştırılması

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	☑	☐	
Dış Kapak Sayfası	☑	☐	
İç Kapak Sayfası	☑	☐	
Kabul Onay Sayfası	☑	☐	
Sayfa Düzeni	☑	☐	
İçindekiler Sayfası	☑	☐	
Yazı Karakteri	☑	☐	
Satır Aralıkları	☑	☐	
Başlıklar	☑	☐	
Sayfa Numaraları	☑	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☑	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☑	☐	
Kaynaklar	☑	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Berrin TUNCA

İmza:



İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI ..... Hata! Yer işareti tanımlı değil.

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE Hata! Yer işareti tanımlı değil.

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU ..... Hata! Yer işareti tanımlı değil.

İÇİNDEKİLER ..... **IV**

TÜRKÇE ÖZET ..... **IX**

İNGİLİZCE ÖZET ..... **X**

1. GİRİŞ **11**

2. GENEL BİLGİLER **15**

2.1. Kolorektal Kanser **15**

2.1.1. Kolon Kanseri **16**

2.1.1.1. KK Oluşumunda Etkili Risk Faktörleri **18**

2.1.1.2. KK'larda Tanı ve Tarama **19**

2.1.1.3. KK'larda Tümör Evrelemesi **20**

2.1.1.4. KK'larda Tedavi **22**

2.1.1.4.1. KK'da İlaç Direnç Mekanizmaları **26**

2.1.1.5. KK'ların Oluşumunda Etkili Moleküler Mekanizmalar **27**

2.1.1.5.1. Ailsel KK'lar **28**

2.1.1.5.1.1. Poliposiz Olmayan KK Sendromları **28**

2.1.1.5.1.2. Poliposiz Olan KK Sendromları **29**

2.1.1.5.2. Sporadik KK'larda Moleküler Oluşum Mekanizmaları **30**

2.1.1.5.2.1. Kromozomal Kararsızlık **31**

2.1.1.5.2.1.1. KK'larda APC'nin Önemi ve Wnt Sinyal Yolağı **31**

2.1.1.5.2.1.2. KK'larda KRAS önemi ve RAS Sinyal Yolağı **32**

2.1.1.5.2.1.3. KK'larda 18q Kaybı **33**

2.1.1.5.2.1.4.KK'larda P53'ün Önemi **34**

2.1.1.5.2.2.Mikrosatellit Kararsızlık **34**

2.1.1.5.3. Sporadik KK'larda Epigenetik Mekanizmalar **35**

2.1.1.5.3.1. DNA Temelli Epigenetik Düzenlemeler 35
2.1.1.5.3.1.1. DNA Promotör Bölge Metilasyonları 35
2.1.1.5.3.1.2.Histon Modifikasyonları 35
2.1.1.5.3.2. RNA Temelli Epigenetik Düzenlemeler: Kodlama Yapmayan RNA'lar 38
2.1.1.5.3.2.1.Kodlama Yapmayan Küçük RNA'lar 39
2.1.1.5.3.2.1. Kodlama Yapmayan Büyük RNA'lar 41
2.1.1.6.KK'larda Metastaz Oluşumu 50
2.1.1.6.1. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş 50
2.1.6.1.1. EMT sürecinde E-Kaderin Düzenlenmesi 52
2.1.6.1.2. EMT Sürecin de Transkripsiyon Faktörleri 52
2.1.6.1.3. EMT sürecinde LncRNA'ların rolü 53
2.1.1.6.2. *MACC1* ve *NM23-H1* Ekspresyon Değişimleri 54
2.1.1.6.3. Tümör Tomurcuklanması 54
3. GEREÇ VE YÖNTEM 57
3.1. Gereçler 57
3.1.1 Kullanılan Aletler ve Cihazlar 57
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler 59
3.2. Yöntem 62
3.2.1 Evre I/II Kolon Tümörlerinde Takip Sırasında Oluşan Sistemik Nüksün Belirlenmesinde Kullanılabilecek Belirteçlerin Araştırılması 62
3.2.1.1. Hasta Seçimi 62
3.2.1.2. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi ve Materyallerin Temini 63
3.2.1.3. Çalışma Gruplarının Klinik ve Patolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .. 64
3.2.1.3.1. Erken Evre Kolon Tümörlerinde Tümör Tomurcuklanmasının Belirlenmesi 64
3.2.1.4. Erken Evre Kolon Tümörlerinde MSI Analizi 64
3.2.1.4.1. DNA İzolasyonu 65
3.2.1.4.1.1. Dokuların Parafinden Uzaklaştırılması 65
3.2.1.4.1.2. Dokuların Parçalanması ve DNA' nın Elde Edilmesi 65
3.2.1.4.2. Kapiller Elektroforez Yöntemi ile DNA Fragment Analizi 66
3.2.1.4.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 66
3.2.1.4.2.2. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi 68

3.2.1.4.3. MSI Analizi ve Değerlendirilmesi..... 68

3.2.1.5. Erken Evre Kolon Tümörlerinde EMT Mekanizmasının Aktivitesinin Belirlenmesi 69

3.2.1.5.1 RNA İzolasyonu 69

3.2.1.5.1. Dokuların Parçalanması ve RNA' nın Elde Edilmesi..... 70

3.2.1.5.2. cDNA Sentezi..... 70

3.2.2.5.3. RT-PCR Aşaması..... 71

3.2.1.6. Tedavi Sonrası Sistemik Nüks Gelişen Erken Evre Kolon Tümörlerinde LncRNA Ekspresyon Profillerinin Analiz Edilmesi 72

3.2.2. Hastalarda Değerlendirilen Biyobelirteçlerin İn-vitro Analizler ile İncelenmesi 73

3.2.2.1. Hücre Hattının Seçimi ve Temini..... 74

3.2.2.2. Hücrelerin Açılması ve Üretilmesi 74

3.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması 74

3.2.2.4. Hücre Sayımı..... 75

3.2.2.5 Hücrelerin Dondurulması ve Stoklanması 75

3.2.2.6. 5FU' nun Temini ve Hazırlanması..... 75

3.2.2.7. HT-29 Hücrelerinde 5FU Direncinin Geliştirilmesi 76

Şekil 26. HT-29FUR hücrelerinin oluşum süreci (Toden ve ark.,2015)..... 77

3.2.2.8. HT-29FUR Hücrelerinde 5FU Direncinin Kanıtlanması ve Kontrol Edilmesi..... 78

3.2.2.8.1. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi..... 78

3.2.2.8.2. Apoptoz Analizi..... 79

3.2.2.8.3. Kolon Hücrelerinde 5FU Direnci Oluşumuna Neden Olabilecek Hücresel Mekanizmalarda Görev Yapan Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin İncelenmesi 80

Şekil 28. RNA izolasyonlarının yapıldığı hücre grupları. 81

3.2.2.8.3.1. RNA İzolasyonu 81

3.2.2.8.3.2. Complamenter DNA (cDNA) Sentezi..... 82

3.2.2.8.3.3. 5FU Direnci ile İlişkili Genlerin ekspresyon seviyelerinin RT-PCR ile incelenmesi..... 83

3.2.2.9. 5FU' ya Karşı Direnç Gelişim Sürecinde Hücrelerinde LncRNA' ların Ekspresyon Değişimlerinin İncelenmesi 84

3.2.2.9.1. cDNA Sentezi..... 85

3.2.2.9.2. CCAT1, PTENP1, HOTAIR ve MALAT1' in Ekspresyon Profillerinin RT-PCR Analizi ile Belirlenmesi 85

3.2.2.10. 5FU' ya Karşı Direnç Gelişim Sürecinde EMT Yolağının Aktivitesinin İncelenmesi 85

3.2.2.11. 5FU' ya Karşı Direnç Gelişim Sürecinde Hücrelerinnin Agresivitelerinin ve Metastatik Özelliklerinin Belirlenmesi 85

3.2.2.11.1 5FU' ya Karşı Direnç Gelişim Sürecinde *MACC1, MET* ve *NM-23H1* Genlerinin Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi 86

3.2.2.11.1 Migrasyon ve İnvazyon Analizi 86

3.2.2.11.2. Koloni Oluşumu Analizi 87

3.2.3. İstatistiksel Analiz 88

4. BULGULAR 89

4.1. Hastaların Klinik ve Patolojik Özellikleri 90

4.1.1. Erken Evre KK'larda Tümör Tomurcuklanması 91

4.1.2. Erken Evre KK'ların Tümör Biyolojisi 92

4.1.2.1 Erken Evre KK'larda MSI durumu 92

4.1.2.2. Erken Evre KK'larda Metastaz ile İlişkili Genlerin Aktivasyonu 94

4.1.2.3. Erken Evre KK'larda EMT Belirteçlerinin Ekspresyon Profilleri 96

4.1.2.3.1. Erken Evre KK'larda EMT Belirteçlerinin Birbirleri ile İlişkisi .. 102

4.1.3. Erken Evre KK'larda LncRNA Ekspresyon Profilleri 106

4.1.3.1 Erken Evre KK'larda LncRNA' ların Tümörün Klinik ve Patolojik Özellikleri Üzerine Etkileri 110

4.1.3.2. Erken Evre KK'larda LncRNA'ların Tümör Biyolojisi Üzerine Etkileri 111

4.1.3.3. Erken Evre KK'larda LncRNA'ların EMT ile İlişkisi 112

4.1.4. Erken Evre KK'larda Prognozu Etkileyen Faktörler 115

4.1.4.1. Erken Evre KK'larda Hastalıksız Sağ Kalım Süresini Etkileyen Faktörler 118

4.1.4.1.2 Erken Evre KK'larda Prognozu Etkileyen Faktörlerin Çok Değişkenli Modelleme ile Gösterilmesi 121

4.2. HT-29FUR Hücrelerinin Oluşturulması 123

4.2.1. HT-29'da 5FU' nun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi 123

4.2.1.1 5FU' nun Direnç Kazanım Sürecindeki HT-29 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi 128

4.2.2. 5FU' nun HT-29FUR Hücrelerinde Apoptotik Etkisi 135

4.3. 5FU' nun Kolon Kanser Hücre Hatlarının Morfolojileri Üzerine Etkisi 143

4.3. KKHücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinde EMT 149

4.4. KK Hücrelerinin 5FU Direnci Kazanım Sürecinde LncRNA'ların Ekspresyon Profilleri 154

4.6. KK hücrelerinin 5FU Direnci Kazanım Sürecinde Hücrelerin Metastatik Özelliklerinin Gösterilmesi..... 167

4.6.1. KK Hücrelerinin 5FU'ya Karşı Kazanım Sürecinde Hücrelerde MACC1 Ve NM23-H1 ' inEkspresyon Profilleri 168

4.6.2. KK Hücrelerinin 5FU'ya Karşı Kazanım Sürecinde Hücrelerin İnvazyon Özellikleri 170

4.6.3. KK Hücrelerinin 5FU'ya Karşı Kazanım Sürecinde Hücrelerin Koloni Oluşturma Yetenekleri 177

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 185

6. KAYNAKLAR 199

7. SİMGELER VE KISALTMALAR 214

8. TEŞEKKÜR 215

9. ÖZGEÇMİŞ 216

TÜRKÇE ÖZET

Kodlama Yapmayan Uzun RNA' ların Kolon Tümörlerinde Prognoz Açısından Öneminin Araştırılması

Erken evre kolon kanserlerinde (KK) tedavi protokollerini belirlemede ve nüksü öngörmede mevcut parametreler yetersiz kalmaktadır. Ayrıca kötü prognostik faktörleri olmayan ancak nüks potansiyeli belirlenen erken evre KK'ların standart tedavilere verecekleri yanıt da bilinmemektedir. Mevcut tez çalışmasında kötü prognostik faktörleri bulunmayan erken evre KK'larda prognozu belirlemede kullanılabilecek parametrelerin tanımlanması ve belirlenmesi öngörülen parametrelerden yararlanılarak adjuvan tedavi planlanacak tümörlerde, ilaç direnç durumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Mevcut tez çalışmasında, 2005-2013 yılları arasında erken evre (T1-3N0M0), herhangi bir kötü prognostik faktörü bulunmayan, KK tanısı alan 126 hasta değerlendirildi. Nüks potansiyeli belirlenen hastaların tedaviye verecekleri yanıtı öngörmek için 5FU'ya dirençli HT29FUR hücreleri oluşturularak, bu hücrelerin metastatik özellikleri ve tümör dokularda incelenen parametreler değerlendirildi. İlaç direnç gelişimi ve metastaz arasındaki olası sinerji, fonksiyonel analizler (yara iyileştirmesi ve koloni oluşumu) ile incelendi. 126 hastanın takip sırasında 21'inde nüks gelişimi belirlendi. *MACC1*'in ve MALAT1'in yüksek, PTENP1'in ve *NM23-H1*'in ise düşük ekspresyonları ve tümör tomurcuklanması varlığı, erken evre KK tümörlerinin nüks gelişimi ile ilişkili olarak belirledi ($p<0.05$). İlaç direncini öngörmek için oluşturulan HT-29FUR hücrelerinde de MALAT1'in yüksek, PTENP1'in düşük ekspresyonu tanımlandı. Bununla birlikte fonksiyonel analizler ile ilaç direnci oluşumu sırasında hücrelerin metastaz yetenekleri de kazandıkları kanıtlandı. Sonuç olarak, MALAT1 ve PTENP1'in erken evre KK'larda nüks potansiyelini belirlemede ideal birer biyobelirteç adayı oldukları ve bu tip tümörlerde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde bu LncRNA'ların hücre içinde hedeflenerek tedavi sürecine katkı sağlayabileceklerinin mümkün olabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Erken Evre, Kolon Kanseri (KK), Kodlama Yapmayan Uzun RNA'lar (LncRNA), İlaç Dirençliliği, Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)

İNGİLİZCE ÖZET

Invastigation of the Long Non Coding RNAs for Prognostic Implications in The Colon Tumors

In early stage colon cancer (CC), current parameters are insufficient to determine the treatment protocols and to predict recurrence. In addition, the response to early treatment of early stage CBCs with poor prognostic factors but with a potential for recurrence is unknown. In the present study, it was aimed to define the parameters that can be used to determine the prognosis in early stage CCI without bad prognostic factors and to evaluate the drug resistance status in tumors that will be planned adjuvant treatment by using the parameters that are intended to be determined. In the present study, 126 patients with early stage (T1-3N0M0) who did not have any poor prognostic factors were evaluated. 5FU-resistant HT29FUR cells were formed to predict the response of patients to whom recurrence potential was determined and the metastatic characteristics of these cells and the parameters examined in tumor tissues were evaluated. The possible synergy between drug resistance development and metastasis was examined by functional analysis (wound healing and colony formation). Recurrence was detected in 21 of 126 patients during follow-up. The presence of high expression of *MACC1* and MALAT1, low expression of PTENP1 and *NM23-H1* and tumor budding were found to be associated with the recurrence of early stage tumors ($p < 0.05$). High expression of MALAT1 and low expression of PTENP1 were determined in HT-29FUR cells which were established to predict drug resistance. However, functional analysis showed that the cells gained metastasis ability during drug resistance formation. As a result, it was determined that MALAT1 and PTENP1 are ideal biomarker candidates to determine the recurrence potential in early stage CC and these LncRNAs will be targeted in the cell and contribute to the treatment process in the development of new treatment strategies for such tumors.

.**Keywords:** Early stage, Colon cancer (CC), Long non-coding RNA (LncRNA), Drug resistance, Epithelial mesenchymal transition (EMT)

1. GİRİŞ

Kolon Kanseri (KK) karmaşık bir sürece sahip olan ve tüm dünyada en yaygın görülen kanserler arasında 3. sırada yer almaktadır. Sporadik ya da ailesel kökenli olarak gelişen bu tümörler, kansere bağlı ölümlerinde başlıca sebepleri arasında yer almaktadır. KK normal dokuda büyümeyi kontrol eden moleküler mekanizmaların bozulmasına yol açan bir seri genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi sonucunda meydana gelmektedir. KK'de tedavi protokolleri, histopatolojik yöntemler ile belirlenen tümör tutulumu, lenf nodu metastazı ve uzak organ metastazına göre oluşturulmaktadır. Bu evreleme sistemine göre lenf nodu metastazı ve/veya uzak organ metastazı bulunmayan kolon adenokarsinomları erken evre olarak tanımlanmakta ve bu hastalara sadece küratif cerrahi rezeksiyon uygulanmaktadır. Ancak müsinöz komponent, taşlı yüzük hücreli karsinom tanısı, perinöral, vasküler ve/veya lenfatik invazyon pozitifliği erken evre tümörlerde kötü prognostik faktörler var ise bu grup yüksek risk olarak tanımlanmaktadır. Erken evre de ise sadece kötü prognoza sahip olacağı düşünülen bu tümörlere adjuvant tedavi uygulanmaktadır. Ancak kötü prognostik faktörleri bulunmayan erken evre kolon tümörlerinin de yaklaşık %15'inde küratif rezeksiyon yetersiz kalmakta ve hastaların ilk 5 yıllık takip süreçlerinde sistemik nüks olarak tanımlanan uzak organ metastazı görülmektedir.

Metastaz, kanser hücrelerinin köken aldıkları bölgeden, invazyon ve migrasyon yetenekleri kazanarak, vücudun farklı doku ve organlarına yayılmasıdır. Bu, anjiyogenez, invazyon, migrasyon-motilite, extravazasyon ve proliferasyon gibi birbirleriyle ilişkili bir dizi kompleks ve çok basamaklı olaylar zinciri ile gerçekleşmektedir.

Tıp alanında son dönemde elde edilen tüm gelişmelere rağmen metastaz gelişimi ile ilişkili yeterli öncül belirteç belirlenememiştir. Günümüzde KK tanı ve tedavisinde ki en önemli problemler arasında metastaz gelişimi kadar, birçok hastada meydana gelen ilaç dirençliliği de yer almaktadır. Yapılan fonksiyonel analizlerde bu iki sürecin EMT mekanizmasını kullanarak birbirlerini desteklediği gösterilmektedir.

EMT, özellikle epitel kaynaklı tümörlerin metastaz oluşumunda etkili temel mekanizmalardan olarak görülmektedir. EMT sürecine dahil olan tümör hücreleri kök hücre özelliği gösterdikleri ve çoklu ilaç direncine sahip olduklarını bilinmektedir.

5FU, kolorektal kanser tedaviside en yaygın kullanılan bir stotoksik kemoterapi ilacıdır. Bu ilaç, Timidin Fosforilaz (TF) ile florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), florodeoksiüridin trifosfat (FdUMTP) ve florodeoksiüridin trifosfat (FuTP) şeklinde üç adet aktif metabolite çevrilmektedir. Tümör hücrelerinde bu aktif metabolitler RNA' nın ve DNA' nın yapısına girerek yanlış eşleşme onarımı mekanizmasını aktive ederek hücrede ölüm yolaklarını uyarmaktadır. Bununla birlikte aktif metabolitler, Timidin sentetaz (TS) enzimini inaktive ederek hücre içeresinde deoksinükleotidlerin azalmasına ve DNA' da tek iplik ya da çift iplik kırıklarına yol açarak hücrenin apoptoza gitmesini sağlamaktadırlar. Ancak hastaların %40' ın da 5FU direnci ve buna bağlı sistemik/lokal nüks oluşmaktadır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda 5FU direnci, düşük TS enzim sentezi, TS geninde homozigot TSER*3 polimorfizminin varlığı, p53 mutasyonları, DNA yanlış eşleşme onarım mekanizmasındaki kayıplar (MSI) gibi genetik değişimlerin oluşumu ile açıklanmıştır. Ancak bu genotiplerin herhangi birine sahip olmayan, 5FU tedavisinden tam yanıt beklenen hastaların bir kısmında da direnç gelişmektedir. Sistemik tedavi gören KRK hastalarında kemoresistansı öngörmek ve direnci kırmak için ilk adım olarak direnç mekanizmalarını net bir şekilde belirlemek esastır.

Son yıllarda, moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler ile hücre biyolojisinde etkili olan yeni moleküller tanımlanmaya başlanmış, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine dönüşümü gerçekleşmeyen RNA molekülleri keşfedilmiştir. Protein kodlamayan RNA' lar son dönemde oldukça fazla bilim adamı tarafından çalışılmaya başlanmıştır. Değişik nükleotid sayısı içeren bu RNA molekülleri sahip oldukları büyüklüklere göre, protein kodlamayan küçük RNAlar (20-25 nükleotid) ve Kodlama yapmayan uzun RNA'lar (LncRNA) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kodlamayan RNA' lar ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda daha çok, küçük RNA molekülleri olarak tanımlanan mikroRNA' lar (miRNA) üzerinde yoğunlaşılmıştır. Proje ekibimiz tarafından da gerçekleştirilen önceki çalışmalarda, Türk populasyonuna ait sporadik olarak gelişen KK hastalarında, evreler arası biyobelirteç olabilecek miRNA' ların

ekspresyon profilleri değerlendirilmiştir (2009/6). Araştırma ekibimizin gerçekleştirdiği bu proje sonucunda, KK gelişiminde genetik mekanizmalar kadar epigenetik mekanizmalarında önemli olduğu ve miRNA' ların karsinogenez sürecinde, transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesinde etkili oldukları vurgulanmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar gösteriyor ki RNA interferans olarak adlandırılan gen susturma mekanizması miRNA' lar ile sınırlı kalmadığı gösterilmiştir. Son dönemde gerçekleştirilen araştırmalar ile transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesinin yanı sıra kromatin yapısında ve pre-mRNA' nın olgunlaştırılmasında görev alan LncRNA' ların da miRNA' lar gibi hücrede epigenetik mekanizmalarda görev aldıkları gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar ile LncRNA'ların transkripsiyon öncesinde, transpkripsiyon sırasında ve sonrasında mRNA'ları, miRNA'ları ve çeşitli proteinleri etkileyerek karsinogenez sürecinde temel düzenleyici sinyal yolaklarında görev aldıkları vurgulanmaktadır. Kanser ve LncRNA' lar ile yapılan çalışmalar sonucunda, ANRIL, XİST, KCNQ1OT1, MALAT1 ve PTENP1 başta olmak üzere onlarca LncRNA tanımlanmış ve bunların birçoğunun kanser spesifik biyobelirteçler olabileceği gösterilmiştir. LncRNA'lar ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, bu moleküllerin EMT sürecinde, ilaç dirençliliğinde ve tümörün metastaz sürecinde görev aldıklarını ifade etmektedir.

Çalışma ekibimiz tarafından 2009 yılından itibaren gerçekleştirilen çalışmalar ile özellikle erken evre KK'larda uzak metastaz potansiyelinin öngörülmesinde kullanılabilecek genetik ve epigenetik parametreler araştırılmaktadır. Lenf nodu metastazı veya uzak organ metastazı bulunmayan erken evre kolon tümörlerinde adjuvan tedavi hala tartışma konusudur. Erken evre kolon tümörlerine spesifik hale getirilip bu tümörlerde sistemik nüks potansiyelini saptamada kullanılabilecek belirteçlerin tanımlanması hedeflenmektedir.

Bu amaç doğrultusunda son yıllarda KK'larda yaptığımız çalışmalarda iki sorunun cevabı aranmaktadır;

1. Herhangi bir kötü prognostik faktörü olmayan erken evre KK hastalarında uzak metastazı öngörmede kullanılabilecek bir biyobelirteç belirlenebilir mi?

2. Biyobelirteç yardımı ile uzak organ metastaz oluşma potansiyeli belirlenen, erken evre KK hastalarında, 5FU-tabanlı adjuvan tedavi uygun mudur yoksa bu tümörler için yeni terapötik yaklaşımlara ihtiyaç duyulacak mıdır?

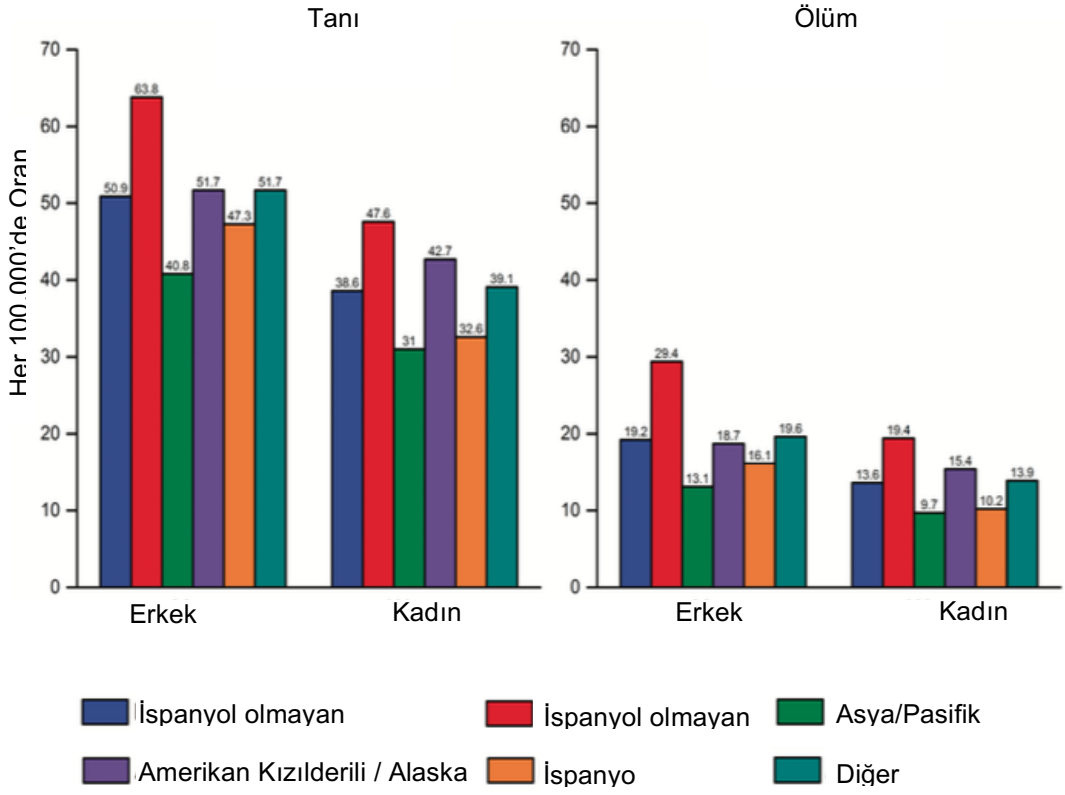
Bu kapsamda bir önceki çalışmamızda, herhangi bir kötü prognostik faktörü bulundurmayan erken evre KK hastalarının %15'inde uzak metastaz gelişimi saptanmış ve değerlendirilen demografik, klinik, patolojik ve moleküler TB, *MACC1* ve *NM23-H1*'in anlamlı oldukları tespit edilmiştir.

Mevcut tez çalışmasında ise bir önceki çalışmada değerlendirilen tümörler revize edilerek ve sayısı arttırılarak elde edilen, kötü prognostik faktörü bulundurmayan erken evre kolon tümörlerinden oluşan yeni çalışma grubunda, karaciğer metastazı (sistemik nüks) oranı saptanarak, bu sürece etki eden demografik, patolojik ve moleküler parametrelerin bir arada değerlendirilmesi hedeflenmektedir. Bu çalışmanın ilk amacı, takip süresi içerisinde nüks gelişimi gösterebilecek KK'larınn tanı anında bu potansiyelini tanımlayabilecek belirteçlerin tanımlanmasıdır. Erken evre KK'larda, tanı anında öngörülebilecek nüks potansiyeli sonucu hastaya günümüzde yaygın olarak kullanılan 5FU-tabanlı adjuvan kemoterapi önerileceğinden ve ilaç direrncliliği ile metastaz süreçlerinin birbirleri ile ilişkili olduğu belirtildiğinde, nüks potansiyeli bulunan bu tümörlerin adjuvan tedaviye verecekleri yanıtın öngörülmesi, projenin ikinci amacını oluşturmaktadır. Bu kapsamda mevcut tez çalışması, hem erken evre KK'ların prognozunu öngörmede ve hastaların tedavi protokollerinin belirlenmesinde kullanılabilecek parametrelerin tanımlanmasına katkı sağlayacak hem de KK hastalarında yeni ve etkin hedefe yönelik tedavi protokollerinin oluşturmasına yön verecek yeni çalışmalara zemin hazırlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanseri (KRK), kalınbağırsak boyunca oluşan agresif bir gastrointestinal sistem tümörüdür. KRK, Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) ve Dünya genelinde en yaygın üçüncü kanser olup, yılda 690.000'den fazla ölümden sorumludur. KRK ABD'de 2017 yılında 50.260 ölüme neden olduğu belirlenmiş olup Dünya çapında tüm etnik kökenlerde benzer şekilde, kanser kaynaklı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Wang ve ark.,2018; Siegel ve ark. 2014) (Şekil 1). KRK, Avrupa'da ise en sık rastlanılan ikinci kanser olup 1000.000' de 447 oranında görülme sıklığına sahiptir (Rodriguez-Salas., 2016). Sağlık bakanlığı 2014 verilerine göre KRK, Türkiye' de hem kadın hem de erkekler arasında en sık gözlenen üçüncü kanserdir (Sağlık Bakanlığı 2014).



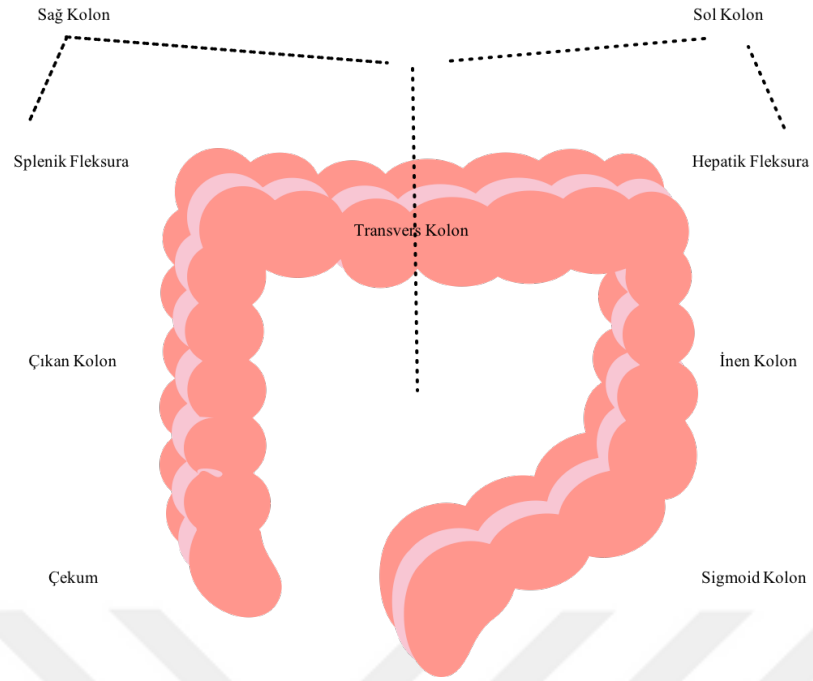
Şekil 1. ABD' de 2006-2010 yılları arası KRK insidansı ve ölüm oranları. * Irk / Etnik ve cinsiyete göre (Siegel ve ark. 2014).

Kalınbağırsak kanserleri ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunda kolon ve rektum beraber değerlendirilsede, hastalık seyirleri ve tedavi protokolleri farklı olduğu için günümüzde bu iki bölge kanserlerinin ayrı olarak ele alınması daha doğru olduğu kabul edilmektedir.

2.1.1. Kolon Kanseri

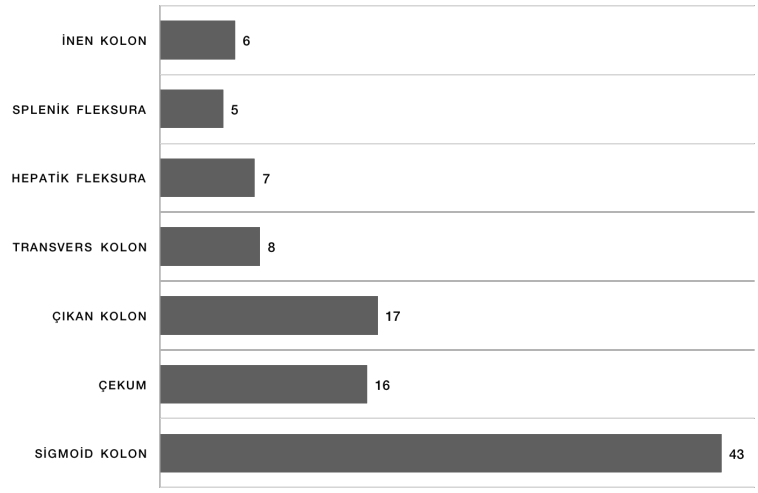
Kolon kanseri (KK), Dünya'da en yaygın görülen kanserlerinden biridir. Dünya genelinde 2018 yılı itibari ile 1.096.601 tanılı KK vakası bulunurken bu sayının 2040 yılında 1.919.534' e çıkması öngörülmektedir. KK nedenli 2018 yılı ölüm sayısı ise 551.269 olarak belirtilmekte, bu sayının 2040 yılında 1.016.453'e ulaşması beklenmektedir. Türkiye'de 2018 yılı itibari ile KK tanılı olgu sayısı 11.286, KK nedenli ölüm sayısı ise 7.971 olarak bildirilmektedir. 2040 yılında Türkiye' de KK tanılı olgu sayısının 21.353, KK nedenli ölüm sayısının ise 16.050' ye çıkması öngörülmektedir.

Şekil 2'de ifade edildiği gibi kalın bağırsağın son 15 cm'lik kısmı rektum geri kalan kısmı ise kolon olarak adlandırılmaktadır. Kolon ise çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolondan oluşmaktadır. Çekum, çıkan kolon ve transvers kolonun yarısı sağ kolon, transvers kolonun sol yarısı, inen kolon ve sigmoid kolon ise sol kolon olarak adlandırılmaktadır. Transvers kolonun çıkan kolon ile birleştiği bölüm Splenik Fleksura, inen kolon ile birleştiği kısım ise Hepatik Fleksura olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 2. Kolon'nun bölümleri.

Kolon tümörleri bulundukları bu lokalizasyonlara göre isimlendirilmekte olup hastalık seyri tümör yerleşimine göre farklılık göstermektedir. Retrospektif çalışmalar sağ kolon tümörlerinin sol kolon tümörlerine göre daha kısa sağkalıma sahip olduklarını belirtmektedirler (Benedix ve ark., 2010; Nawa ve ark., 2016). Bu durumun kolonun kısımlarının farklı embriyolojik kökenlere ait olmalarından ve bağırsak mikrobiyotasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceğini vurgulanmaktadır (Petrelli ve ark., 2016). Tümörün görülme sıklığı da lokalizasyonlara göre farklılık göstermektedir. Şekil 3'te lokalizasyonlara göre tümörün görülme yüzdeleri ifade edilmektedir.



Şekil 3. Kolon tümörlerinin lokalizasyonlara göre dağılımı.

2.1.1.1. KK Oluşumunda Etkili Risk Faktörleri

KK oluşumunda etkili en önemli risk faktörleri, yaş, beslenme, genetik yatkınlık, yakın aile bireylerinde farklı kanser hikayeleri, sigara, aşırı alkol tüketimi, fiziksel hareket azlığı şeklinde sıralanmaktadır (Moran ve ark., 2010).

KK tanısı alan olguların % 90'ından fazlası 50 yaşından büyük olup KK geliştirme riski yaşla beraber artmaktadır. ABD'de ortalama KK tanı yaşı 64 olarak belirtilmektedir. KK ayrıca ABD' de 75 yaş üstü görülen en yaygın kanser türüdür. Gelişmiş ülkelerde 65-85 yaşları arasındaki kişilerde 50 yaş altı bireylere göre KK gelişme riski altı kat daha fazladır. Bununla birlikte 70 yaş üstü tanı alan KK hastalarında tümör daha az agresif karakter gösterirken, 40 yaş altı tanı alan KK olgularında hastalık seyrinin kötü olduğu vurgulanmaktadır (Worthley ve ark., 2007).

Cinsiyetin KK gelişimindeki rolü belirsizliğini korumaktadır. ABD'de ve Dünya genelinde, kadın ve erkeklerde görülme sıklığı eşittir. Sağlık Bakanlığı 2014 verilerine göre Türkiye'de de kadın ve erkeklerde görülme sıklığı açısından herhangi bir fark bulunmamaktadır. Ancak gelişmiş ülkelerde, KK tanılı kadınlarda tümör lokalizasyonu daha çok sağ kolonda yerleşim gösterirken erkek hastalarda tümör sıklıkla sol kolonda bulunmaktadır (Ferlay ve ark., 2006).

KK tanı sıklığı ve hastalığın seyri ırklara göre farklılık göstermektedir. Afrika kökenli popülasyonlarda diğer ırk gruplarına göre daha KK görülme sıklığı yüksek olarak belirtilmekte ve hastalık seyrinin bu popülasyonda daha kötü olduğu raporlanmaktadır. Bu farklılıkların yaşam koşullarından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Wortley ve ark., 2008).

Sigara ve alkol tüketimi gelişmiş batı toplumlarında KK için önemli birer risk faktörleridir. ABD, Kanada, Finlandiya, Hollanda ve İsveç popülasyonları dahil edilerek gerçekleştirilen çalışmada günlük 45g alkol tüketiminin KK riskini %40 arttırdığı belirtilmektedir (Cho ve ark., 2004). Sigara tüketiminin ise Dünya genelinde KK'lerin %12'sinden sorumlu olduğu bilinmektedir (Tsong ve ark., 2007).

Ailede kanser öyküsü KK gelişimi için en önemli risk faktörlerinden biridir. Ailesinde kolon polipi bulunan kişilerde risk 2 kat, ailesinde birinci derece yakınlarında meme başta olmak üzere diğer kanserlere sahip kişilerde risk 2 kat, ailesinde birinci ve ikinci derece yakınlarında erken yaşta kolon veya rektum kanser tanısı almış bireylerde ise 6 kata kadar risk artmaktadır (Wark ve ark., 2019).

2.1.1.2. KK'larda Tanı ve Tarama

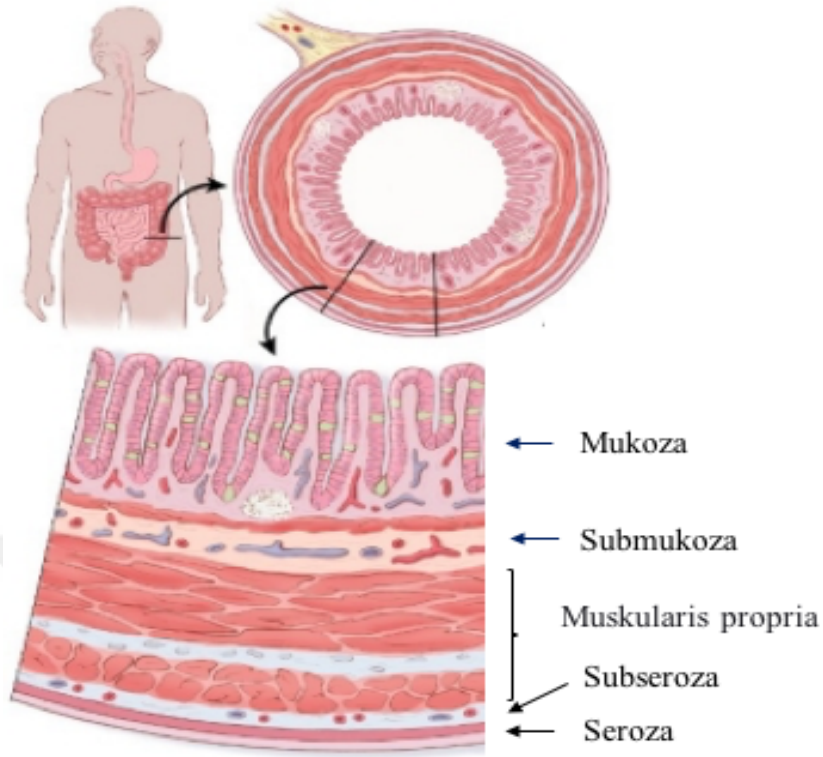
KK yavaş ilerleyen ve spesifik bir belirti vermeyen bir kanserdir. Bu nedenle hastaların çoğu geç evrede tanı almaktadır. Rektal kanama, ishal, kabızlık, kilo kaybı, karın ağrısı ve anemi KK'nın başlıca semptomlarıdır (Kambara ve ark., 2001). Hastalığa ait bu belirtilerin bir çoğu polip adı verilen lezyonların oluşmasından sonra ortaya çıkmaktadır. KK'larda tanı, karın muayenesi, tuşe, kolon grafisi, sigmoidoskopi, kolonoskopi, bilgisayarlı tomografi, transrektal ultrasonografi, kanda gizli kan taraması ve kanda yüksek karsinoembriyonik antijen (CEA) varlığı ile konmaktadır. Ancak kolon tümörlerine özel laboratuvar testleri bulunmamaktadır. CEA, kolon tümörleri dışında pankreas, akciğer, prostat, over gibi bir çok tümörün veya farklı hastalıkların varlığında da artış gösterdiğinden erken tanıda belirteç olarak önerilmemektedir (Moran ve ark., 2010).

2.1.1.3. KK'larda Tümör Evrelemesi

KK başta olmak üzere tüm gastrointestinal sistem tümörlerinde evrelemede histopatolojik bulgulardan yararlanılmaktadır. Dukes, Astler Coller ve Tümör-lenf nodu-metastaz (TNM) günümüze kadar belirlenen evreleme sistemleridir Dukes sınıflaması 1932'de, bir patolog olan Dukes tarafından rektal kanserler için geliştirilmiştir. Ancak bu sistem kolon tümörlerinde de kullanılmıştır. Dukes evrelemesinde, tümör, bağırsak duvarında sınırlı kalmakta ise Evre A, tümör bağırsak duvarını penetre etmekteyse Evre B ya da lenf düğümü metastaz varlığı görülmekteyse Evre C şeklinde tanımlanmaktadır. Daha sonra çeşitli eklemeler ile Dukes sınıflandırılması güncellenmiştir (Lorans ve ark., 2009). Yeni Dukes sistemi G1, G2 ve G3 olmak üzere üç evre içermektedir. G1, çok farklılaşmış tübüller ile az nükleer polimorfizmi ve mitozu, G3 pleomorfik hücre yapısı ve yüksek insidanslı mitozu ifade etmektedir. G2 ise G1 ve G3 arasındaki evreyi oluşturmaktadır (Rajkumar ve ark., 2005).

Astler Coller sınıflandırması, Dukes sınıflamasının modifikasyonu ile oluşturulmuştur. Bu evreleme sisteminde tümör A' dan D' ye kategorize edildi. A; mukozada sınırlı tümörü, B1; lenf nodu metastazı olmadan muskularis propria kadar tümör tutulumunu, B2; lenf nodu metastazı olmadan bağırsak duvarını aşan tümör tutulumunu, C1; bağırsak duvarını aşmamış tümör ile beraber lenf nodu metastazını, C2, bağırsak duvarını aşmış tümör ile beraber lenf nodu metastazını ve D, uzak organ metastazını göstermektedir. Ancak bu iki evreleme sistemide günümüzde tercih edilmemektedir (Brenz ve ark., 2000).

Amerika Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) tarafından 1987'de geliştirilen ve Uluslararası Kanser Birliği (UICC) tarafından onaylanan TNM sistemi, KK başta olmak üzere tüm gastrointestinal sistem tümörlerinde kabul edilmektedir. TNM sistemi, tümörün invazyonuna, bölgesel lenf nodu dağılımına ve uzak organ metastazı mevcudiyetine göre tanımlanmaktadır. Tümör lokal invazyonu, tümörün bağırsak katmanlarındaki invazyon derinliği ile belirlenmektedir. İnvazyon derinliği T ile tanımlanmaktadır ve T1' den T4' e doğru artmaktadır. Şekil 4'te belirtildiği gibi kolonun lümene doğru bakan en iç katmanı mukoza olarak isimlendirilmektedir. Mukozanın altında sırası ile submukoza, subseroza ve seroza kısımları yer almaktadır (Rajkumar ve ark., 2005).



Şekil 4. Kolon duvarının katmanları.

Kanser hücreleri sadece mukozayı sarmış ise tümör T1 olarak isimlendirilmektedir. Hücreler submukozaya indiğinde tümör T2, subseroza ve serozada ise T3, seroza duvarını taşmış ise T4 olarak isimlendirilmektedir. N, lenf nodu metastazını, M ise uzak organda görülen metastazı ifade etmektedir. Günümüzde KK evrelemisinde kullanılan TNM sistemi Tablo 1'de açıklanmaktadır (Sukhede ve ar., 2004).

Tablo 1. Kolon tümörlerinde TNM evrelemesi

Evre	TNM	Dukes	Astler-Coller
I	T1-2N0M0	A	A
IIA	T3N0M0	B	B2
IIB	T4N0M0	B	B3
IIIA	T1-2N1M0	C	C1
IIIB	T3-4N1M0	C	C2/C3
IIIC	T1-4N2M0	C	C1/C2/C3
IV	T1-4N1-2M1		D

2.1.1.4. KK'larda Tedavi

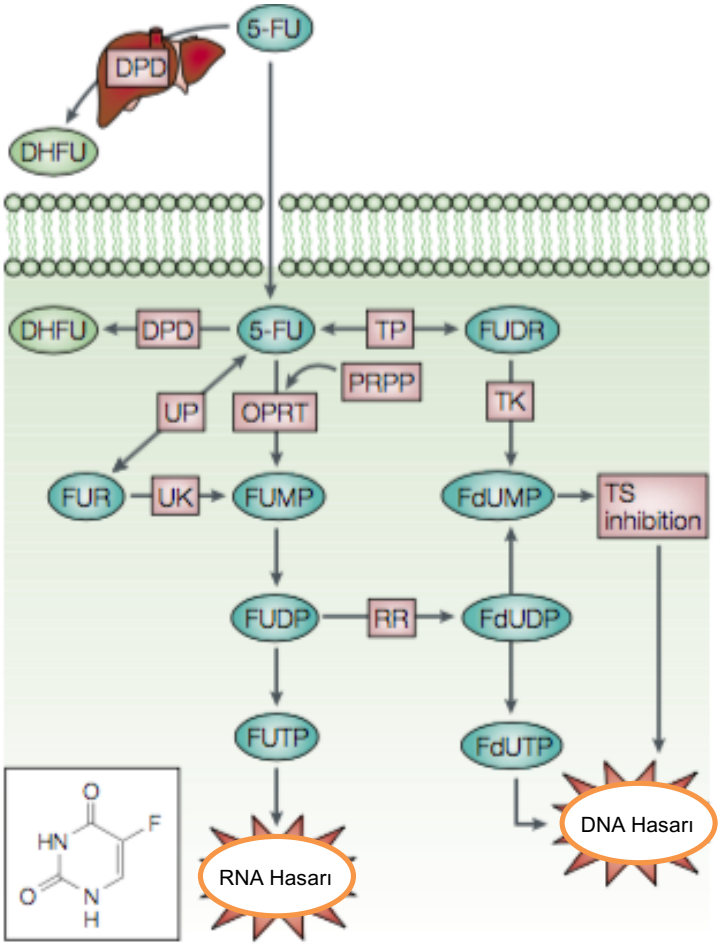
KK'larda tedavi, tümörün histopatolojik evrelemesine göre değişiklik göstermektedir. Erken evre kolon tümörlerinde standart tedavi cerrahi rezeksiyondur. Bununla birlikte ileri evre kolon tümörlerinde cerrahi rezeksiyonla beraber kemoterapi ve radyoterapi de önerilmektedir (Lelie ve ark., 2002).

T1N0M0 ve T2N0M0 tümör gruplarından oluşan evre I kolon tümörlerinde tedavi küratif rezeksiyondur. Lenf modu metastazı ile karakterize evre III ve uzak metastaza sahip evre IV kolon tümörlerinde tedavi, rezeksiyon ve sonrasında uygulanan kemo-radyo terapiden oluşmaktadır. Rezeksiyon sonrası uygulanan kemoterapi ve radyoterapi adjuvan tedavi olarak adlandırılmaktadır. Evre II KK'larda ise tedavi, kötü prognostik faktörler olarak tanımlanan özelliklere göre belirlenmektedir. Bu faktörler, tümörün müsinöz komponent tanısı alması, taşlı yüzük hücreleri barındırması, lenfatik invazyona sahip olması olarak belirtilmektedir. Ayrıca obstrüktüf kolon da kötü prognoz faktörü olarak tanımlanmaktadır. IIA, IIB ve IIC'den oluşan evre II tümörlerinde bu faktörler var ise cerrahi rezeksiyon ve adjuvan tedavi önerilmektedir (Pawkin ve ark., 2015). Ancak günümüzde hala bu evreye sahip tümörlerde standart bir tedavi protokolü belirlenmemiş olmakla birlikte hala tartışma konusudur.

5FU ileri evre KK'ların birinci basamak kemoterapisinde standart olarak kullanılan bir ilaçtır. 5FU, DNA ve RNA'nın pirimidin moleküllerine benzer yapıya

sahip olan heterosiklik bir aromatik organik bileşiktir. Bu molekül, C-5 konumunda Hidrojen (H) yerine Flüor atomu olan urasil analoğudur. Bu nedenle urasil gibi pasif taşıma mekanizmasını kullanarak hücre içerisine hızlıca taşınabilmektedir. 5FU damar ya da oral yolla verilmektedir. Ancak vücuda girdikten sonra ilacın %80'i, bir karaciğer enzimi olan dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) tarafından dihidrofüroürasile (DHFU) dönüştürülmektedir. 5FU, hücre içerisinde, florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), florodeoksiridin trifosfat (FdUTP) ve floroüridin trifosfat (FUTP) gibi çeşitli aktif metabolitlere çevrilmektedir (Fang ve ar., 2009).

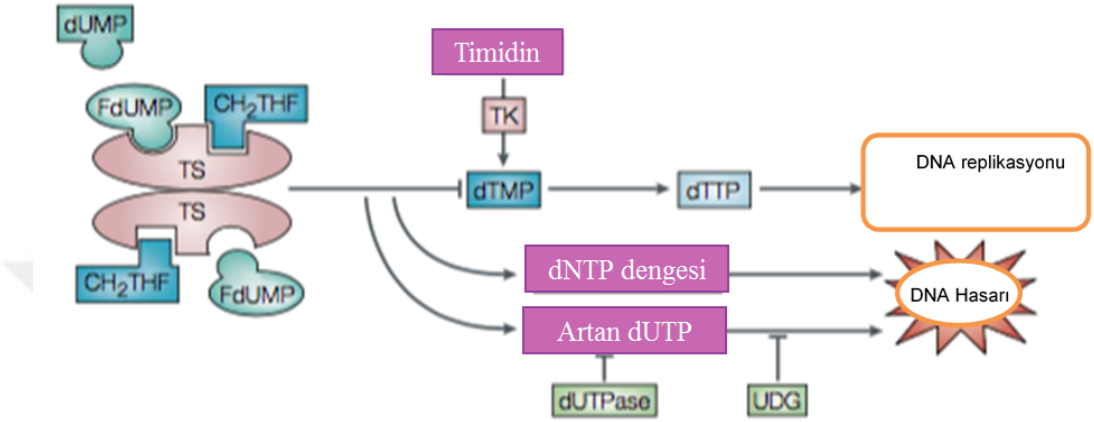
5FU çeşitli yollar ile metabolize edilmektedir. Bu ilaç direk olarak fosforibosil pirofosfat (PRPP)'tı kullanarak, orotat fosforibosiltransferaz (OPRT) ile floroüridin monofosfatına (FUMP) dönüştürülmekte, ya da fluorouridin (FUR) yardımı ile üridin fosforilaz (UP)'dan kinaza (UK) dönüştürülmektedir. FUMP daha sonra, aktif metabolitlerden FUTP'ye veya ribonükleotit redüktaz (RR) enzimi ile flüorodeoksiüridin difosfata (FdUDP)'a dönüşmekte, oradan ise diğer bir aktif metabolik olan FUTP'yi oluşturmaktadır. 5FU mekanizmasında diğer bir alternatif yolak timidin fosforilaz (TP) aracılığı ile olmaktadır. 5FU, TP aracılığı ile florodeoksiüridine (FUDR)'ne oradan timidin kinaz aracılığı (TK) FdUMP'ye ve sonrasında FdUTP aktif metobolitlerine dönüşmektedir. Tümör hücrelerinde bu aktif metabolitler DNA replikasyonunun engellemesinde ve DNA'da kırıklar oluşmasında görev almaktadırlar. 5FU'nun metabolizması Şekil 5'te ifade edilmektedir (Carother ve ark., 2001; Fang ve ark., 2009).



Şekil 5. 5FU'nun metabolizması ve aktif metabolitlerinin etkileri.

Hücre içerisinde oluşan bu 5FU aktif metabolitlerinden FUTP RNA'da, FdUTP ise DNA'da kırıklar meydana getirerek tümör hücrelerinde apoptozu uyarmaktadırlar. FdUMP ise TS'yi inhibe ederek aktivitesini göstermektedir. TS, DNA sentezi için gerekli olan Timidinin de nova kaynağını oluşturan enzimdir. Bu enzim, 5,10-methylenetetrahydrofolate (CH2THF) aracılığı ile deoksiüridin monofosfatın (dUMP) deoksitilenidin monofosfatına (dTMP) dönüşümünü katalize etmektedir. TS, 36 kDa'dan oluşan bir proteindir ve dUMP ve CH2THF için birer bağlama bölgesi içeren bir dimer olarak işlev görmektedir. 5FU metabolit FdUMP, TS'nin nükleotit bağlama bölgesine bağlanmakta ve CH2THF ile stabil bir Ternary Kompleksi oluşturmaktadır. Böylece 5FU'nun aktif metaboliti normal substrat dUMP'nin bağlanmasını engelleyerek dTMP sentezini inhibe etmektedir. Bu deoksinükleotit (dNTP) havuzu dengesizlikleri artan deoksiüridin trifosfat (dUTP) seviyeleri ile sonuçlanır. Yüksek dUTP seviyesi DNA'da çift zincir kırıklarına neden olmaktadır. DUTP'nin neden olduğu DNA hasarı, pirofosfataz dUTPaz ve

urasil-DNA glikosilaz (UDG) seviyelerine bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca dTMP, TK etkisiyle dTTP'ye dönüştürülmekte böylece TS eksikliğinin etkileri hafifletilebilmektedir. Bu kurtarma yolları, 5FU'ya karşı potansiyel bir direnç mekanizmasını temsil ettiği düşünülmektedir (Senda ve ar., 2007; Green ve ark., 2005). 5FU'nun TS'yi baskılama mekanizması Şekil 6'da ifade edilmektedir.



Şekil 6. 5FU'nun TS'yi baskılama mekanizması.

1957 yılından itibaren KK'ların tedavisinde kullanılan 5FU, 1975'lerden sonra lökovorin ile, son yıllarda ise oksaliplatin, irinotekan ve kapekitabin gibi kemoterapi ilaçları ile desteklenmektedir. İleri evre KK'lar için geleneksel tedavi 5FU ve lökovorinin oksaliplatin veya irinotekan ile kombinasyonunu içermektedir. 5FU/lökovorinin oksolopilatin ile kullanıldığı rejim FOLFOX, irinotekan ile kullanıldığı rejim ise FOLFORİ olarak isimlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, FOLFOX ve FOLFIRI rejimlerinin tedavide birbirine üstünlüğü gösterilememiştir. Dolayısıyla hastaya uygulanacak tedavi hastanın performansı, ilaçların yan etki profili ve tedaviden beklenen fayda (palyatif vs neoadjuvan) gibi faktörler dikkate alınarak belirlenmektedir. 5FU'nun KK tümörinde kullanımı Şekil 7'de ifade edilmektedir (Barker ve ark., 2018).



Şekil 7. KK tedavisinde 5FU'nun kullanımı (Barker ve ark., 2018).

KK'da diğer bir kemoterapi yaklaşımı monoklonal antikorlardan oluşmaktadır. Bevacizumab ve Cetuximab ileri evre kolon tümörlerinde kullanılan monoklonal antikorlar olmalarına rağmen bu tümörlerde beş yıllık sağ kalım oranı %12'dir.

Kolon kanserlerinin tedavisindeki bu başarısızlığın en önemli nedeni ilaç direncinin ortaya çıkmasıdır. İleri evre kolon kanserlerinin yaklaşık %40'ı 5FU bazlı kemoterapilere direnç göstermektedir.

2.1.1.4.1. KK'da İlaç Direnç Mekanizmaları

KK'da kemoterapi ilaçlarının etkinliklerini kısıtlayan en önemli faktörler; ilaçların hedef dokudaki etkin konsantrasyonunun azalması, tümör hücrelerinin ilaca hassasiyetinin düşmesi ve strese bağlı seçilim sonucunda gelişen doğal veya kazanılmış ilaç direncidir. Doğal direnç, ilk kez alınan bir kemoterapötik ilaca karşı tümörün çok az cevap vermesi ya da hiç cevap vermemesidir. Kazanılmış direnç ise, başta ilaca cevap veren tümörlerin belli bir süre sonra ilaca cevap vermez hale gelmesi ile oluşmaktadır. Doğal direnç daha çok genomda yer alan polimorfizmler ile açıklanırken, kazanılmış dirençte bir çok moleküler mekanizmasının rol oynadığı belirtilmektedir (Li ve ark., 2016).

TS'nin yüksek seviyeli ifadesi, DPD'nin aktivitesinin artması, *MLH1* geninin metilasyonu ve *Bcl-2 Bcl-XL* ve *Mcl*-1'in aşırı ifadesi kolon kanser tedavisinde ilk tanımlanan ilaç direnç mekanizmalarıdır (Siegel ve ark., 2014; Benedix ve ark., 2010).

TS'nin yüksek ekspresyonu, 5-FU direncinden sorumlu ana moleküler mekanizma olarak yaygın şekilde kabul edilmektedir. TS'in kodlandığı *TYMS*'nin amplifikasyonu ve promotör bölge mutasyonları hem doğal direnç hem de kazanılmış dirence neden olmaktadır. *TS* gen t promotörü polimorfiktir ve genellikle iki (TSER * 2) veya üç (TSER * 3) adet 28 bazdan oluşan tandem-tekrar dizisine sahiptir. Bazı çalışmalar, TSER* 3/TSER*3 homozigot hastaların 5FU

bazlı kemoterapiye TSER*2/TSER*2 homozigot ve TSER*2/TSER*3 heterozigot hastalara göre daha dirençli olduklarını ifade etmektedir. İn vitro çalışmalar, TSER*3 sekansına sahip *TS* promotörlerinin TSER*2 sekansına kıyasla yaklaşık üç kat daha yüksek mRNA oluşturduğunu göstermektedir. Bu nedenle TSER*3 sekansına sahip tümörler 5FU tedavisine dirençlidir.

Artan DPD aktivitesi sonucu 5FU'nun artan katabolizması ilaç direncine yol açabilmektedir. Çalışmalar düşük DPD ekspresyonuna sahip kolon tümörlerinin 5-FU'ya karşı duyarlı olabileceğini göstermektedir. Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda DPD proteinini kodlayan *DPYD* geninde 39'dan fazla farklı allel tanımlanmıştır. *DPYD* geninin 14. intronunda DPYD*2A polimorfizm tanımlanmıştır ayrıca bu bölgede farklı DPD aktivitesinin düşürülmesine de neden olan farlı mutasyonlar bildirilmektedir. Ancak çalışmalar, 5FU'ya bağlı toksisite fenotipi ile DPD genotip arasında net bir ilişki kuramamaktadır (Dienstam ve ark., 2017; Bramsen ve ark., 2017).

İlacın hücre içerisine yeterli miktarda girememesi veya etkisini gösteremeden ATP bağlayan kaset (ABC) taşıyıcı proteinlerince hücre dışına atılması da dirence neden bir diğer etmendir (Longley vd., 2003). ABC taşıyıcı ailesi, ATP hidrolizinin sağladığı enerjiyi kullanarak, endojen ve eksojen maddelerin akışına aracılık eden hücresel plazma tabakasına yerleştirilmiş bir dizi taşıyıcı proteinden oluşmaktadır (Gros ve ark., 1986; Nagane ve ark., 1999; Tivman ve ark., 2015). Günümüze kadar insanda 48 farlı ABC proteini tanımlanmıştır. Bu protein ailesi amino asit sekanslarına dayanarak, A'dan başlayarak G'ye doğru adlandırılan 7 alt familyaya ayrılmaktadır. ABC taşıyıcı protein ailesinden ABCB grubuna ait P-gp, ABCC ailesine ait MRP1 ve ABCG ailesine ait BCRP özellikle ilaç dirençliliği ile ilişkilendirilmektedir. MDR mekanizmasının kolon kanserlerinde gelişen 5FU direnci ile ilişkisi net bilinmemekle birlikte ABCC5 ve ABCC11'in bu süreçte etkili olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Lin ve ark., 2017; Pawlowska ve ark., 2018).

2.1.1.5. KK'ların Oluşumunda Etkili Moleküler Mekanizmalar

KK, bir dizi genomik ve epigenomik değişiklik ile karakterize olan heterojen bir hastalıktır. Kolon tümörlerinin yaklaşık %15'i ailesel olup sadece

%5'inde kanser hücrelerinde büyüme süreçlerini düzenleyen genlerde kalıtsal mutasyonlar tanımlanmaktadır. KK %75-80 oranında germline mutasyonlardan kaynaklanmadan sporadik formda oluşmaktayken ve %20-25'nin ailesinde kolorektal kanser öyküsü bulunmaktadır. Bununla birlikte, KK'ların %5'i, adenomatous polipozis koli (APC), ve MMR genlerindeki bir germline mutasyonundan kaynaklanırken, %15-20'sinin aile öyküsü olmasına rağmen herhangi bir sendroma kategorize edilememektedir (Moran ve ark.i 2010).

2.1.1.5.1. Ailsel KK'lar

2.1.1.5.1.1. Poliposiz Olmayan KK Sendromları

Herediter Non-Polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC), tüm kolon tümörlerinin %2-4'ünü oluşturmakta olup en sık rastlanılan KK sendromudur. HNPCC yüksek penetrans, erken-yaş KK, müsinöz komponentli tümör ve intestinal dışı kanserlerin görülmesi ile karakterizedir. Genel popülasyonda HNPCC, 45-67 yaşları arasında ortaya çıkmaktadır. HNPCC, MMR genlerindeki kayıplar ile oluşmaktadır. HNPCC tanısı Tablo 2'de belirtilen Amsterdam II ve revize Bethesda kriterleri doğrultusunda konmaktadır (Lorans ve ark., 2009).

Tablo 2. HNPCC tanı kriterleri

Kardeşlerin %50'sinde kanser varlığı (kolorekta, endometrium, m,de, pankreas vs.)
Otozomal dominant kalıtım varlığı
Kanser en az bir kişide 50 yaş altında ise
En az bir kişide birden çok primer tümör varlığı
Tümör yerleşiminin sağ kolonda olması
Tümörün müsinöz karakterde olması

HNPCC aileleri MMR genlerinde kalıtsal mutasyon taşıyor ise Lynch sendromu (LS) tanısı almaktadırlar. LS, %90 oranında *MLH1* veya *MSH2*, %10 oranında *MSH6* gen mutasyonlarından kaynaklanmakta ve otozomal dominant kalıtım geçişi göstermektedir. Ayrıca MSH2 ile bağlantılı olan *EPCAM* ve *PMS2*

genlerindeki mutasyonlarda LS ile ilişkilendirilmektedir. Fonksiyonel MMR proteinlerinin kaybı, genomda MSI'ya neden olmaktadır (Logan ve ark., 2004).

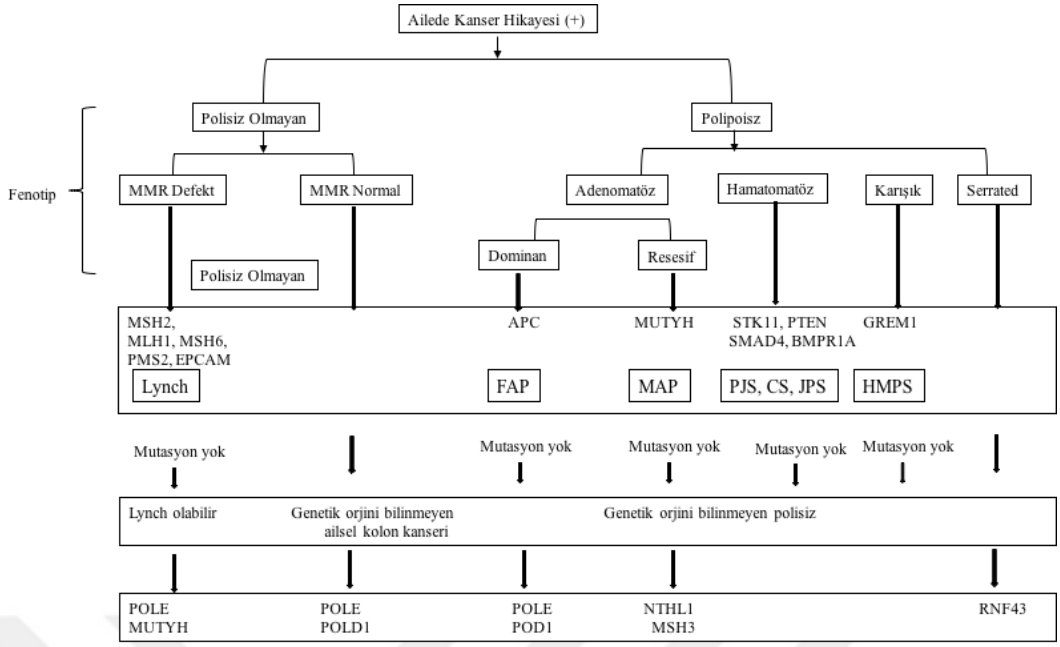
2.1.1.5.1.2. Poliposiz Olan KK Sendromları

Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP) en yaygın görülen poliposiz sendromu olup tüm kolon tümörlerinin %1'ni oluşturmaktadır. Bu sendrom kolon boyunca gözlenebilen yüzlerce polip ile karakterizedir. Otozomal dominant geçiş gösteren FAP, 5. kromozomun kısa kolunda yer alan *APC* gen mutasyonları sonucunda oluşmakta ve çoğunlukla 35 yaş altı bireylerde görülmektedir (Huang ve ark., 2016).

Diğer bir poliposiz sendromu olan MAP otozomal resesif kalıtım özelliği göstermektedir. Bu sendrom *MUTYH* gen mutasyonları ile karakterizedir (Jass ve ark., 2006).

Juvenil Poliposiz Sendromu (JPS), Peutz-Jeghers Sendromu (PJS) ve Cowden Sendromu (CS) hamaratomatöz polipler ile tanımlanmaktaıdrlar. JPS, *SMAD4* ve *BMPR1A* genlerinde meydana gelen büyük delesyonlar veya nokta mutasyonları, JPS %90 oranında *STK11*, CS ise *PTEN* mutasyonları sonucunda gelişmektedir (Jass ve ark., 2006).

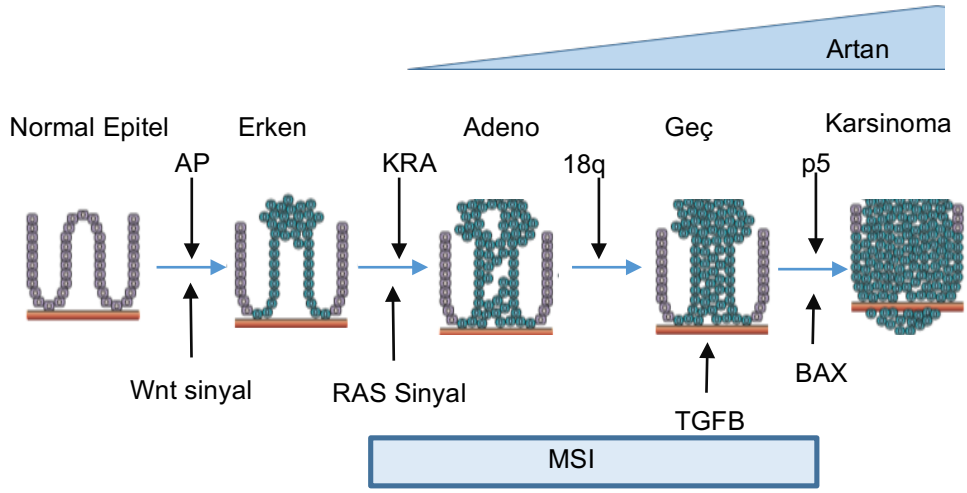
Adenamotöz ve hamartomatöz poliplerin bir arada görülebildiği Ailsel Karışık Poliposiz Sendromunda (Hereditary Mixed Poliposis Syndrome: HMPS) ise *GREM1* mutasyonları etkilidir (Yurgelun ve ark., 2012). Ailesel KK'ları ve bu sendromlar ile ilişkili genler Şekil 8'de ifade edilmektedir.



Şekil 8. Ailesel KK ve bu kanserlerin oluşumunda etkili olan genler (Lorans ve ar., 2008).

2.1.1.5.2. Sporadik KK'larda Moleküler Oluşum Mekanizmaları

KK'nın patogenizinde yer alan moleküler değişimler ilk olarak Fearon ve Vogelstein tarafından tanımlanmaktadır (Vogelstein ve ar., 1988). Bu modele göre KK, onkogenlerde, tümör baskılayıcı genlerde ve DNA yanlış eşleşme genlerinde biriken mutasyonlar sonucunda meydana gelmektedir (Şekil 9).



Şekil 9. Fearon ve Vogelstein'nin Adeno-karsinoma sekans modeli (Seruca ve ark., 2009).

Normal epitel hücrede bir seri meydana gelen mutasyonlar sonucunda, epitel önce adenomaya sonrasında ise karsinomaya dönüşmektedir. Bu nedenle oluşturulan modele adeno-karsinoma sekansı adı verilmektedir. Model kromozomal kararsızlık (chromosomal instability; CIN) ve mikrosatellit kararsızlık (microsatellite instability; MSI) olmak üzere iki temel mekanizma ile açıklanmaktadır (Seruca ve ark., 2009).

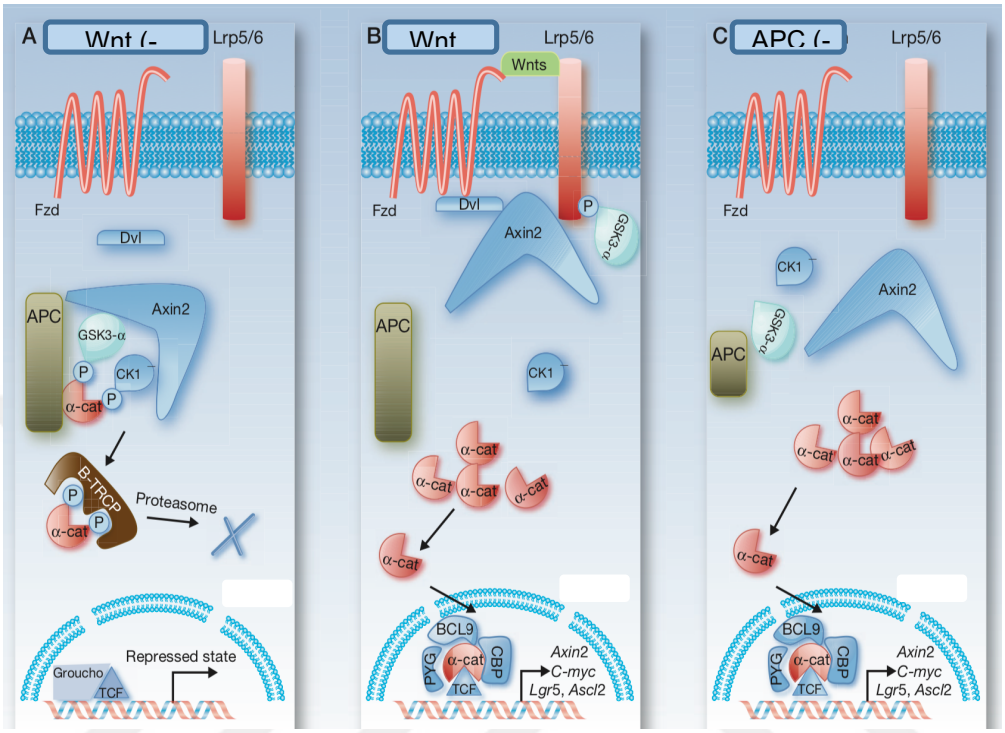
2.1.1.5.2.1. Kromozomal Kararsızlık

CIN, baskılayıcı veya standart yolak olarakta ifade edilmektedir. Feraron ve Vogelstein modeline göre Kolon adenokarsinomların %80-85'i bu mekanizma ile meydana gelmektedir . Bu süreçte ilk olarak 5q'de lokalize APC, 17p'de lokalize p53 ve 18q'da lokalize DCC/SMAD4 alel kayıpları meydana gelmektedir. CIN mekanizması, bu kromozomal kayıplar ile birlikte gen amplifikasyonları ve translokasyonlarla da oluşabilmektedir (Huang ve ark., 2015).

2.1.1.5.2.1.1. KK'larda APC'nin Önemi ve Wnt Sinyal Yolağı

5q21'de lokalize olan *APC* geni 15 ekondan meydana gelmektedir. Sporadik KK'ların %60'ı *APC* mutasyonları sonucu aktif hale gelen Wnt sinyal yolağı nedeniyle oluşmaktadır. Wnt sinyal yolağında APC, Kazein kinazı 1 (CK1) ve Glikojen Sentaz Kinaz 3b (GSK3-b) ve AXIN'den oluşan yıkım kompleksi aracılığı ile Beta-katenini düşük sitoplazmik konsantrasyon altında tutulmaktadır. Wnt ligantı yokluğunda APC, GSK3b, CK1 ve Axin sitoplazmada bir araya gelerek yıkım kompleksi oluşturmaktadırlar. Bu kompleks sitoplazmada bulunan Beta-katenin'ni übikütinleyerek bu proteinin proteosomal yıkımını sağlamaktadır. Ortamda Wnt ligantı bulunduğu zaman ligant, hücre zarında yer alan Fzd ve LRP5/6 reseptör proteinlerini tanıyarak bu proteinlere bağlanmaktadır. Fzd ve LRP5/6 koreseptörlerine bağlı Wnt ligandları, Dvl-fzd kompleksinin oluşumunu ve LRP'nin GSK3b tarafından fosforilasyonunu tetiklemektedir. Bu fosforilasyon sonucunda bir iskelet protein olan Axin2'ninde reseptör ligand kompleksine katılmasını sağlar. Böylece sitoplazmadaki yıkım kompleksi dağılması sonucu Beta-katenin'in yıkımı engellenmektedir. Sitoplazmada biriken Beta-katenin nükleus içerisine geçerek hücre proliferasyonunda etkili genlerin transkripsiyonunun artmasını teşvik ederek tümör oluşum sürecini başlatır. Wnt

sinyal yolağı APC protein kaybı sonucu da aktif hale geçmektedir (Şekil 10). APC'nin az ya da hiç olmaması durumununda sitoplazmada yıkıcı kompleks oluşmamakta bunun sonucunda Beta-katenin degredasyonu sağlanamamaktadır (Nagasaka ve ark., 2008).

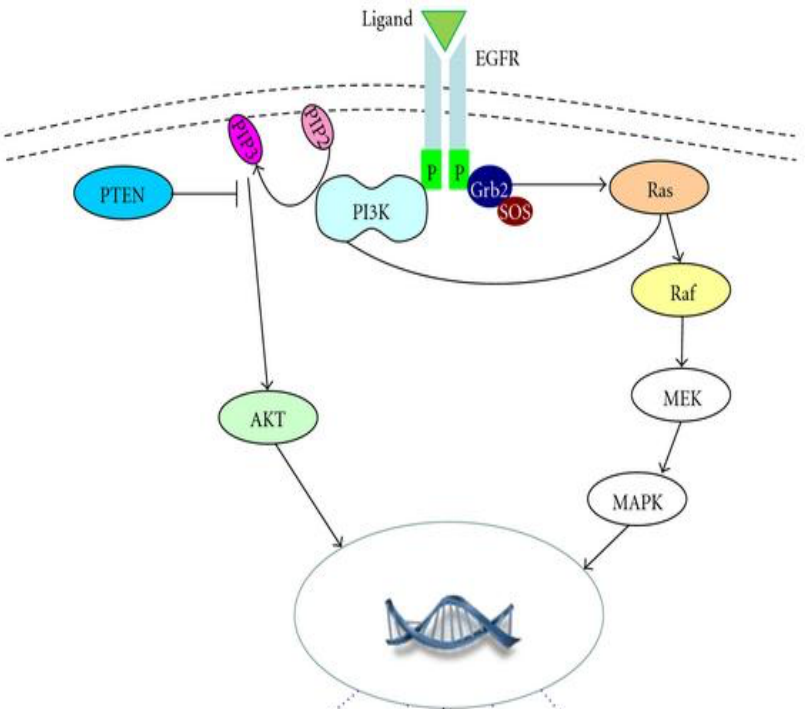


Şekil 10. Wnt sinyal yolağı (Huang ve ark., 2015).

2.1.1.5.2.1.2. KK'larda KRAS önemi ve RAS Sinyal Yolağı

Proto-onkogenler, hücrede sinyal uyarı iletiminde ve hücre büyümesinin kontrolünde rol oynamaktadırlar ve bu genlerin çeşitli nedenler ile aktivasyonları sonucunda hücre proliferasyonu artmaktadır. *KRAS*, 12p12.1'de lokalize bir proto-onkogen olup 21 kDa büyüklüğünde GTP-bağlanma proteini üretmektedir. *KRAS* proto-onkogeni, EGFR sinyalinin BRAF aracılıklı MAPK sinyal mekanizmasında yer alan bir moleküldür. *KRAS* mutasyonuna bağlı RAS aktivitesi, erken evre KK tümörlerinin %35-42 'inde rapor edilmektedir. KRAS proteini GTP'ye bağlandığında aktif hale geçerek EGFR sinyal yolağı içerisinde yer alan RAS aracılığı ile birçok farklı süreçte görev almaktadır. RAS aktivesi sonucunda Mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) gibi birçok transdüksiyon sinyal yoları açık hale gelmektedir. *KRAS* geninin 2. ekonunda meydana gelen kodon 12 ve 13, 3. ekzonunda meydana gelken kodon 61 nokta mutasyonları RAS aktivitesine neden olan en temel genetik değişimlerdir (Daniel ve ark., 2010). Son

zamanlarda, KRAS aktivasyonunun, kolon epitelindeki hiperplastik büyümeyi teşvik ettiği bildirilmektedir (Fischer ve ark., 2017; Sumatha ve ark., 2018). Aynı zamanda RAS aktivasyonu epitel hücre polaritesini düzenlemekte, KK gelişimi sırasında birleşme aracılı hücre-hücre temaslarını azaltarak epitel hücreleri polaritelerini kaybetmelerini sağlamaktadır (Şekil 11).



Şekil 11. RAS-MAPK sinyal yolağı (Sumatha ve ark., 2018).

2.1.1.5.2.1.3. KK'larda 18q Kaybı

On sekizinci kromozomun uzun kolunda meydana gelen delesyonlar KK'ların %60' ında belirlenmektedir. Bu bölgede bulunan gen "*Koloreltal Kanserde Silinmiş* (*Deleted in colorectel carcinogenesis: DCC*)" olarak adlandırılmaktadır. *DCC* tümör baskılayıcı bir gendir ve bu genin delesyonu kolorektal kanserlerin %70' inde ve ileri derecede displazi gösteren adenomların da yaklaşık olarak yarısında görülmektedir. Hafif displazi gösteren adenomlarda görülmemektedir. DCC, Netrin-1 ile etkileşerek Kaspaz 9 üzerinden apoptozu düzenlemektedir (Wang ve ark., 2018).

DPC4/Smad4 ve *SMAD2,*18q'da yerleşim gösteren ve KK'da delesyona uğrayabilen diğer genlerdir. Bu genlerin proteinleri, hücre büyümesini kontrol eden TGFβ sinyal yolağında görev almaktadırlar (Vilar ve ark., 2013).

2.1.1.5.2.1.4.KK'larda P53'ün Önemi

P53, 17p13.1'de lokalize tümör baskılayıcı gen olan *TP53* tarafından kodlanmaktadır. P53 proteini, çevresel veya onkojenik strese maruz kalan hücrelerin replikasyonu sırasında DNA onarımını kolaylaştırmak için G1 hücre döngüsü durmasını tetiklemektedir. Bu protein, DNA hasarı onarılamayacak kadar büyük olduğunda, apoptozu tetiklemede temel rol oynamaktadır. Tüm kanserler değerlendirildiğinde insan tümörlerinin %50'den fazlasında p53 kaybı belirtilmektedir. *TP53* mutasyonu veya kaybı genellikle KK'da adenomdan kansere geçişte meydana gelmektedir. Çalışmalarda *TP53* anormalliklerinin sıklığının lezyonun ilerlemesi ile arttığı vurgulanmaktadır. P53 kayıpları adenomların %4-26'sında, geç adenomların %50'sinde, karsinomaların ise % 50-75'inde gözlenmektedir (Benedix ve ark., 2010).

2.1.1.5.2.2.Mikrosatellit Kararsızlık

Mikrostaellitler (MS), genoum belli bölgelerinde görülen kısa baz dizi tekrarlarıdır bu yüzden Kısa Tandem Tekrar (Short Tandeöm Repeat: STR) olarakta bilinmektedir. MS, bir ya da birden fazla bazın çeşitli tekrarları ile oluşmaktadır. Bazı MS bölgelerinde üç bazın 10 tekrarı gözlemlenirken bazı bölgelerde 2 bazın 30 tekrarı saptanmaktadır. DNA replikasyonuna bağlı hatalar sonucunda MS bölgelerinde delesyonlar veya insersiyonlar meydana gelmekte, bu durum MSI olarak isimlendirilmektedir. MSI oluşumunda DNA tamirinde görev alan MMR genlerindeki kayıpların etkili olduğu bilinmektedir. Bu mekanizma, MMR genlerinde meydana gelen metilasyonlar ya da bu genlerin somatik mutasyonlar sonucu inaktivasyonları ile meydana gelmektedir (Vilar ve ark., 2013).

MLH1, *MSH2*, *MSH6* ve *PMS2* genlerindeki germ-line mutasyonların varlığı nedeniyle oluşan MSI, LS ile işlişkilendirilirken, *MLH1* geni promotör bölge metilasyonları sonucunda meydana gelen MSI durumu genellikle sporadik KK oluşumuna neden olmaktadır. MSI, sporadik olarak meydana gelen KK'ların yaklaşık %15'inden sorumludur. Bu mekanizmanın varlığı immünohistokimyasal yönetemler ile MMR proteinlerinin analiz edilmesi ya da fragment analizleri ile direkt olarak MSI bölgelerindeki tekrar sayılarının incelenmesi ile incelenebilmektedir. MSI bölgeleri 1997 yılında oluşturulan Bethesda kriterleri

doğrultusunda incelenmektedir. Günümüzde onlarca MS bölgesi belirteç olarak tanımlanmış olsa da D5S346, D2S123, D17S250, BAT25 ve BAT26 en sık takip edilen belirteçlerdir (Deinsmant ve ark.,2017).

2.1.1.5.3. Sporadik KK'larda Epigenetik Mekanizmalar

KK gelişiminde genetik mekanizmalar ile birlikte epigenetik mekanizmalarında rol oynadığı bilinmektedir. Epigenetik mekanizmalar aracılığı ile DNA baz dizilimininde herhangi bir değişiklik meydana gelmeden gen ifadesi düzenlenmektedir. Epigenetik değişimler DNA ya da RNA temelli olarak DNA promotör metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlama yapmayan RNA (ncRNA)'ların etkileri ile kromatinin yeniden düzenlenmesi ve transkripsiyon sonrası gen ifadesinin değişmesi gibi süreçler ile tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin düzensizliklerine sebep olarak tümörün gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rollere sahip olmaktadırlar (Xie ve ark., 2015).

2.1.1.5.3.1. DNA Temelli Epigenetik Düzenlemeler

DNA promotör bölge metilasyonları, histon modifikasyonları ve kromatinin yeniden düzenlenmesi DNA'yı etkileyen epigenetik değişimlerdir.

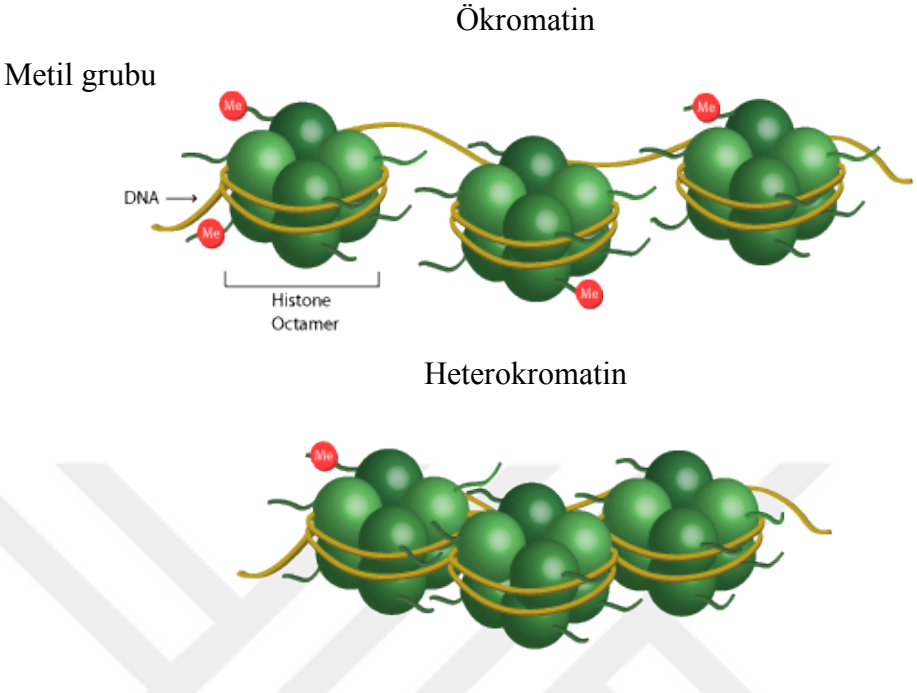
2.1.1.5.3.1.1. DNA Promotör Bölge Metilasyonları

Kanser hücrelerinde DNA metilasyonu, tümör baskılayıcı genlerde fonksiyonel kayıplara neden olan temel mekanizmalardan biridir. *MLH1*'in susturulması, genin 5' promotör bölgelesinde bulunan CpG adasındaki guaninden önce gelen sitozin nükleotidinin 5.karbon atomuna tek bir metil (-CH3) grubunun eklenmesi ile gerçekleşmektedir. KK'larda *MLH1*' in guanin-sitozin (CpG) adasının metillenmesi sonucunda MSI fenotip ortaya çıkarak, sporadik olarak tümör gelişimi başlamaktadır (Wang ve ark., 2009).

2.1.1.5.3.1.2.Histon Modifikasyonları

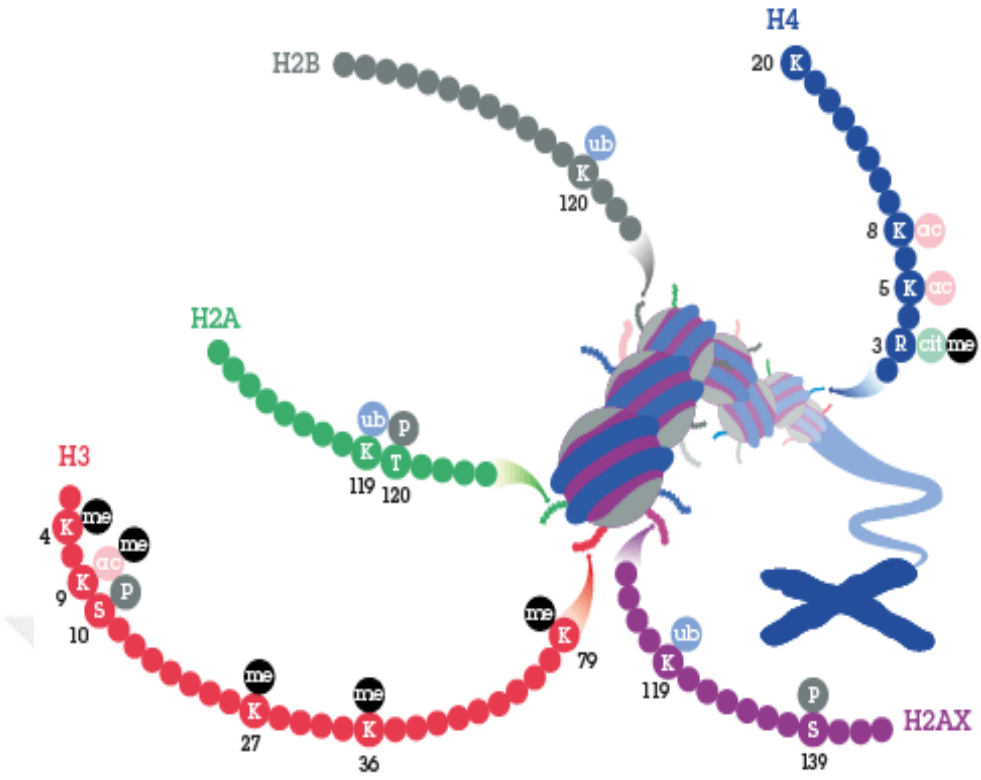
Kromotin, heterokromatin ve ökromatinden oluşan dinamik bir yapıdır. Histonlar nükleus içerisinde DNA'nın paketlenmesine ve kromatin yapının

oluşmasına yardımcı olan proteinlerdir. Bu protein ailesi H1, H2A, H2B, H3 ve H4'ten meydana gelmektedir (Şekil 12).



Şekil 12. Ökromatin ve heterokromatin yapısında Histon proteinleri (Qin ve ark., 2019).

Genomda bir genden mRNA transkribe edileceği zaman, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon veya übikütinasyon ile histon proteinleri bölgeden uzaklaşarak DNA'nın o bölgesinin serbest hale geçmesini sağlamaktadırlar. Bu olay, nükleozomdan dışarıya kovalent olarak modifiye edilebilen histon kuyrukları ile meydana gelmektedir. Bu çıkıntılar sayesinde histonlar asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon veya übikasyon gibi çeşitli modifikasyonlara uğramaktadırlar (Şekil 13).



Şekil 13. Histon modifikasyonları (Cao ve ark., 2018))

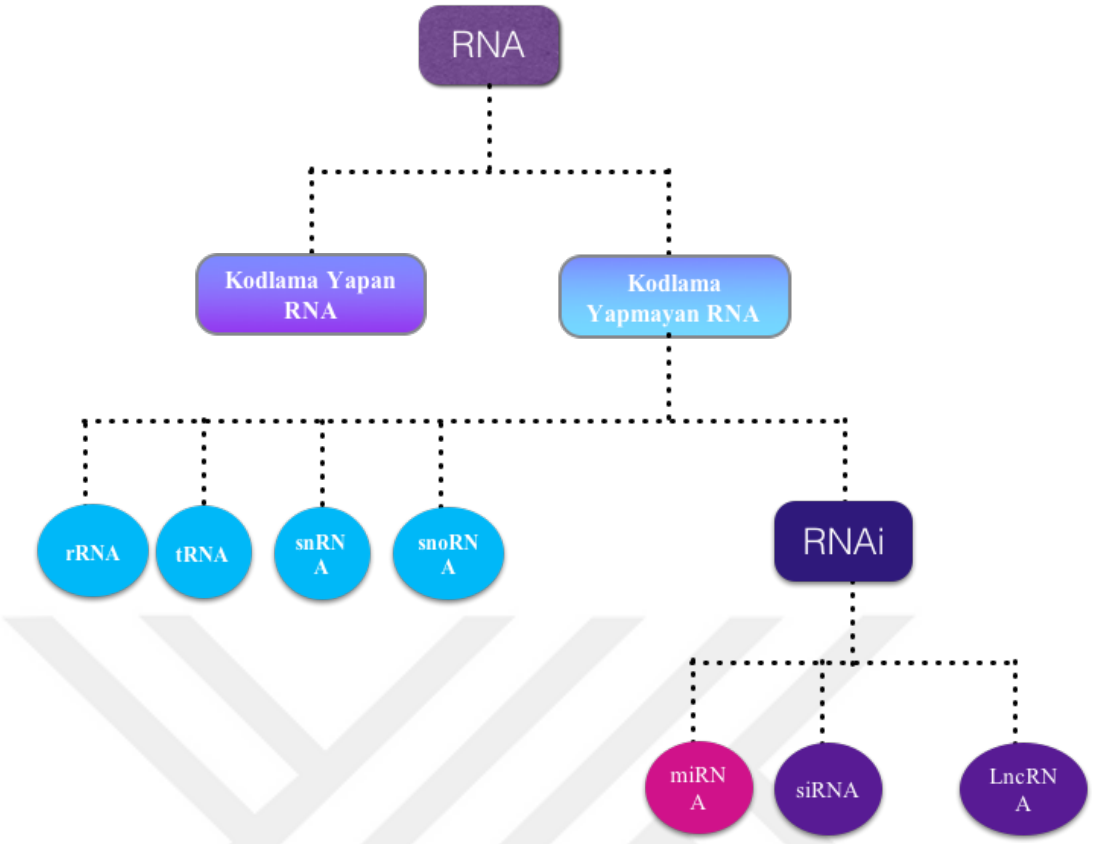
Kontrolsüz histon modifikasyonları, gen düzenlenmesinde etkili olan ana epigenetik mekanizmalardandır. KK'larda Histon asetilasyonlarının önemi vurgulanmaktadır. Histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri aracılığı ile histon asetilasyon ve deasetilasyon arasındaki denge sağlanmaktadır. Ancak *HDAC1* ve *HDAC2* genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda bu denge bozulmaktadır. KK'larda *HDAC1*'in yüksek ekspresyonu sonucu artan Histon asetilasyonu, yüksek tümör evresi ve lenfatik metastazı ile ilişkilendirilmektedir (Cao ve ark., 2018; Qie ve ark., 2019).

Histon metilasyonları, lizin ve arjininee zengin histon çıkıntılarında meydana gelmektedir. Bu modifikasyonda histon metiltransferaz (HMT) enzimleri görev almaktadır. H3K27 ve H3K9 metilasyonları KK'larda yüksek tümör evresi ve lenfovasküler invazyon, ile ilişkilendirilmektedir (Ding ve ark., 2018).

2.1.1.5.3.2. RNA Temelli Epigenetik Düzenlemeler: Kodlama Yapmayan RNA'lar

İnsan genom projesi ile DNA baz dizilimi ortaya çıkartıldığında, genomun sadece %2-3'lük kısmının mRNA'ya çevrildiği, %10-18'lik kısmından protein sentezine yardımcı RNA'ların transkribe edildiği belirlenmiş olup genomun geriye kalan yaklaşık %80-87'lik kısmı ise çöp DNA olarak adlandırılmıştır. Daha sonrak süreçte, çöp olarak adlandırılan bu bölge üzerine yapılan çalışmalarda, protein kodlamayan ancak transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesinde görev alan RNA'lar keşfedilmiştir (Xie ve ark., 2015).

Güncel araştırmalarda kodlama yapmayan RNA'lar, kodlama yapmayan küçük RNA'lar (microRNA; miRNA), kodlama yapmayan büyük RNA'lar (Long noncoding RNA; LncRNA) ve proteine çevrimi olmayan ancak protein sentezi sırasında mutlaka hücre içerisinde bulunması gereken tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA gibi RNA moleküllerinden oluşan diğer kodlama yapmayan RNA'lar (housekeeping RNA) şeklinde üç temel grup altında incelenmektedir (Şekil 14).

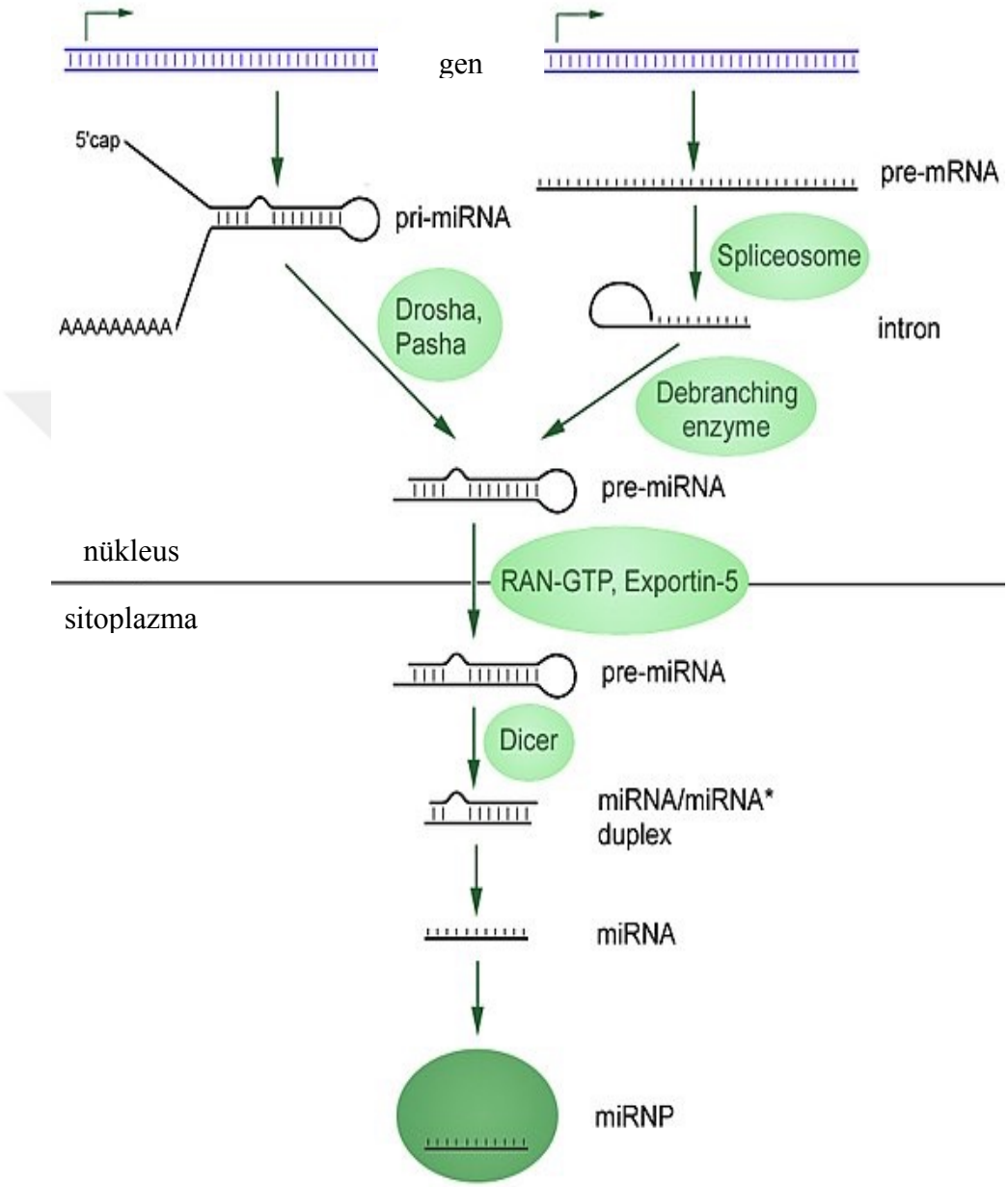


Şekil 14. İnsan hücrelerindeki fonksiyonel RNA'lar

2.1.1.5.3.2.1.Kodlama Yapmayan Küçük RNA'lar

miRNA'lar 20-23 baz uzunluğunda olan ve protein kodlamayan küçük RNA molekülleridir**.** miRNA' larının yaklaşık %50'si, DNA üzerinde kanserle ilişkili genomik bölgelerden, miRNA genlerinden ya da frajil bölgelerden transkribe edilmektedirler. Bu DNA bölgelerinden ilk önce RNAaz II enzimi aracılığı ile, saç tokası, cap ve Poli A uzantılarına sahip primer miRNA' nın (pri-miRNA) transkripsiyonu yapılmaktadır. Nükleus içerisinde oluşturulan bu RNA molekülü RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha (DGCR8) tarafından kesilerek yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda olan premiRNA'ya dönüştürülmektedir. Pre-miRNA, exportin 5 aracılığı ile stoplazmaya taşınmaktadır. Sitoplazmada pre-miRNA'lar bir nükleaz olan Dicer ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA'ya dönüştürülmektedir. Dicer, pre-miRNA' nın "saç tokası" yapısını kesmerken aynı zamanda TRPBP ve Argonaute (Ago2) ile birlikte RISC kompleksini oluşturmaktadır. Ago2'ni çift zincir miRNA'dan 5' ucu daha kararlı olan seçim işleminde görevlidir. Seçilen bu iplik klavuz iplik adını almakta, diğer iplik ise yolcu iplik olarak tanımlanmakta ve

RISC kompleksi tarafından sindirilmektedir. RISC kompleksi tarafından oluşturulan olgun miRNA hedef mRNA' nın 3' translasyona uğramayan bölgesiyle baz eşleşmesi yaparak hedef mRNA'nın yıkımını sağlamaktadır (Şekil 15).

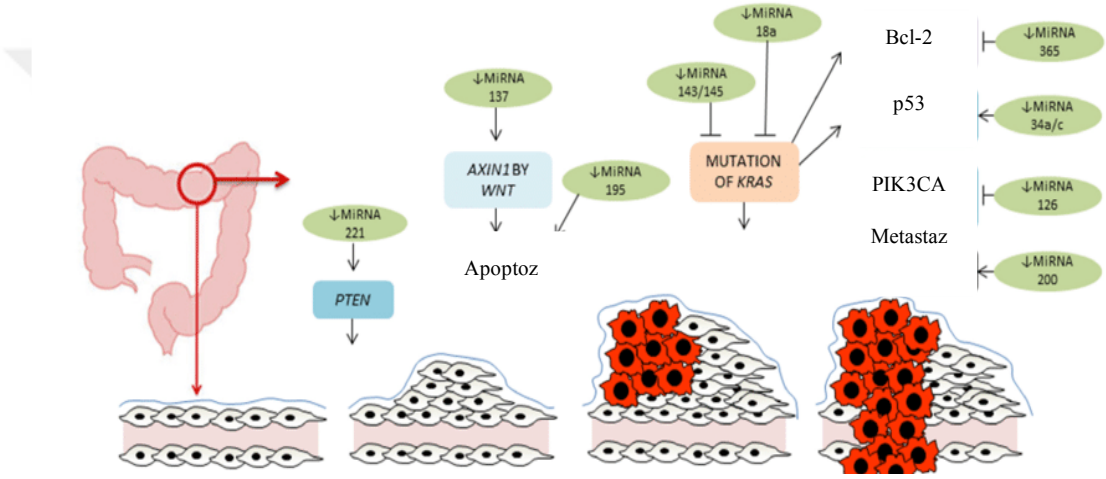


Şekil 15. miRNA'ların sentezi ve mRNA'lr üzerine etkileri (Zheng ve ark., 2015)

MirNA'ların çeşitli hücresel süreçlerde görev aldıkları ve düzensizliklerinin kanser oluşumu başta olmak üzere, tümörün gelişiminde ve tedavisinde önemli oldukları bilinmektedir. 2006 yılından itibaren gerçekleştirilen birçok çalışmada miRNA'ların KK oluşumunun tüm basamaklarında görev aldıkları ortaya çıkartılmaktadır. miR-21 ve miR-92a kolon tümörlerinde tanımlanan ilk miRNA'lardır. Özellikle plazmalarında sirküle miR-21'in yüksek ekspresyonunun

değerlendirilmesi KK hastalarının tanısında önerilmektedir. Bununla birlikte yüksek miR-106a ve düşük miR-150, ileri evre KK'ları için tanısal biyobelirteç niteliği taşımaktadır (Ellis ve ark., 2015).

KK'larda miRNA'ların değişen ekspresyon profilleri tedavi yanıtında da önem göstermektedir. Düşük miR-143 ekspresyonu capesitamin direnci ile ilişkilendirilirken yüksek miR-320 ekspresyonu ise evre III KK'larında FOLFOX direnci göstergesi olarak kullanılmaktadır (Şekil 16).



Şekil 16. KK'ların adeno-karsinoma sekansında görev alan miRNA'lar (Yochun ve ark., 2017)

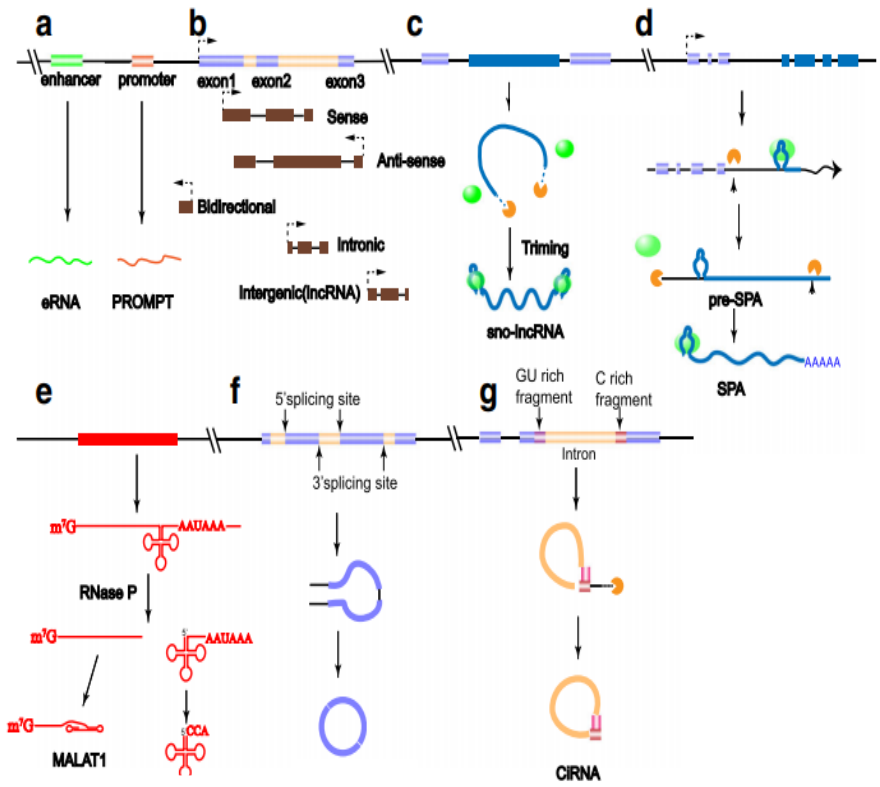
2.1.1.5.3.2.1. Kodlama Yapmayan Büyük RNA'lar

LncRNA'lar 200 nükleotitten büyük protein kodlamayan endojen moleküllerdir. Bazı kaynaklar insan genomunda 90.000 kadar LncRNA transkripti olduğunu belirtse de, GENCORE gibi güvenilir veri tabanlarında bu sayı 16.000 olarak ifade edilmektedir. LncRNA'lar genomda transkribe edildikleri bölgeye göre 5 temel gruba ayrılmaktadır. İlk grup LncRNA'lar mRNA'nın yönünde (sense), ikinci grup LncRNA'lar mRNA'nın tersi yönünde (antisense) transkribe edilenlerden oluşmaktadır. Üçüncü grup iki yönlü (bidirectional) transkripsiyonu gerçekleşen LncRNA'lardan meydana gelirken dördüncü grup LncRNA'lar intron bölgelerinden oluşmaktadır. Beşinci grubun içerisinde ise genlerden kodlanan LncRNA'lar yer almaktadırlar. Ayrıca birer LncRNA olan promotör yukarı akış transkriptlerin (promoter upstream transcript; PROMPT) ve enhansırlar ile ilişkili

RNA'ların (eRNA), genlerin promotör veya enhansır bölgelerinden transkribe edildikleri düşünülmektedir (Koko ve ark., 2015; Zhanfg ve ark., 2017; Tenny ve ark., 2019).

LncRNA'lar hücre içinde bulundukları lokasizyonlara göre nükleer ve sitoplazmik olarakta gruplandırılabilmektedirler. Sitoplazmada yer alan LncRNA'lar mRNA'lar ve proteinler üzerine etki gösterirken nükleer, LncRNA'lar histon modifikasyonlarıda katılarak kromatinlerin yeniden düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Ayrıca nükleer LncRNA'ların RNA polII (RNase P) ve transkripsiyon faktörlerinin etkileşimlerini engeleyerek transkripsiyon sırasında görev aldıkları da savunulmaktadır (Fan ve ark., 2018).

LncRNA'lar yapısal olarak farklılık gösteren heterojen moleküllerdir. Bazı LncRNA'lar düz (lineer) yapıdayken bazıları yuvarlak olabilmektedir. Birçok LncRNA ise farklı katlanmalara sahip yapılar ile karakterizedir. Düz LncRNA'ların bir çoğunda mRNA ile benzer olarak 5'm7G şapkası ve 3'PolyA yapısı bulunmaktadır. 5' ve 3' terminal ucunda snoRNA şapkaları bulunan RNA'lar Sno-LncRNA, sadece 5' terminal bölgesinde snoRNA şapkası taşıyan RNA'lar ise SPA-LncRNA olarak isimlendirilmektedir. Ayrıca bazı LncRNA'ların 3'uçlarından Ribonükleaz P tarafından alternative kesim yaplmaktadır. Bu kesim sonucunda tRNA'ya benzer LncRNA'lar oluşabilmektedir (Şekil 17).



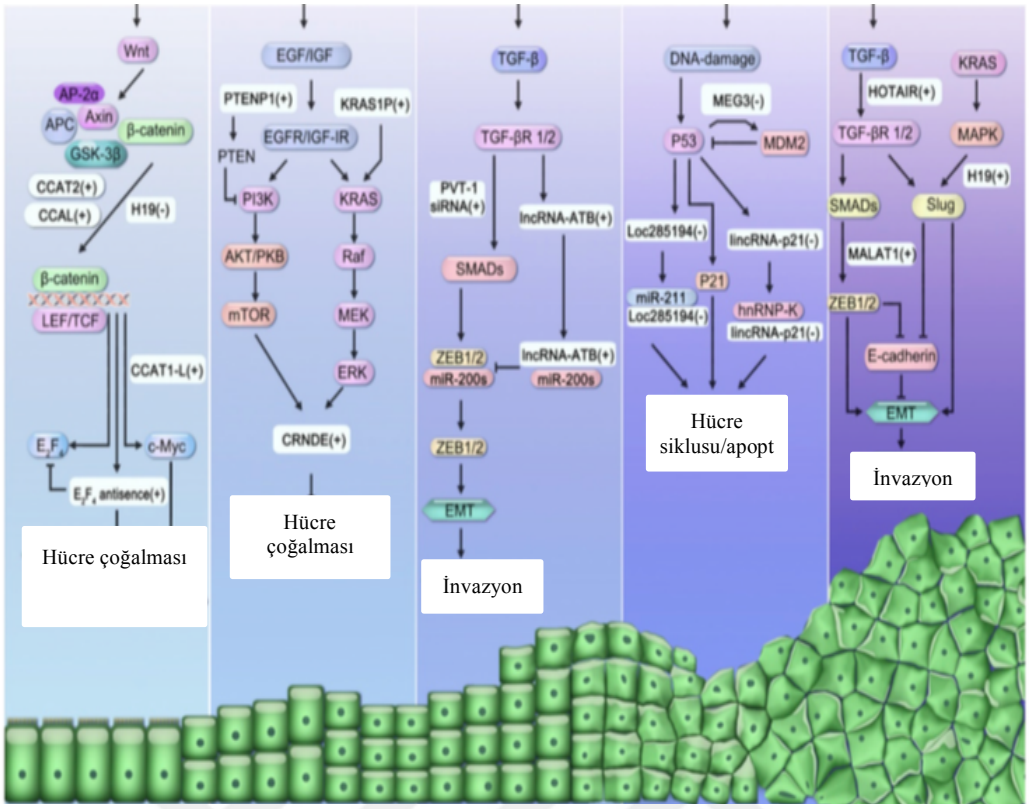
Şekil 17. LncRNA'ların genomda kodlandıkları bölgeler ve yapıları. a. LncRNA'lar enhansır ve prmotör bölge gibi DNAdaki fonksiyonel elementlerinden transcribe edilebilmektedir. b. Sense, antisense, her iki yönden, genlerden ve intronlardan transcribe edilen LncRNA'lar. c,d. snoRNA şapkası taşıyan sno-LncRNA ve SPA-LncRNA'lar. e. RNase P tarafından alternative kesimi sonucunda oluşan düz LncRNA ve tRNA benzeri LncRNA. f,g. ekzonlardan oluştuğu için ekzonların geri birleştirilmesi ile oluşan dairesel LncRNA ve intronlardan meydana gelen CiRNA (Fan ve ark., 2018).

LncRNA'lar hücre içinde bulundukları lokasizyonlara göre nükleer ve sitoplazmik olarakta gruplandırılabilmektedirler. Sitoplazmada yer alan LncRNA'lar mRNA'lar ve proteinler üzerine etki göstererirken nükleer LncRNA'lar Histon modifikasyonlarında katılarak kromatinlerin yeniden düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Ayrıca nükleer LncRNA'ların RNA pol II (RNase P) ve transkripsiyon faktörlerinin etkileşimlerini engeleyerek transkripsiyon sırasında görev aldıkları da savunulmaktadır. (Tablo 3).

Tablo 3. LncRNA'ların fonksiyonel mekanizmaları

Etki Mekanizması	LncRNA	Fonksiyonu
Kromotin Modifikasyonalrı	LncPRESS1	Kök hücrelerin korunması
	NEAT1	Hücre büyümesi
	HOTTIP	Karaciğer ve pankreas tümörlerinde ilerleme
	FOXC1	Meme kanseri oluşumu
	NBAT-1	Agresif nöroblastoma gelişimi
Alternatif Kesim	SPA1, SPA2	Preader-Willi sendromu patogenizi
	LncRNA BC200	Meme kanseri oluşumu
mRNA stabilitesi/modifikasyonu	KRT7-AS	Mide kanserlerinde migrasyon
	MEG3	Hepatoselüler kanserlerde siroz
	FOXM1-AS	Glioblastoma oluşumu
miRNA silme	TP73-AS1	Çeşitli kanserlerde proliferasyon ve invazyon
	CASC2	İlaç direni
Proteinlerin aktivasyonların da/lokalisazyonlarında değişimler	HULC	Çeşitli kanserlerde metastaz
	LINK-A	Meme kanseri oluşumu
	SNHG5	Mide ve kolon kanseri oluşumu
Hücre içi sinyalisazyon	LncARSR	Renal kanser oluşumu
	H19	Hepatik karsinomada damarlanma

KRK tümörlerinde yapılan çalışmalarda tümör baskılayıcı ve onkogenik özellik gösteren bir çok LncRNA tanımlanmıştır (Zhou ve ark., 2009; Matouk ve ark., 2016; Ca, ve ark., 2018). LncRNA'ların KRK'larda genomda spesifik lokuslara ve histonalara bağlanarak kromomatinlerin yeniden düzenlenmesinde, sitoplazmada mRNA'ları ve miRNA'ları hedefleyerek bu RNA'ların yıkımında, proteinlerin hedef bölgelerine taşınmasında, çeşitli bileşenlerin bir araya gelmesinde adaptör görevi yaparak gen regülasyonunda görev alarak adeno-karsinoma sürecinde belirleyici görevler aldıkları belirtilmektedir (Şekil 18).

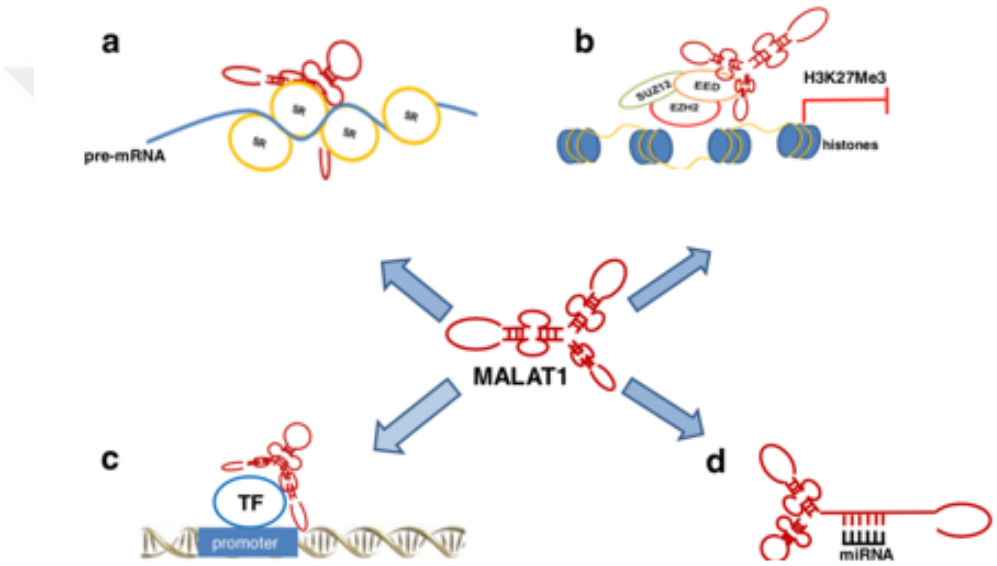


Şekil 18. KK'ların oluşum basamaklarında LncRNA'ların rolleri (Liang ve ark., 2016).

KK ile ilişkili transkript-1 (colon cancer-associated transcript-1; CCAT1), 8q24.21'da lokalize 2628 baz büyüklüğünde bir LncRNA'dır. CCAT1'in aşırı ekspresyonu, KK başta olmak üzere, özofagus skuamöz hücreli karsinom, hepatoselüler karsinom tümörlerinde belirlenmiştir. Düzensiz CCAT1 ekspresyonu KK'larda genel sağkalım, lenf nodu metastazı ve TNM evrelemesi gibi klinik parametrelerle ilişkilendirilmektedir (Ge ve ark., 2016; Zhiang ve ark., 2017). CCAT1 genomda intergenik bölgeden CCAT1-L ve CCAT1-S olmak üzere iki izoform şeklinde transkribe edilmektedir. CCAT-1, c-Myc'nin promotör bölge aktivasyonunu arttırmakta ayrıca SOX2 ve TP53 ile DNA/RNA/Protein etkileşimene örnek oluşturmaktadır. Bu etkileşim sonucunda EGFR sinyal yolağı aracılığı ile MEK/ERK1 ve PI3K/Akt sinyal yolakları aktif hale geçmektedir (Sotelo ve ark., 2017).

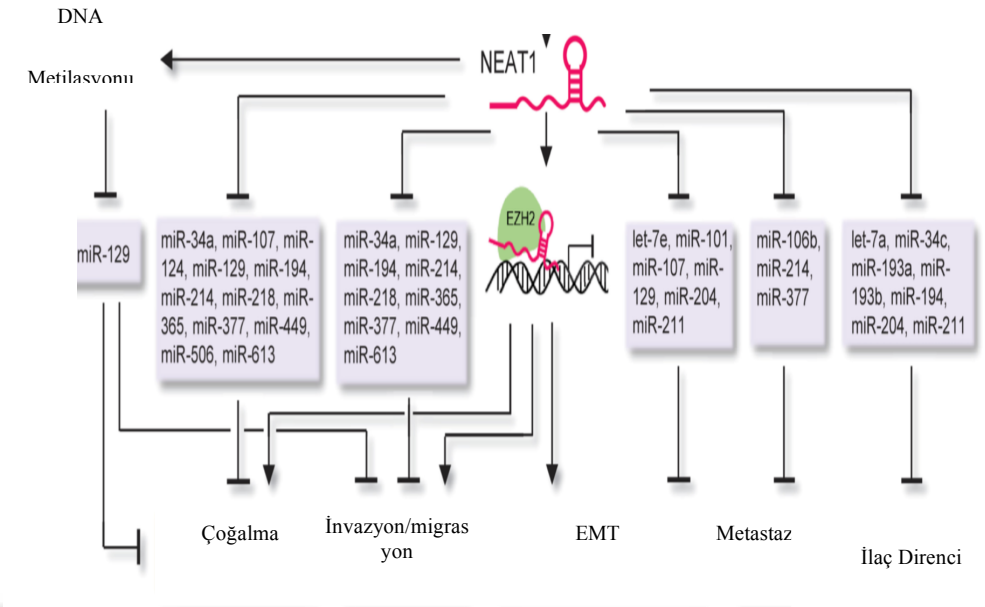
Metastaz ile ilişkili akciğer adenokarsinom transkripsiyon 1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcrip; MALAT1) nükleer zenginleştirilmiş transkript 2'den (NEAT2) transkripte edilen, 8.1 kb uzunluğunda bir LncRNA'dır. Nükleusta lokalize olan MALAT1, serine/arjinin (SR) kesim faktörlerini etkileyerek mRNA kesiminden ve mRNA'nın dışa aktarımında görev almaktadır

(Zhang ve ark., 2017). MALAT1, PRC2 bileşenlerinden EZH2, SUZ12 ve EED ile etkileşime girmekte ve lizin 27'de (H3K27me3) histon H3'ün trimetilasyonunu teşvik ederek hedef gen veya miRNA ekspresyonunu azaltmaktadır. Ayrıca MALAT1, hedef genlerin promotörüne transkripsiyon faktörünün (TF) bağlanmasını kolaylaştırarak mRNA transkripsiyonunu etkileyebilir ve bir sünger olarak işlev görerek miRNA'ları sekrete edebilmektedir (Li ve ark., 2018). MALAT1'in kolorektal karsinom büyümesini veya metastazı tetiklediği bilinmektedir (Şekil 19).



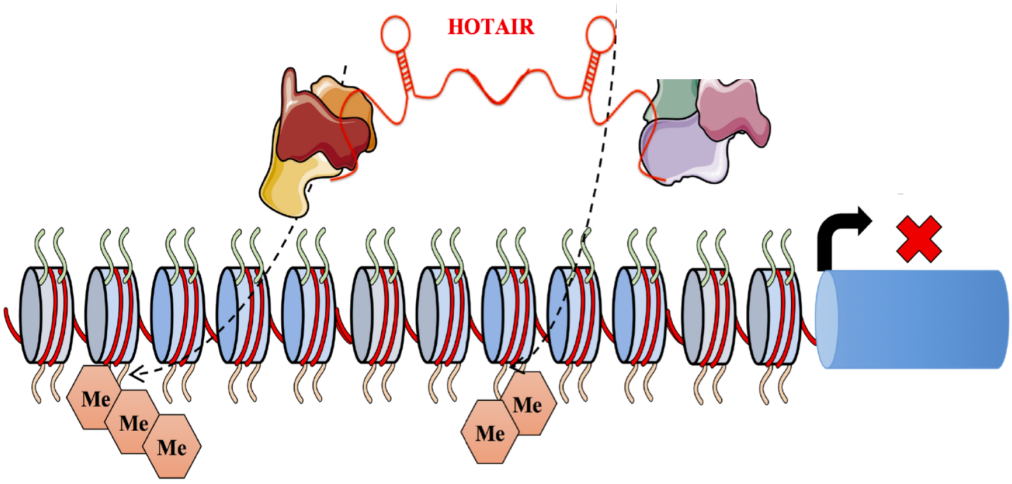
Şekil 19. MALAT1'in etki mekanizmaları (Li ve ark., 2018).

Nükleer paraspeckle düzeneği transkripsiyonu 1 (Nuclear paraspeckle assembly transcript 1; NEAT1), 11q13.1'da lokalize ailesel tümör sendromu multipl endokrin neoplazisi (MEN) tip 1 lokusundan NEAT1-1 (3756 bp) ve NEAT1-2 (743 bp) şeklinde iki izoform olarak transkribe edilmektedir. NEAT1 hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunabilmektedir (Zhang ve ark., 2016). NEAT1, Histon metilasyonlarında ve miRNA'ların baskılanmasında rol oynayarak birçok kanserde tümörün oluşumundan ve ilerlemesinden sorumlu tutulmakta, metastaz, nüks oranı ve kısa sağkalım gibi klinik özelliklerle ilişkilendirilmektedir (Şekil 20).



Şekil 20. NEAT'in etki mekanizması (Chang ve ark.,2018)

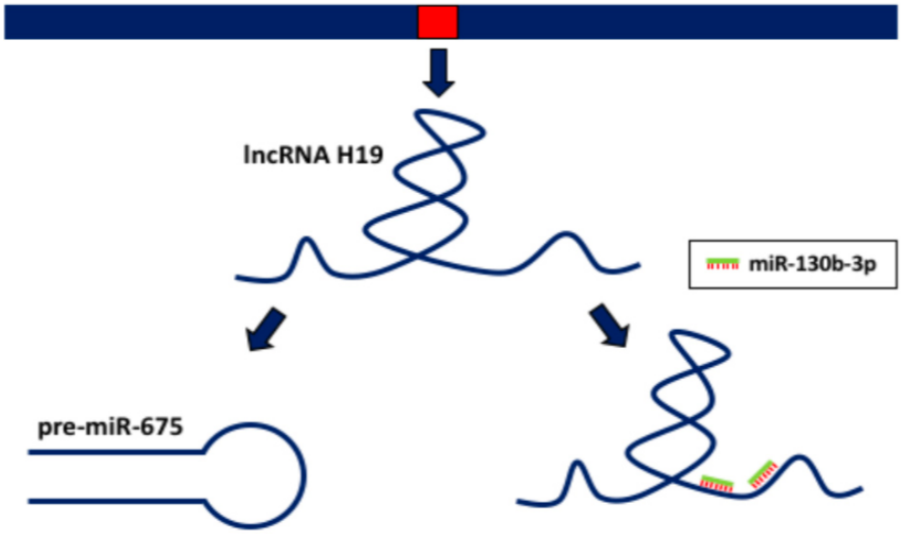
Hox transkript antisense RNA (HOTAIR), 12q13.13 lokalisazyonundan transkribe edilen 2.158 bp büyüklüğünde bir LncRNA'dır. HOTAIR'in kolon, meme, pankreas, karaciğer mide ve özofagus kanserlerinde onkojenik fonksiyona sahip olduğunu bildirilmektedir (Wang ve ark., 2016; Yu ve ark., 2018). HOTAIR, HOXD lokasyonunda PRC2 ve LSD1 kompleksinin oluşuma katkı sağlamaktadır. HOTAIR'in, 5` ucunda PRC2 kompleksi, 3` ucuna ise histon lisin demtilazını (LSD1) bağlanarak Histon metilasyonlarında görev almaktadır. HOTAIR'in yüksek ekspresyonu KK'larda kısa sağ kalım ve metastaz ile ilişkilendirilmektedir (Şekil 21).



Şekil 21. HOTAIR'in etki mekanizması (Whang ve ark., 2016).

LncRNA H19, 11p15.5'de lokalize olup embriyonik gelişim sırasında bol miktarda ekspresyonu gözlenirken doğum sonrası ekspresyonu oldukça azalmaktadır. H19 onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak birçok kanserin ilerlemesinde önemli bir role sahiptir (Liang ve ark., 2017).

H19, miR-675'in öncül geni olarak bilinmektedir. H19, bu mirNA'nın oluşumunu desteklerken, miR-130b-3p'yi baskılamakladır. H19'un yüksek ekspresyonu, KK hastalarında tümör farklılaşması ve ileri TNM evresi ile ilişkilendirilmektedir (Zhou ve ark., 2017) (Şekil 22).



Şekil 22.H19'un etki mekanizması (Zhou ve ark., 2017).

CRNDE, 16. kromozom üzerinden kodlanan 1910 baz uzunluğunda bir LncRNA'dır. KK'larda yüksek CRNDE lenf nodu metastazı varlığı ile ilişkilendirilmektedir (Whang ve ark., 2018).

ANRIL, kromozomal hastalıkla ilişkili polimorfizmler için yüksek penetrans içeren 9p21 bölgesinde bulunmaktadır. ANRIL, CDKN2A/B'yi epigenetik mekanizmalar ile düzenleyerek hücre çoğalmasını ve yaşlanmasını kontrol etmektedir. Bu LncRNA kromatinlerin yeniden düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Polycomb protein kompleksleri 1 ve 2 (PRC1 ve PRC2), sırasıyla CBX7 ve SUZ12 alt ünitelerinde RNA bağlama alanlarına sahiptir. ANRIL, histon 3'te 27. Lizinin (H3K27) ve bunun sonucu olarak CDKN2A / B lokusunun susturulmasını sağlamak için SUZ12 PRC2 alt ünitesine bağlanmaktadır. ANRIL, CBX7'yi PRC1'e bağlar; bu, histon 2A'da lizin 19'da (H2AK119) değişiklik yaparak H3K27'nin tanınmasını ve susturmasını sağlamaktadır (Rinn ve ark., 2018; Zao ve ark., 2019). Bu nedenle, ANRIL modülasyonu, polietilen proteinlerinin baskı kabiliyetini etkilemekte, CDKN2A/B ve muhtemelen diğer uzak lokusların ekspresyonunu histon modifikasyonu ile indüklemekte veya inhibe etmektedir .

SNHG16, 17q25.1'de lokalizedir. SNHG16, mide, hepatoselüler karsinom ve beyin tümörlerinde tümör agresifliği ile ilişkilendirilmektedir. Bu LncRNA miRNA'ları degrede ederek etkisini göstermektedir. Bu RNA'nın ekspresyonu KK'larda, ASCL2, ETS2 ve c-myc dahil olmak üzere Wnt ile düzenlenen transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu ile pozitif yönde ilişkili bulunmuştur (Guttman ve ark., 2018). KK'larda Wnt sinyalinin in vitro olarak susturulduğunda SNHG16'nın ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (Prensner ve ark., 2018). SNHG16'nın susturulması ayrıca KK'larda canlılığın azalmasına, apoptotik hücre ölümünün artmasına ve hücre göçünün bozulmasına neden olmaktadır. SNHG16 lipit metabolizmasında görev alan genleri ve miRNA'ları etkileyerek bu mekanizmada da rol oynadığı belirtilmektedir (Ostmon ve ark., 2018).

TUSC7, 3q13.31 kromozomal bölgesinde bulunan, LSAMP antisens RNA3 (LSAMP-AS3), LINC00902 veya LncRNA LOC285194 olarak da adlandırılan yeni belirlenmiş bir LncRNA'dır. TUSC7, kanser hücrelerinde p21, p27 ve siklin D1 ekspresyonunu inhibe ederken siklin A2, siklin Bl ve Bcl2 ekspresyonunu teşvik etmektedir (Nagane ve ark., 2014). TUSC7, transkripsiyonel olarak P53 tarafından

düzenlenmektedir. KK'larda TUSC7, miR-21 ve miR-22'yi lncRNA/miRNA etkileşimi ile inhibe etmektedir. Ayrıca CDK6, PTEN ve EphA8'in transkripsiyonel aktivitelerinin artmasını sağlamaktadır (Molinorei ve ark., 2016).

Psödogen fosfataz ve tensin homolog psödojenik 1 (PTENP1) 9p13.3'te lokalizedir. PTENP1 PTEN'den daha kısa bir 3'UTR içermektedir (Ji ve ark., 2013; Xiang ve ark., 2016). KK'larda dahil olmak üzere bir çok kanserde tümör baskılayıcı olarak görev almaktadır. PTENP1, PTEN'nin 3'UTR'sini hedefleyen miRNA'ları degrede ederek PTEN'nin aktivasyonunu sağlamaktadır (Zhang ve ark., 2018).

BRAF aktive edici LncRNA (BANCR), 9. kromozomda lokalizedir. Yüksek BANCR ekspresyonu KK'larda lenf nodu metastazı ve kısa sağkalım ile ilişkilendirilmektedir.

MEG3,PCAT1, DANCR kanser ile ilişkili diğer önemli LncRNA'lardır. Bu LncRNA'ların ekspresyon profilleri tümör tipine ve popülasyonlara göre değişim göstermekle birlikte KK'larda tümör hücrelerinin invazyonuyla ilişkili olabileceği savunulmaktır (Ding ve ark., 2015; Kalluri ve Weingber, 2009; Zeisberg ve ark., 2009).

2.1.1.6.KK'larda Metastaz Oluşumu

Takip süresi içerisinde KK'ların yaklaşık %35-55'inde senkron ya da metakrom karaciğer metastazı görülmektedir. Metastazektomi, bu hastalarda en etkili tedavi yöntemidir. Ancak uygulanan bu cerrahi rezeksiyon sonrası hastaların yaklaşık %50-70' in de nüks oluşabilmektedir. Ayrıca bu hastalarda 5 yıllık sağ kalım %25-50 oranındadır.

2.1.1.6.1. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş

Metastaz, tümör hücresinin ana tümör kaynağından ayrılarak uzak organa göç etmesi olayıdır. Bir metastazın gelişebilmesi için tümör hücrelerinin primer kitleden ayrılıp, çevre dokuya invazyonu ile oluşan bir dizi süreci tamamlaması gerekmektedir. Metastatik tümör hücrelerinin, normal doku organizasyonundan kopup, hipoksi, yetersiz besin kaynağı, hipoperfüzyon, savunma sistemi gibi

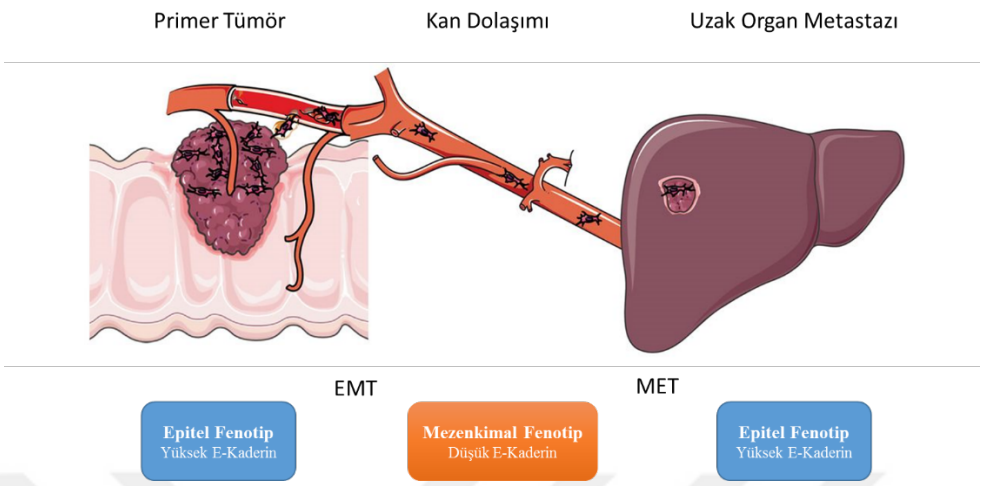
çevresel zorluklara dirençli olmaları gerekmektedir. EMT, PI3K, AKT, mTOR, RAS, MYC, HIF1, TGFB ve TP53 gibi çeşitşi sinyal yolaklarını kullanarak, KK'da uzak organ metastazı oluşumunda görev alan temel mekanizmadır. Bu mekanizma, normal dokuda, embriyogenez ve yara iyileşmesi sırasında epitelyal hücrelerin mezenkimal karakter yeteneği kazandığı biyolojik bir süreç olarak kabul edilmektedir (Thiery ve Sleeman, 2006).

EMT, gösterdiği fonksiyona göre üç alt tipe ayrılmaktadır. Tip 1 EMT, implantasyon, embriyonik gastrulasyon ve organ oluşumu ile ilişkilidir. Tip 1 EMT ayrıca mezoderm ve endoderm ile mobil sinir krest hücrelerinin oluşmasını sağlamaktadır. İlkel epitel, özellikle epiblast, EMT'ye kadar primer mezenkimi oluşumuna yol açmaktadır. Bu primer mezenkim, MET ile sekonder epitel oluşturmak için yeniden uyarılabilmektedir. Tip 1 EMT, astrositler, adipositler, kondrositler, osteoblastlar ve kas hücreleri dahil olmak üzere bağ dokusu hücrelerini üretmektedir. İltihaplanma ve fibroz bağlamında devreye giren EMT, tip 2 grubunu oluşturmaktadır. Tip 1 EMT'nin aksine, tip 2 EMT uzun bir süre boyunca aktif kalabilmektedir. Kanser gelişiminde meydana gelen EMT ise tip 3'ü oluşturmaktadır. Tip 3 EMT, bir çok morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sonucu epitel hücrelerin epitel özelliklerini kaybederek, migrasyon&invazyon kapasitesi artmış, ekstraselüler matriks bileşenlerini fazla miktarda üreten ve apoptozise direnç gösteren kanser kök hücre yeteneklerine sahip mezenkimal hücre özellikleri kazanmasıyla karakterizedir (Takai ve ark., 2015).

EMT sürecine dahil olan tümör hücreleri kök hücre özelliği gösterdikleri bilinmektedir. Kanser kök hücre çalışmaları bu tip hücrelerin çoklu ilaç direncine sahip olduklarını vurgulamaktadır. Ayrıca, EMT mekanizmasında görev alan sinyal yolaklarından bazıları (RAS, P53 vs), çoklu ilaç dirençliliğine sahip hastalardan elde edilen tümör dokularda da anlamlılık gösterdiklerinden dolayı bu iki mekanizmanın bir biri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Lin ve ark., 2012).

Kolon kanserlerinde EMT süreci, hücre-hücre etkileşimlerde görevli olan ve *CDH1* geni tarafından transkribe edilen E-kaderinin kaybı ile başlamaktadır. Daha sonra transkripsiyon faktörlerinin artması ile hücre yüzey ve iskelet proteinlerin yeniden düzenlenmesi, bazal-apikal polarizasyonun kaybına ve hücre migrasyonu için gerekli olan ön-arka polarizasyonun kazanımına, hücre içi

bütünlük kaybına, ekstraselüler matriksi bozulmasına ve sitoiskelet modifikasyonlarına neden olmaktadır (Şekil 23).



Şekil 23. KK'da EMT süreci (Zhang ve ark.,2014).

2.1.6.1.1. EMT sürecinde E-Kaderin Düzenlenmesi

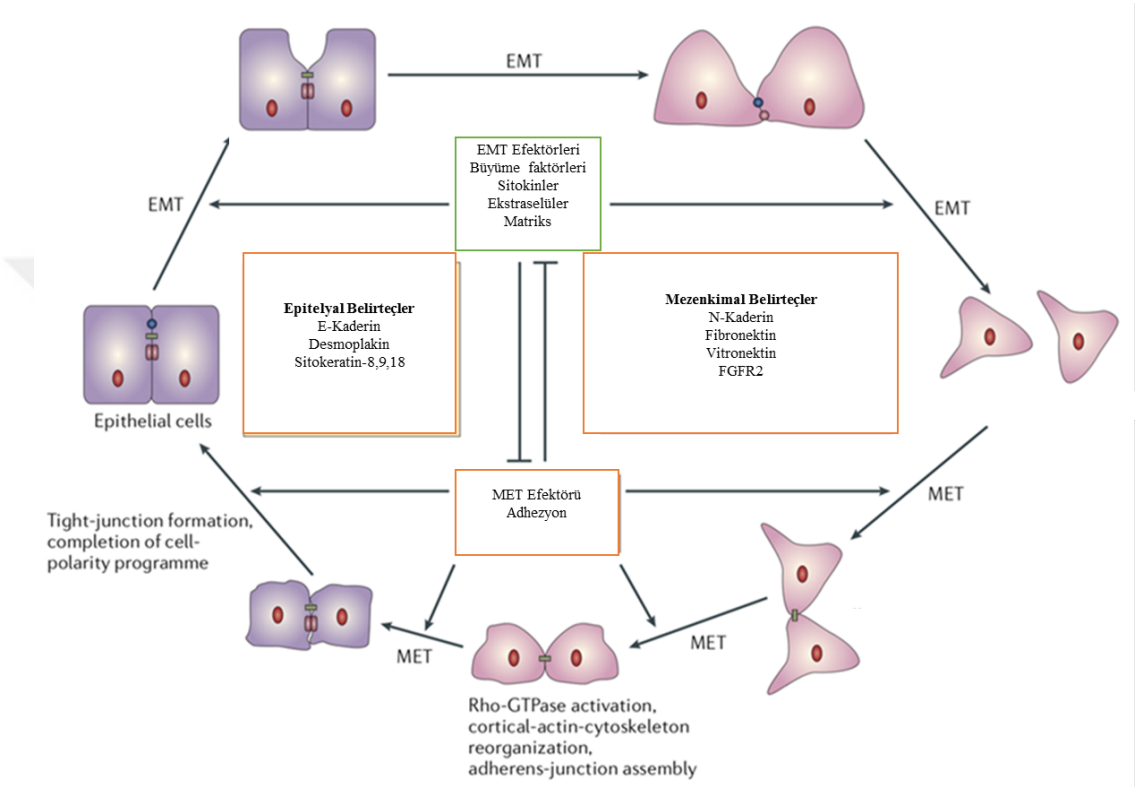
Epitelyal hücreler, adheren bağlantılarında esas olarak, tip I kaderin ailesine ait E-kaderin transmembran glikoproteinini kullanmaktadırlar. Bu sayede, epitelyal hücreler hareketsiz (immobil) kalabilmekte ve fiziskel olarak bağlı bulunmaktadırlar. EMT sürecinin bilinen en karakteristik bulgularından bir tanesi, azalan *E-kaderin* ekspresyonu ve artan *N-kaderin* ekspresyonu ile hücre-hücre adezyon kaybıdır. *E-kaderin* promotörünün transkripsiyonel baskılanması, proteolitik kesim, *CDH1*'deki somatik mutasyonlar, kromozomal delesyonlardan ve epigenetik bozukluklardan kaynaklanabilmektedir (Moody ve ark., 2015).

2.1.6.1.2. EMT Sürecin de Transkripsiyon Faktörleri

EMT süreci ile ilişkilendirilmiş çeşitli transkripsiyon faktörleri vardır. Bu transkripsiyon faktörlerinin tamamı *E-kaderin* transkripsiyonunu doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir.

Son zamanlarda bu proteinlerin arasında hiyerarşik ilişkiler gösterilmektedir. Örneğin Snail1, EMT sürecinin başlamasında en fazla aktif olan proteinken, Snail2, ZEB1/2 ve Twist, mezenkimal durumun korunumunda daha etkin görev almaktadır. Yüksek Snail ekspresyonu gösteren meme kanser

hücrelerinin, EMT sürecine girdiğini ve immün direnç artışı gösterdiği rapor edilmiştir (Whang ve ark., 2016). Epidermoid karsinom hücrelerinde ektopik Snail eskpresyonunun EMT'yi uyardığı ve artmış invazif karakter ve motiliteyi gösteren çalışmalar vardır. Bu *E-kaderin* baskılayıcılarının aktiviteleri, çeşitli hücresel yolaklar ile düzenlenmektedir (Wills ve ark., 2016). EMT belirteçleri ve bu belirteçlerin etkileri Şekil 24'de belirtilmektedir.



Şekil 24. EMT sürecinde görev alan proteinler (O'Brain ve ark., 2018).

2.1.6.1.3. EMT sürecinde LncRNA'ların rolü

MALAT1, EMT mekanizmasını kullanarak kanser hücrelerinin metastaz sürecine girmesine neden olmaktadır. İn-vivo ve in-vitro çalışmalarda MALAT1'in ZEB1, ZEB2 ve Slug'ı etkileyerek E-kaderin kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca KK'larda MALAT1'in Snail ekspresyonunu arttırarak EMT sürecine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Xu ve ark., 2015).

HOTAIR, EZH2'yi hedef alarak *E-kaderinin* baskılanmasını, MMP-9 ve Vimentin ekspresyonlarının ise artmasını sağlayarak EMT sürecine katılmaktadır. Linc00617, meme kanseri hücrelerinin onkojenik aktivitesini destekleyen Sox2'nin transkripsiyonunu aktive ederek EMT'yi uyarmaktadır. Hepotoselüler

karsinomalarda LncRNA AOC4P'nin vimentini bağlayarak EMT'yi inhibe ettiğini gösterilmiştir. Son çalışmalarda henüz kesin veriler elde edilmemesine rağmen bazı LncRNA'ların tümör mikroçevresini etkilenebilecekleri bildirmektedirler (Qi ve ark., 2017; Huarter ve ark., 2018).

2.1.1.6.2. *MACC1* ve *NM23-H1* Ekspresyon Değişimleri

MACC1 ve *NM23-H1* genleri KK'da metastaz oluşumu ile ilişkilendirilmektedirler. *MACC1*, 7p21.1 de lokalize, yedi ekzondan oluşan bir gen olup 852 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır. Bu protein, HGF sinyal yolağında görev alan c-*MET*'in promotör bölgesine bağlanarak bir transkripsiyon faktörü özelliği göstermektedir. HGF/MET sinyal yolağını aktif hale geçmesi sonucunda tümör yayılımı hızlanmaktadır. KK'larda yüksek *MACC1* ekspresyonunun, uzak metastaz riski taşıyan hastalarda tanı koydurucu bir biyobelirteç olabileceğinin vurgulamaktadır (Dowson ve ark., 2015; Ozturk ve ark., 2018).

NM23-H1'in içinde bulunduğu *Nm23*, ilk tanımlanan metastaz baskılayıcı gen ailesidir. *NM23-H1*, 17q22'de konumlanmaktadır. Bu gen, bir difosfot kinaz (NDP-K) olan NDPK-A'yı transcribe etmektedir. NDP-kinaz enzimleri G proteinine GTP (guanin tri fosfat) bağlayarak hücre içi sinyal iletimini kolaylaştırmaktadırlar. *NM23-H1*, LPA, EDG2, c-MET gibi hücre yüzey reseptörlerinin ve büyüme faktörlerinin kontrolünü sağlamaktadır (Celesti ve ark., 2013; Heland ve ark., 2015).

2.1.1.6.3. Tümör Tomurcuklanması

İnvaziv neoplastik hücrelerin en temel özellikleri yeni dokulara metastaz yapma yetenekleridir. Bu işlemdeki ilk adım, bu hücrelerin farklılaşarak primer tümör lokalizasyonundan ayrılmasıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda TB bu süreci gösteren histopatolojik bir bulgu olduğu vurgulanmaktadır. TB'nin tümörün en invaziv komşuluğundaki stromada bulunan bir ya da en fazla beş hücreden küçük tümöral hücre kümeleri olarak tanımlanmaktadır. Son dönemde yapılan çalışmalarda bu histopatolojik bulgu EMT sürecinin kanıtı olarakta görülmektedir (Melonn ve ark., 2016). Retrospektif araştırmalardan bazıları KK'lardaki TB varlığının karaciğer metastazı dışında, pankreas, meme, baş-boyun

ve akciğer metastazlarının oluşumunda da etkili olduğunu belirtmektedir (Jeon ve ark., 2017; Xiue ve ark., 2018).

Anabilim Dalımız tarafından 2009 yılı itibari ile gerçekleştirilen KRK çalışmalarında özellikle erken evre KRK'larda uzak metastaz potansiyelinin öngörülmesinde kullanılabilecek belirteçlerin tanımlanması amaçlanmaktadır. Bu kapsamda çoklu gen ve mikroRNA taramaları yapılmış olup Türk popülasyonuna ait kolorektal tümörlerin genetik ve epigenetik mekanizmaları araştırılmış, bulgular literatüre sunulmuştur (Tunca ve ark., 2013; Ak ve ark., 2013). Lenf nodu metastazı veya uzak organ metastazı bulunmayan erken evre KK'larda adjuvan tedavi hala tartışma konusu olduğu için aynı ekip tarafından daha sonraki yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar herhangi bir kötü prognoz faktörü taşımayan erken evre KK'lara spesifik hale getirilip bu tümörlerde sistemik nüks potansiyelini saptamada kullanılabilecek biyobelirteçlerin araştırılmasında yönelik olmuştur. Türk popülasyonunda gerçekleştirdiğimiz hasta tabanlı çalışmalarda, bu spesifik KK hastalarının %15'inde uzak metastaz gelişimi saptanmış ve değerlendirilen bir çok parametreden tümör tomurcuklanması varlığı ile yüksek *MACC1* ve düşük *NM23-H1* ekspresyonlarının, metastaz gelişiminde anlamlı oldukları tespit edilmiştir (Öztürk ve ark., 2018).

Mevcut tez kapsamında;

- Gastrointestinal sistem tümörlerinde metastaz ile ilişkilendirilen LncRNA'ların erken evre KK'lardaki ekspresyon profillerinin belirlenmesi
- LncRNA'ların takip süresi içerisinde metastaz geliştiren erken evre KK'lardaki ekspresyonlarının incelenmesi
- LncRNA'ların kolon tümörlerinin demografik, histopatolojik, biyolojik özellikler üzerine olası etkilerinin belirlenmesi
- LncRNA'ların, önceki çalışmalarımızda anlamlılığı tespit edilen TB varlığını, *MACC1* ve *NM23-H1* ekspresyon düzensizlikleri ile ilişkilerinin incelenmesi
- Önceki çalışmalarımızda anlamlılığı tespit edilen TB varlığının, *MACC1* ve *NM23-H1* ekspresyon düzensizliklerinin vaka sayısı arttırılan hasta grubunda validasyonlarının yapılması ve bu belirteç adaylarının EMT mekanizması ile ilişkilerinin aydınlatılması hedeflenmektedir.

Böylece, adjuvan tedavi seçeneği tatışılan ancak cerrahi rezeksiyon yetersiz kaldığı için takip süresi içerisinde yaklaşık %15 oranında uzak organ metastazı geliştiren erken evre KK'larda tedaviyi belirleyecek, klnik, histopatolojik, genetik ve epigenetik değişimler incelenerek, yeni kötü prıognostik belirteçlerin tanımlanması amaçlanmaktadır.

Ayrıca, biyobelirteç yardımı ile uzak organ metastaz oluşma potansiyeli belirlenen, erken evre tümörlerde önerilecek KK'lar için temel tedavi seçeneği olan 5-FU tabanlı adjuvan tedavinin bu tümörler için uygunluğu, anlamlılığı belirlenen belirteçlerin, 5FU direnç modeli oluşturulan KK hücre hatlarında incelenecektir.

Bu kapsamda mevcut tez çalışmasında,

- KK hücre hattında 5FU direnç modelinin oluşturulması ve dirençli hücrede hücre proliferasyonu ve apoptoz belirlenerek direnç modelinin kontrolünün sağlanması
- 5FU direnç gelişim sırasında MACC1, NM23-H1 ve LncRNA ekspresyonlarının analiz edilerek bu moleküllerin ilaç direnci üzerine olası rollerinin belirlenmesi
- Literatürde ilaç direnci ve metastaz ile ilişkilendirilen EMT mekanizmasının KK hücrelerinin 5FU direnç kazanım sürecindeki rollünün belirlenmesi
- KK hücrelerinin 5FU direnci kazanırken, dirençli hücrelerin invazyon ve koloni oluştuma yetenkelerinin incelenerek bu hücrelerin metastaz yapma yeteneklerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Mevcut tez ile elde edilecek anlamlı bulgular sonucunda, tedavi protokolü belirlenemeyen erken evre KK hastalarında metastaz potansiyelinin saptanarak tedavisinin doğru bir şekilde planlanabilmesi ve yeni hedefe yönelik tedavi protokollerini oluşturulabilmesine olanak sağlayacak çalışmalara katkı sağlayacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1 Kullanılan Aletler ve Cihazlar

+4 Soğutucu (Asterm, Türkiye)

-20 Derin Dondurucu (Bosch, Türkiye)

-20 Derin Dondurucu (Vestel, Türkiye)

-80 Derin Dondurucu (Nüve, Türkiye)

-80 Derin Dondurucu (Panasonic, Japonya)

-150 derin dondurucu (Panasonic, Japonya)

Santrifüj (Nüve, Türkiye)

Mikrosantrifüj (Cleaver Scientific, İngiltere)

Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter, ABD)

Soğutmalı Santrifüj (Labogene, Danimarka)

Laminer Kabin (Labogene, Danimarka)

UV Kabin (Biosan, Letonya)

Hasas Terazi (AND, Japonya)

Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)

Vorteks (Biosan, Letonya)

UV/Vis Spektrofotometre (Beckman Coulter, ABD)

Isıtıcı Blok (Cleaver Scientific, İngiltere)

24 Kuyulu Çalkalayıcılı Isıtıcı Blok (Biosan, Letonya)

20 Kuyulu Isıtıcı Blok (Techne, İngiltere)

Yatay Elektroforez (Biorad, ABD)

Yatay Elektroforez Jel Sistemi (Maxicell, ABD)

Mikrodalga Fırın (White-westinghouse, ABD)

UV Görüntüleme Cihazı (Vilber, Fransa)

Etüv (Ecocell, Almanya)

CO_2 İnkübatör (Panasonik, Japonya)

Su Banyosu (Nüve, Türkiye)

Profilex PCR sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Otomatik DNA Dizileme (Beckman coulter, ABD)

Thermal Cycler (Biorad, ABD)

Light Cycler 480 II Real-Time PCR (Roche, İsviçre)

Step One Plus System Real-Time PCR (Applied Biosystem, ABD)

Otomatik DNA Dizi Analizi Cihazı (Beckman Coulter, ABD)

Multimode-reader (Berthold Technologies, ABD)

Fluoroskan Microplate Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Muse Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya)

Işık Mikroskubu (Olympus, Japonya)

İnverted mikroskop (Labomed, ABD)

Multipipet (Boeco, Almanya)

0.5-10ul pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

10-100ul pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

20-200ul pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

100-1000ul pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

Pipet Controller (Accumax, Hindistan)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Ethennol %99 HPLC Grage (Sigma Aldrich, ABD)

Methanol %99 HPLC Grage (Sigma Aldrich, ABD)

İzopropanol %99 HPLC Grage (Sigma Aldrich, ABD)

Ksilen (Sigma Aldrich, ABD)

TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Agaroz (Lonza, İsviçre)

Etidiyum Bromid (Amresco, ABD)

Dna Gel Loading Solution (Thermo Fisher Scientific, ABD)

DNA Leader (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Tris Base Buffer (Multicell, Wisent Bio Products, Kanada)

Boric Asit (Multicell, Wisent Bio Products, Kanada)

Edta (Multicell, Wisent Bio Products, Kanada)

E.Z.N.A. FFPE DNA Kit (Omega Bio-tek, ABD)

HS Prime Premix (GeNET Bio, Kore)

Multi HS Prime Premix (GeNET Bio, Kore)

Exprime Taq Premix (GeNET Bio, Kore)

Dye Labeled Oligos (Bio-Synthesis, ABD)

DNA Size Standard Kit 600bp (Beckman Coulter, ABD)

GenomeLab Separation Buffer (Beckman Coulter, ABD)

Separation Gel LPAI (Beckman Coulter, ABD)

Sample Loading Solution (Beckman Coulter, ABD)

Mineral Oil (Beckman Coulter, ABD)

RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hollanda)

High Pure RNA Isolation Kit (Roche, İsviçre)

High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)

SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Taqman Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, ABD)

TaqMan Non-coding RNA Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Taqman Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)

QuantiTect Primer Assays (Qiagen, Hollanda)

QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hollanda)

Dimetil Sülfoksit (Sigma Aldrich, ABD)

HCl (Sigma Aldrich, ABD)

Paraformaldehit (Sigma Aldrich, ABD)

Gluteraldehit (Sigma Aldrich, ABD)

Tripan Blue (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Dulbecco's modification of Eagle medium (DMEM) (Sigma Aldrich, ABD)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries, ABD)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma Aldrich, ABD)

Sodium Pyruvate (Merck Biochom, Almanya)

Penicillin-Streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Tripsin EDTA (%0.25), fenol red (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Cell Proliferation Reagent WST-1 Kit (Boivison, ABD)

Cell Proliferation Reagent WST-1 Kit (Boster, ABD)

L-Glutamin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Muse Annexin V&Dead Cell Kit (Merck Millipore, Almanya)

Klonojenik Analiz Kiti (Biopionner, ABD)

Transwell Migration Assay (Thermo Fisher Scientific, ABD)

CytoSelect 24-well Wound Healing Assay Kiti (Fluorometric) (Boivison, ABD)

Senesence Beta-Glactosidase Staning Kit (Cell Signaling, ABD)

5-Fluorouracil (Sigma Aldrich, ABD)

3.2. Yöntem

3.2.1 Evre I/II Kolon Tümörlerinde Takip Sırasında Oluşan Sistemik Nüksün Belirlenmesinde Kullanılabilecek Belirteçlerin Araştırılması

Erken evre kolon kanserlerinde standart tedavi cerrahi rezeksiyondur. Ancak tümörün kötü prognostik faktörleri (tanısının müsinöz komponent yada taşlı yüzük olması, lenfatik veya vasküler invazyona sahip olması) taşıması durumunda hastaya cerrahi rezeksiyonun ardından adjuvant kemoterapi uygulanmaktadır. Bununla birlikte kötü prognoz faktörlerini taşımayan erken evre kolon kanserlerinin %10-20'sinde rezeksiyon sonrası takip süresi içerisinde uzak metastaz gelişebilmektedir. Bu tümörlerin tanımlanmasında kullanılabilecek bir belirteç henüz belirlenmemiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda LncRNA' ların bir çok kanserde tanısal belirteçler olarak kullanılabilecekleri ve prognozu öngörmede kullanılabilirlikleri vurgulanmaktadır. Erken evre kolon tümörlerinde ise bu moleküllerin anlamlılıkları ve prognoz açısından önemleri henüz bilinmemektedir. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında, erken evre olarak tanımlanan ancak takip sürecinde uzak metastaz geliştirip ileri evre tümör ile tedavisi başarısızlıkla sonuçlanan hastalarda LncRNA' ların prognoz açısından önemleri araştırıldı. Ayrıca bu moleküllerin tümör patolojisi, tümör biyolojisi ve metastazla ilişkili mekanizmalar üzerine olası etkileri incelendi. Böylece erken evre kolon kanseri hastalarda, ileriki yıllarda oluşabilecek nüksün öngörülmesinde kullanılabilecek belirteçlerin tanımlanması için bu tümörlerde klinik, patolojik, genetik ve epigenetik değişimler incelendi ve birbirleri üzerine olası etkileri değerlendirildi.

3.2.1.1. Hasta Seçimi

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi veritabanı Avicenna[2005] kullanılarak hasta seçim ve ret kriterlerine uygun olarak değerlendirmeye alınacak hastalar belirlendi. Araştırma Uludağ Üniversitesi Araştırma ve Yayın Etik Kuruluna sunularak çalışmanın etik kurul onayı alındı (Etik Kurul No: 2014-12/16).

Hasta Seçim Kriterleri;

- Histopatolojik olarak kolon adenokarsinoma tanısı almış olması
- T1N0M0, T2N0M0 veya T3N0M0 tümör evrelemesine sahip olması,
- Lenf nodu diseksiyon sayısının 12' den fazla olması,
- Tümörün lenfatik, vasküler ya da perinöral invazyonu olmaması,

Hasta Ret Kriterleri;

- Lynch veya FAP sendromlu olması,
- Metastatik tümör olması,
- Lenf nodu metastazına sahip olması,
- Histopatolojik tanısının taşlı yüzük hücreleri yada müsinöz komponent olması,
- Neadjuvant kemoterapi yada radyoterapi almış olması,
- Tümör lokalizasyonunun üst rektum yada rektum olması
- Kansere bağlı nedenler dışındaki (Trafik kazası vs) olaylardan dolayı ölmüş olması
- Yeterli takip süresine sahip olmaması olarak belirlenmiştir.

Erken evre kolon kanser tanısı alıp sistemik nüks gözlenmeyen hastalar için takip süresi yedi yıl, sistemik nüks gözlenen hastalarda ise takip süresi en az bir yıl olarak belirlendi.

3.2.1.2. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi ve Materyallerin Temini

Seçim ve ret kriterlerine göre belirlenen hastalardan takip süresi içerisinde sistemik nüks gözlenenler kötü prognoza sahip hasta grubu, takip süresi içerisinde nüks gözlenmeyenler ise iyi prognoza sahip hasta grubu olarak belirlendi. Tüm hastaların normal dokuları negatif kontrol, ileri evre kolon adenokarsinomları ise pozitif kontrol olarak belirlendi.

Pozitif kontrol için seçim kriterleri;

- Histopatolojik tanısının kolon adenokarsinoma olması,
- İleri evre kolon tümörüne (T3N1Mx, T3N2Mx, T4N1Mx veya T4N2Mx tümör evrelemesine sahip olması) sahip olması,
- Tümörün lenfatik, perinöral ve/veya vazküler invazyona sahip olması.

Belirlenen çalışma gruplarını oluşturan tüm hastaların tümör ve normal doku materyalleri Uludağ Üniversitesi Patoloji Ana Bilim Dalı arşivinden parafilme gömülü olarak temin edildi. Patologlar tarafından dokular tekrar histopatolojik olarak incelenmeye alındı ve tümör alanları işaretlenerek Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalına teslim edildi.

3.2.1.3. Çalışma Gruplarının Klinik ve Patolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışma gruplarında yer alan hastaların semptomları, tanı yaşı, cinsiyet gibi demografik verileri ile ameliyat sonrası çıkartılan rezeksiyon materyallerinin patolojik tanısı ve özellikleri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi veritabanı Avicenna[2005,] da yer alan Genel Cerrahi Ana Bilim Dalına ait poliklinik izlem, epikriz, ameliyat notları ve Patoloji Ana Bilim Dalına ait Patoloji raporları taranarak elde edildi.

Çalışma gruplarında yer alan hastaların yaşam süreleri Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığına ait "Ölüm Bildirim" sisteminden yararlanılarak belirlendi (https://obs.saglik.gov.tr).

3.2.1.3.1. Erken Evre Kolon Tümörlerinde Tümör Tomurcuklanmasının Belirlenmesi

TB, Morodomi ve arkadaşları tarafından önerilen kriterlere göre belirlendi ve tomurcuklanma büyük tümöral gland yapısından kaynaklanan izole andiferansiye tümör hücreleri ya da mikrotübüler yapı oluşturan beş ya da altı tümör hücre kümeleri olarak tanımlandı.

3.2.1.4. Erken Evre Kolon Tümörlerinde MSI Analizi

MSI durumu günümüzde Lynch sendromu ile ilişkilendirilmekle birlikte güncel MSI çalışmalarında, 5FU-tabanlı kemoterapi verilen ileri evre kolorektal tümörlerinde ilaç direncini öngörme ile ilişkili olarak değerlendirilmektedir. Sporadik gelişen erken evre kolon tümörlerinde nüks üzerine etkisi net bilinmemektedir. Mevcut tez çalışmasında DNA Fragment analizi ile MSI durumunu belirlemek erken evre kolon tümörlerinde MSI durumu belirlenerek LncRNA'lar ile ilişkisi ve bu mekanizmanın prognoza olan etkisi araştırıldı.

3.2.1.4.1. DNA İzolasyonu

Tümör ve normal olarak işaretlenen parafilme gömdürülmüş doku örneklerinden işaretli alanlar 15 numara bistüri ucu ile kesildi ve üzeri etiketli 1.5 ml ependorf içerisine aktarıldı.

3.2.1.4.1.1. Dokuların Parafinden Uzaklaştırılması

Kesilen dokuların her birinin üzerine 1ml Ksilen (Sigma Aldrich, ABD) eklendi ve 15 sn vorteks yapılarak 18.000 g' de 3 dk santrifüj edildi. Dokunun üzerinde kalan sıvı atılarak doku üzerine 1 ml etannol %99 HPLC Grage (Sigma Aldrich, ABD) ilave edildi ve 18.000 g' de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dokunun üzerinde kalan sıvı faz atılarak etanol işlemi iki kez daha tekrarlandı. Son olarak dokunun üzerindeki sıvı etanol fazı tüpten uzaklaştırıldı ve tüpün kapağı açık bırakılarak 37^0C sıcaklığa ayarlanan etüv (Ecocell, Almanya) içerisinde 15 dk inkübe edilerek tüm Ethanolün uzaklaştırılması sağlandı.

3.2.1.4.1.2. Dokuların Parçalanması ve DNA' nın Elde Edilmesi

High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, İsviçre) kullanılarak genomik DNA elde edildi. Parafilmden uzaklaştırılan dokuların üzerlerine 200 µl Binding Buffer ve 20 µ Proteinaz K ilave edilerek 15 sn vorteks yapıldı ve karışım önce 70^0C' de 10 dk çalkalama özelliği olan ısıtıcı blok üzerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası örneklerin üzerine 100 µl izopropanol ilave edildi ve 15 sn vorteks yapıldı. Ependorf içerisindeki sıvı kısım filtreli tüplere aktarılarak 8.000g' de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atılarak filtre üzerine 500 µl Inhibitory Removel Buffer eklendi. Örnekler 8.000g' de 1 dk santrifüj edildi. Toplama kabındaki sıvı atılarak filtre üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi ve 8.000g' de 1 dk santrifüj edildi. Wash Buffer işlemi bir kez daha tekrar edildi. Toplama tüpündeki sıvı atılarak filtre boş olarak 8.000g' de 1 dk santrifüj edildi. Filtreler ependorf tüplere aktarıldı ve üzerlerine 50 µl DNAase free dH_2O eklenerek tüpler 8.000g' de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda filtreler uzaklaştırılarak DNA kalitesi ve miktarı UV-Vİs Spektrofotometre/Nano Drop

(Beckman Coulter, ABD) cihazında 280/260 nm dalga boyunda optik dansite ve konsantrasyonlarına ölçüldü.

3.2.1.4.2. Kapiller Elektroforez Yöntemi ile DNA Fragment Analizi

MSI analizi floresan işaretlemeye dayanan bir yöntemdir. Bu analiz, Bethesda kriterlerine uygun olarak seçilen, 5' ucu floresan işaretli D2S123, D5S346, D17S250, BAT25 ve BAT26 primerleri ile kapiller elektroforez sisteminde (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, ABD) fragment analizi yöntemi ile gerçekleştirildi.

3.2.1.4.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Kalitesi ve miktarı belirlenen DNA' ların her birinden 100 ng olacak şekilde ara stok hazırlandı. Multi HS Prime Premix (GeNET Bio, Kore) kit içeriğinde yer alan Multi HS Prime Taq Premix (2X)' ten 10 µl, dH_2O' dan 4.5 µl, her bir primer çiftinden 1µM olacak şekilde toplamda 25 µl olacak şekilde PCR karışımı oluşturularak primerlerin bağlanma ısısına göre uygun programlarda PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi (Tablo 4,5,6,7).

Tablo 4. D2S123 ve D17S250 için PCR programı

95 ℃	5 dk	
95 ℃	45 sn	
55 ℃	45 sn	30 siklus
72 ℃	45 sn	
72 ℃	10 dk	

Tablo 5. BAT 26 için PCR programı

95 ℃	5 dk	
95 ℃	45 sn	
55 ℃	1 dk	27 siklus
72 ℃	30 sn	
72 ℃	10 dk	

Tablo 6. BAT 25 için PCR programı

95 ℃	5 dk	
95 ℃	1 dk	
56 ℃	45 sn	25 siklus
72 ℃	30 sn	

Tablo 7. BAT 25 için PCR programı

95 ℃	5 dk	
95 ℃	1 dk	
57 ℃	45 sn	25 siklus
72 ℃	45 sn	
72 ℃	10 dk	

3.2.1.4.2.2. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

PCR ürünleri, %6' lık olarak hazırlanan agaroz jelde görüntülendi. Doğal bir kolloid olan agaroz, galaktoz ve 3,6- anhidrogalaktoz ünitelerinin ardışık olarak yer aldığı agarobioz ünitelerinin tekrarlanmasından oluşan bir polisakkarittir. Agaroz jel, 200 ml 1XTBE (54 gr Tris, 27,5 gr EDTA ve 7,44 gr Na_2EDTA) karışımının içerisinde 6 gr agaroz jel çözdürülerek hazırlandı. Nükleik asitlerin UV ışık altında görüntülenebilmesi için hazırlanan jele 6 µl Etidiyum Bromür ilave edildi. Jel kullanıma hazır hale geldikten sonra tarak yardımıyla oluşturulan kuyulara örnekler ve 50 bp' lik belirteç yüklenerek yatay elektroforezde 300 mA' de 45 dk yürütme yapıldı. Elektroforezde yürütme bittikten sonra UV spektrofotometrede (Vilbar, Fransa) görüntüleme yapıldı.

3.2.1.4.3. MSI Analizi ve Değerlendirilmesi

Aynı hastaya ait hem tümör hem de normal doku örneklerinden elde edilen PCR ürünleri ile 96-kuyulu plakalara MSI analiz karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı, 22 adet (60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550 ve 600 baz) DNA fragmenti içeren 600' lük Size Standart' tan 40 µl PCR ürünlerinden ise 1.5 µl ilave edilerek oluşturuldu ve Otomatik DNA Dizileme (Beckman coulter, ABD) cihazına yükleme yapıldı (Tablo 8).

Tablo 8. MSI programı

50 ℃	2 dk	
95 ℃	10 dk	
95 ℃	25 sn	
		40 döngü
60 ℃	60 dk	

Tümör dokuda MSI analizi hastanın normal dokusuna ait MSI profili ile karşılaştırılarak yapılmaktadır. Bir belirtecin normal dokudaki fragmentlere göre farklı yükseltiye sahip olması yada farklı DNA fragmentlerinde yer alması o belirtecin pozitif olduğu anlamına gelmektedir. Tek bir belirteç pozitif ise o tümör MSI-L, iki yada daha fazla belirteç pozitif ise MS-H, herhangi bir belirteçte pozitiflik yok ise MSS olarak değerlendirilmektedir.

3.2.1.5. Erken Evre Kolon Tümörlerinde EMT Mekanizmasının Aktivitesinin Belirlenmesi

EMT mekanizmasının KK tümörlerinde karaciğer metastazı oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle takip süresi içerisinde nüks oluşturan erken evre KK tümörlerinde EMT durumunun belirlenebilmesi için, bu süreçte görev alan 8 farklı EMT belirtecinin ekspresyon durumlarını incelendi (Tablo 9). EMT sürecinin varlığı, E-kaderin kaybı (1), Vimentin ve/vay MMP-9 artışı (2) ve transkripsiyon faktörlerindeki artış (3) şeklinde üç madde ile kontrol edildi. Bu maddelerden birinin oloma durumunda EMT aktivitesi kabul edildi.

Tablo 9. EMT Belirteçleri

Gen	Primer Numarası*
E-Kaderin	Hs01013959_m1
N-Kaderin	Hs00983056_m1
Snail	Hs00195591_m1
Slug	Hs00950344_m1
Zeb1	Hs01566408_m1
Twist	Hs01675818_s1
Vimentin	Hs00958111_m1
MMP-9	Hs00957562_m1

* https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression.html

3.2.1.5.1 RNA İzolasyonu

Pataloglar tarafından tümör ve normal olarak işaretlenen parafine gömdürülmüş doku örneklerinden işaretli alanlar 15 numara bistüri ucu ile kesilerek üzeri etiketli 1.5 ml ependorf tüp içerisine aktarılarak 3.2.1.4.1.' de ifade edildiği şekilde parafinden uzaklaştırıldı.

3.2.1.5.1. Dokuların Parçalanması ve RNA' nın Elde Edilmesi

RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hollanda) kullanılarak total RNA elde edildi. Parafilmden uzaklaştırılan dokuların üzerlerine 240 µl Buffer PKD ve 10 µl Proteinaz K ilave edilerek 15 sn vorteks yapıldı ve karışım önce 56^0C' de 15 dk sonrasında 80^0C' de 15 dk olacak şekilde çalkalama özelliği olan ısıtıcı blok üzerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası örnekler buz üzerinde 3 dk bekletildi ve sonrasında 20.000g' de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sırasında pellete dokunulmadan üst kısımda kalan süspansiyon yeni ve etiketli 1.5 ml ependorflara aktarıldı ve üzerine 25 µl DNase mix eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ependorf tüpe 250 µl Buffer RBC eklendi ve lizat pipetaj yapılarak karıştırıldı. Karışımın üzerine 600 µl (%96-100) ethenol ilave edilerek karışımdan 700 µl filtreli tüpe aktarıldı. Filtreli tüp 8.000 g' de 15 sn santrifüje alındı. Santrifüj sonrası altta kalan sıvı atılarak filtre üzerine ependorfta kalan karışım ilave edildi ve santrifüj işlemi tekrarlandı. Santrifüj sonrası filtre üzerine Buffer RPE' den 500 µl eklendi ve 8.000 g' de 15 sn santrifüj yapıldı. Daha sonra altta kalan kısım atılarak Buffer RPE işlemi tekrarlandı. Filtreli tüp kapağı açık olacak şekilde maksimum hızda 5 dk santrifüj edildi. Filtreler, her bir örnek için tanımlanan 1.5 ml ependorflara aktarıldı ve üzerlerine 30 µl dH2O eklenerek maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra elde edilen RNA' ların kalitesi ve miktarları UV-Vİs Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) cihazında 280/260 nm dalga boyundaki optik dansiteleri ve konsantrasyonları belirlendi. Daha sonra RNA' lar -80^oC' ye kaldırıldı.

3.2.1.5.2. cDNA Sentezi

Uygun kaliteye sahip RNA' ların her birinden 500 ng olacak şekilde 20 µl' lik ara stoklar hazırlandı. ProtoScript First Starnd cDNA Synthesis Kit (Biolabs, ABD) kullanılarak uygun rekasiyon içeriğine ve programda cDNA sentezi gerçekleştirildi (Tablo 10).

Tablo 10. ProtoScript cDNA Synthesis Kit reaksiyonunu ve PCR programı

Total RNA (500 ng)	2 µL
Nuklease Free Wter	4 µL
70 ℃ 5 dk	
M-MuLV Reaction Mix	10 µL
M-MuLV Enzyme Mix	2 µL
25 ℃ 5 dk	
42 ℃ 1 s	
80 ℃ 5 dk	

3.2.2.5.3. RT-PCR Aşaması

Takip süresi içerisinde nüks gelişimi belirlenen ve belirlenmeyen erken evre kolon tümörleri ve normal doku olarak kabul edilen cerrahi sınırlara ait dokulardan elde edilen cDNA' lar kullanılarak EMT mekanizmasında yer alan ve Tablo 9' da belirtilen 8 belirtecin mRNA düzeyinde aktivitelerinin incelenmek için Taqman Master Mix kullanılarak RT-PCR analizi gerçekleştirildi. Kontrol gen olarak GAPDH (Hs02786624_g1) kullanıldı. RT-PCR analizi için gerekli primerler, reaksiyon ve program Tablo 9, Tablo 10 ve Tablo 11' de belirtildi. RT-PCR analizi Step one Plus^{TM} Real-Time PCR (Applied Biosystem, ABD) cihazında analiz edildi. PCR sonuçları, cihazda kurulu olan Applied Biosystems StepOneTM Real-Time PCR Software aracılığı ile CT değerleri şeklinde elde edildi. Veriler daha sonra " RT2 Profiller PCR Array Data Analysis version 3.5" (https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/) kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 11. RT-PCR reaksiyon karışımının hazırlanması

20X Taqman Gene Expression Assay	0.5 µL
2X Taqman Gene Expression Assay Master Mix	5 µL
cDNA (1-100 ng)	2 µL
Rnase-free water	2.5 µL
Toplam	10 µL

Tablo 12. RT-PCR reaksiyon koşulları

50 ℃	2 dk	
95 ℃	10 dk	
95 ℃	15 sn	40 döngü
60 ℃	60 dk	

3.2.1.6. Tedavi Sonrası Sistemik Nüks Gelişen Erken Evre Kolon Tümörlerinde LncRNA Ekspresyon Profillerinin Analiz Edilmesi

200 bazdan büyük RNA molekülleri olan LncRNA' ların kanser gelişiminde etkili rol oynadıkları bilinmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda bu RNA moleküllerinin kanser tanı ve tedavisinde öncü birer biyobelirteç olabilecekleri vurgulanmaktadır. Başta kolorektal kanser olmak üzere birçok solid tümörün gelişiminde görev alan LncRNA' lardan özellikle migrasyon, invazyon, metastaz ve ilaç dirençliliği ile ilişkili olan 14 adet LncRNA seçildi (Tablo 13).

Tablo 13. Değerlendirilen LncRNA' ların primer numaraları

LncRNA Adı	Primer Numarası*
MALAT1	Hs03298492_g1
CCAT1	Hs04402620_m1
HOTAIR	Hs05502358_s1
PTENP1	Hs04272891_s1
CRNDE	Hs01550119_m1
ANRIL	Hs03300540_m1
SNHG16	Hs01598403_g1
TUSC7	Hs01396682_m1
HULC	Hs01909631_s1
PCAT1	Hs04275836_s1
DANCR	Hs01399010_g1
MEG3	Hs00292028_m1
NEAT1	Hs03453535_s1
BANCR	Hs01370698_m1
H19	Hs00399294_g1

* https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression.html

Daha önce elde edilen cDNA' lardan 3.2.2.5.3.' de ifade edildiği şekilde Tablo 13' te belirtilen primerler ile 15 farklı LncRNA' nın ekspresyon profili erken evre kolon tümörlerinde incelendi.

3.2.2. Hastalarda Değerlendirilen Biyobelirteçlerin İn-vitro Analizler ile İncelenmesi

Tez çalışmasının hasta-tabanlı kısmında gerçekleştirilen değerlendirmeler ile erken evre kolon tümörlerinin 5 yıllık takip süresi içerisinde tekrarlamasına neden olabileceği belirlenen LncRNA' lardan CCAT1, PTENP1, MALAT1 ve HOTAIR' in KK'lara adjuvant kemoterapide temel ilaç olarak kullanılmakta olan 5FU' ya karşı direncin oluşumunda olası katkılarını değerlendirmek için, in-vitro ortamda oluşturulan ilaç direnç modelinde bu biyobelirteç adaylarının anlamlılıkları araştırıldı. Bununla birlikte 5FU direnci oluşum sürecinde tümör hücrelerinde aktif olan mekanizmalar iel hücrelerin bu süreçlerde sergiledikleri biyolojik davranışlar incelendi.

3.2.2.1. Hücre Hattının Seçimi ve Temini

Hücre Hattı Seçim Kriterleri;

- ✓ İnsan kolon adenokarsinoma kökenli olması,
- ✓ 40-60 yaş arası bireyden elde edilmiş olması,
- ✓ Hücre tipinin Epitelyal olması,
- ✓ Erken evre kolon tümörlerine yakın invazyon özelliğine sahip olması.

Seçim kriterlerine uygun olarak belirlenen HT-29 (HTB-38) ve insan normal hücre hattı Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), American Type Culture Collection (ATCC, ABD)' den uygun koşullarda temin edilerek -150' ye kaldırıldı.

3.2.2.2. Hücrelerin Açılması ve Üretilmesi

Hücreler temin edildikten sonra, Sodyum bikarbonat ve 1000 mg/L glikoz içeren DMEM besiyerine, %10 fetal bovine serum, 10.000 u/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin, 2 uM L-Glutamin ve 1 uM Sodium pyruvate ilave edilerek hücrelerin üretileceği uygun DMEM besiyeri hazırlandı. Hücreler -150' den alındıktan sonra, 37^0C' e su banyosunda çözdürüldü ve 25 cm^2 boyutunda filtreli hücre kültür flaskına aktarılarak uygun besiyerinde 37^0C sıcaklıkta, %5 CO_2 ve nem içeren inkübatörde üretildi.

3.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

HT-29 hücreleri, yer aldığı 25 cm^2 boyutunda filtreli hücre kültür flaskında 48 saat sonra, HUVEC hücreleri ise aynı koşullarda 72 saat sonra yaklaşık %80-90 oranında yoğunluğa ulaştı. Hücreler bu yoğunluğa ulaştıktan sonra besiyeri 5 ml' lik pipet ucu ile uzaklaştırıldı ve flask içersine 2 ml (25 cm^2 için 2 ml, 75 cm^2 için 10 ml, 175 cm^2 için 20 ml) steril fosfat tampon solüsyon (PBS) konularak hücreler hafifçe yıkandı. Hücreler tutundukları flask yüzeyinden kaldırmak için, PBS ile yıkama işleminden sonra flaks içerisine 2 ml (25 cm2 için 2 ml, 75 cm^2 için 8 ml, 175 cm2 için 15 ml) %0.25 tripsin ve 1mM EDTA'dan oluşan 1X Tripsin EDTA ilave edilerek, 37^0C sıcaklıkta, %5 CO_2 ve nem içeren inkübatörde HT-29 5 dakika, HUVEC ise 3 dakika bekletildi. Flask yüzeyinden ayrılan hücrelerin

membranlarının tripsinden dolayı bozulmasını engelemek için, flask içerisine, tripsinin 2 katı kadar besiyeri ilave edildi ve süspansiyonlar 15 ml' lik steril falkonlara alındı. Daha sonra falkon tüpler 1200 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında falkonda pelletin üzerinde bulunan süpernatan kısmı dökülerek pellet üzerine 1 ml taze besiyeri eklendi. Pellet taze besiyeri ile süspanse edildikten sonra hücreler sayılarak hücre miktarına göre flasklara bölündü. Pasajlanan hücreler 37^0C sıcaklıkta, %5 CO_2 ve nem içeren inkübatörde kültüre edildi.

3.2.2.4. Hücre Sayımı

Falkon tüp içerisinde 1 ml taze besiyeri ile süspanse edilen hücre pelletinden 10 ul çekilerek steril ependorf içersine konuldu ve üzerine 90 ul tripan blue boyası eklenerek karıştırıldı. Toplamda 100 ul olan karışım thoma lamı üzerine aktarıldı ve üzerine lam kapatılarak ışık mikroskobunda 40X' lik objektifte incelendi. Hücre sayımı için thoma lamının 16 büyük karesi içerisinde yer alan 25 küçük karenin üst ve sağ taraftaki çizgileri kesen hücreler sayıldı. Bu işlem üç kez tekrar edildi ve sayıların ortalaması alınarak, 16 büyük karedeki toplam hücre sayısı, 10^4 ve dilüsyon faktörü ile çarpılarak hücre sayısı hesaplandı.

3.2.2.5 Hücrelerin Dondurulması ve Stoklanması

Hücrelerin stoklanmasında steril kriyo tüpler (vial) kullanıldı. Bu işlem için stoklanacak hücreler öncelikle flaska uygun miktarda ilave edilen 1X Tripsin EDTA ile hücre pasajlanmasında anlatıldığı şekilde kaldırıldıktan sonra her bir hücre thoma lamında sayıldı. Hücrelerin stoklanacağı kriyo tüpler etiketlendi ve her birine, içerisinde yaklaşık 10.000.000 hücre bulunan 900 ul besiyeri ilave edildi ve üzerine 100 ul DMSO eklenerek hücreler 2-4 saat süreliğine -20' ye sonrasında ise -150'ye stoklanma işlemi tamamlandı.

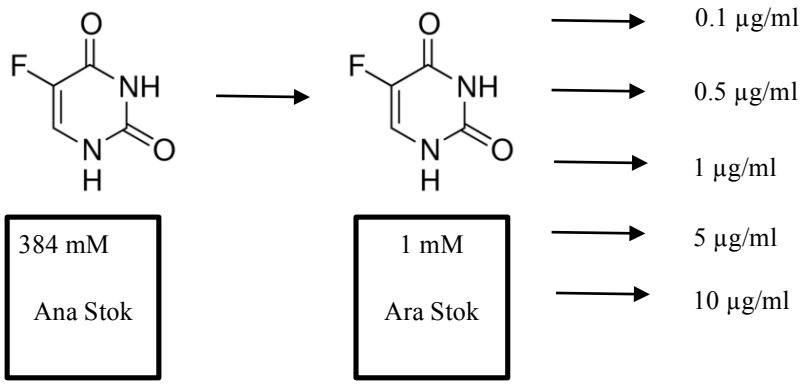
3.2.2.6. 5FU' nun Temini ve Hazırlanması

Kolon adenokarsinomlarının tedavisinde standart olarak kullanılan temel ilaç 5FU Sigma Aldirich firmasından >%99 HPLC saflıkta toz halinde temin edildi. İlacın prospektüsüne uygun olarak, 5FU, Laminer Kabin içerisinde yer alan hassas terazide 1 gram tartılarak, 20 ml streril DMSO' da vorteks yardımı ile 50 ml'lik falkon tüp içerisinde çözüldü. Çözelti 0.22 μm' lik filtreden geçirilerek sterilize

edildi ve sonrasında 1.5 ml'lik ependorflara her birinde 1000 ul olacak şekilde stoklandı. Deney sırasında kullanılacak olan 5FU çözeltisi oda ısısında kullanılırken, diğerleri ise $+4^0$C' e karanlıkta olacak şekilde saklandı.

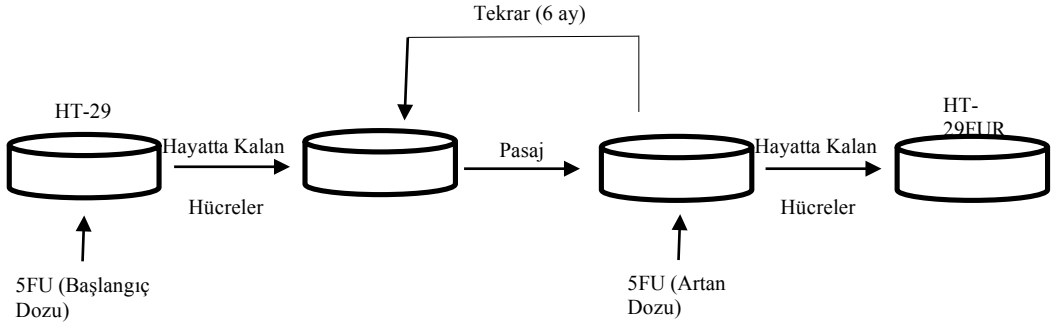
3.2.2.7. HT-29 Hücrelerinde 5FU Direncinin Geliştirilmesi

HT-29 hücre hatlarına altı ay boyunca düzenli olarak 5FU uygulanarak, 5FU' ya dirençli HT-29FUR hücreleri elde edildi. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, HT-29 başta olmak üzere SW480, HCT116, Lovo gibi bir çok kolon kanser hücre hatlarında birkaç model kullanılarak 5FU direnci oluşturulmuştur (Lesuffle ve ark., 1991; Liu ve ark., 2014; Toden ve ark., 2015; Denise ve ark., 2015; Paschall ve ark., 2016; Li ve ark., 2017; Untereiner ve ark., 2018). Literatürde 5FU' nun HT-29 hücreleri üzerindeki etkinliği 48-72 saatleri arasında olduğu belirtilmiş, hücrelerin %50' den fazlasını öldüren dozun ise 15 µM olduğu vurgulanmıştır. 5FU' nun 2. Pasaj HT-29 hücrelerinde etkili olduğu dozları belirlemek için literatürdeki çalışmalar temel alınarak 0.1 µM ve 100 µM arasında farklı 5FU dozları, HT-29 hücreleri ile muamele edilerek hücre proliferasyon testi WST-1 ile analizler gerçekleştirildi. Proliferasyon analizi ile literatürdeki çalışmaların birlikte değerlendirilmesi sonucunda HT-29 hücrelerine verilecek 5 farklı 5FU dozu (0.1 µM, 0.5 µM, 1 µM, 5µM, 10 µM) belirlendi. Bu dozların elde edilmesi için öncelikle prospektüsün önerdiği şekilde 20 ml DMSO içerisinde 1 gr toz 5FU oda ısısında vorteks yardımı ile çözdürülerek 384 mM ana stok elde edildi. Ana stok çok derişik olduğu için 1 mM' lık bir ara stok yapıldı ve ara stoktan 0.1 µM, 0.5 µM, 1 uM, 5µM, 10 µM dozları çekildi (Şekil 25).



Şekil 25. 20 ml DMSO içerisinde 1 gr 5FU' nun çözdürülmesi ile elde edilen 384 mM ana stoktan hücrelere verilecek dozların hazırlanması

Hücrelere 5FU direnci kazandırmak için ilk olarak hücrelere başlangıç dozu olarak belirlenen 0.1 µg/ml 5FU içeren besiyeri verildi. Yetmiş iki saat sonra dozlu besiyeri uzaklaştırılarak, hücrelerin iyileşebilmelerine izin vermek için, hücreler belirli süre besiyeri ile inkübe edildi. Bu işlem hücreler doz verildikten 72 saat sonra %80' lik yoğunluğu kazanana kadar (yaklaşık 4 hafta) devam ettirildi. Hücreler başlangıç dozunda yaşamaya devam ettiği bu süre zarfından sonra Toden ve ark.,2015; Paschall ve ark., 2016; Li ve ark., 2017 çalışmalarında da belirtildiği şekilde düzenli aralıklar ile besiyerinde inkübe edilerek 0.5 µg/ml 5FU, sonrasında 1 µg/ml 5FU, 5 µg/ml 5FU ve 10 µg/ml 5FU şeklinde artan doz muamelesi ile yaklaşık 6 ay sonunda HT-29FUR hücreleri elde edildi (Şekil 26).



Şekil 26. HT-29FUR hücrelerinin oluşum süreci (Toden ve ark.,2015).

Oluşturulan HT-29FUR hücrelerinin, tekrar 5FU ile muamele edilmesi durumunda hücrelerin ilaçtan etkilenmemeleri beklendi. Hücrelerde oluşturulan bu direncin

belirlenmesi için düzenli aralıklar ile 5FU direnci ile ilişkilendirilen biyolojik süreçlerin takibi yapıldı.

5FU dirençli hücrelerin biyolojik davranışları;

- Hücre proliferasyonunda artma,
- Apoptozdan kaçma,
- ABC taşıyıcı proteinlerinde ekspresyon değişimleri,
- TS ve DPD aktivasyonu olarak literatür taranarak belirlendi.

Her bir dozun sonunda hücrelerin WST-1 kiti ile proliferasyonları, Annexin V & Dead Cell Kiti ile apoptoza gitme oranları analiz edildi. Ayrıca her dozun sonunda ayrı olarak inverted mikroskop ile hücrelerin morfolojileri, RNA izolasyonu yapılarak direnç mekanizmasında etkili moleküler mekanizmalar incelendi.

3.2.2.8. HT-29FUR Hücrelerinde 5FU Direncinin Kanıtlanması ve Kontrol Edilmesi

Direnç kazanan hücrelerin 5FU muamelesinden etkilenmemesi beklenmektedir.HT-29FUR olarak adlandırılan dirençli hücrelere 0 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM muamelesi yapıldıktan 72 saat sonra (ilacın etkili olduğu süre) muamele sonrası 5FU direncine neden olduğu bilinen biyolojik süreçlerin takibi gerçekleştirildi.

5FU dirençli hücrelerin biyolojik davranışları;

- Hücre proliferasyonunda artma
- Apoptozdan kaçma
- ABC taşıyıcı proteinlerinde ekspresyon değişimleri
- HT-29 hücrelerine göre daha agresif biyolojik davranışlar (artmış invazyon ve migrasyon) sergilemeleri beklenmektedir.

3.2.2.8.1. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

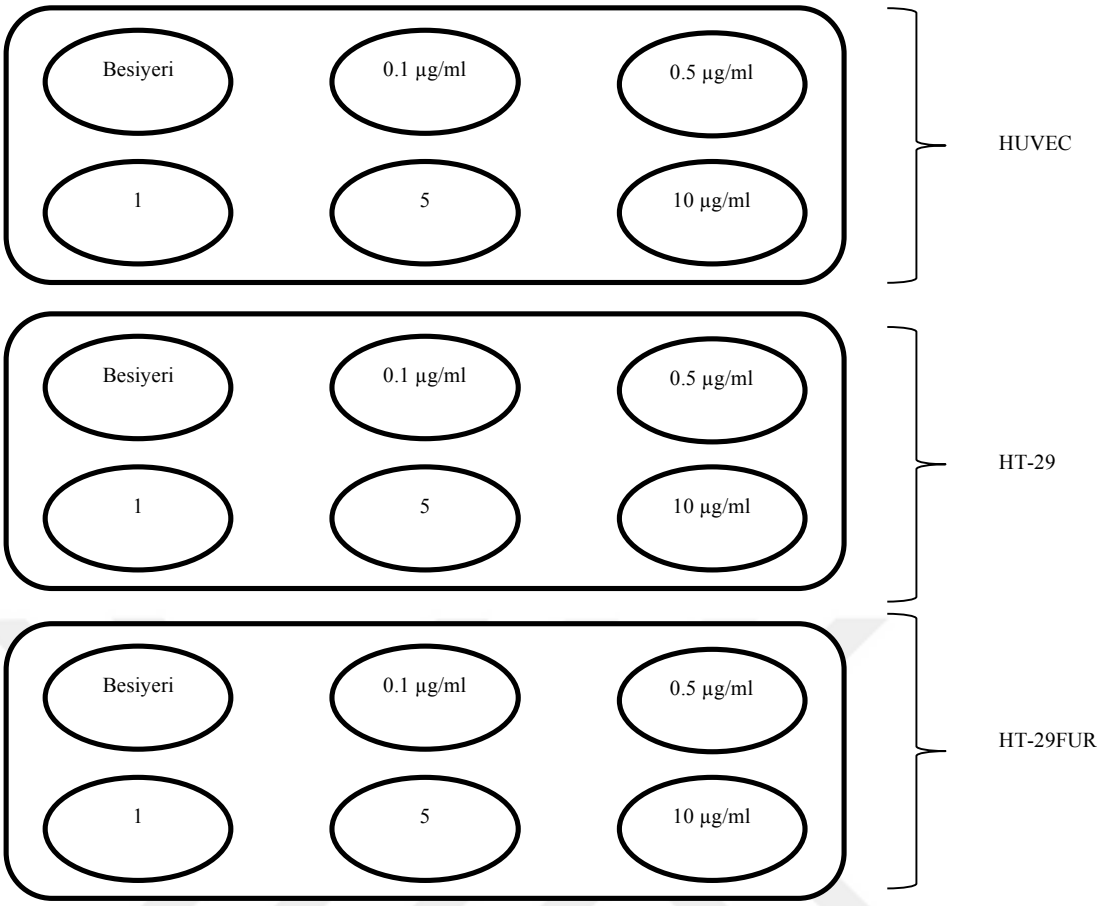
Bu analiz için, hücrelerde mitakondrial dehidrogenaz aracılığıyla tetrazolium tuzlarının, formazan tuzlarına ayrışmasına dayanan WST-1 kiti kullanıldı. WST-1, kolorimetrik bir test olup, canlı hücrelerin verdiği absorbans değeri ile hücre canlılığını analiz etmektedir.

İn-vitro analizlerde WST-1 testi başlangıçta HT-29 hücrelerinde 5FU' nun etkili olduğu dozun ve saatin belirlenmesi ve direnç oluşum süreci sırasında her doz artışından önce hücre canlılığının tespit edilmesi amacı ile kullanıldı. Bu analizin gerçekleştirilmesinde ki bir diğer amaç, 5FU muamelesi sonrası hayatta kalan hücrelerdeki proliferasyonu ve ilaç direnç kat sayısını belirlemek ve dirençli hücrelerin 5FU muamelesinden etkilenmediğini göstermektir.

WST-1 analizi için, plate düzeni oluşturuldu ve 3 adet 96 well-plate bu düzene göre kullanılacak her bir kuyusuna toplam hacim 100 ul olacak şekilde $2x10^4$ hücre ekildi. Hücreler 37^0C sıcaklıkta, %5 CO_2 ortamda 24 saat inkübe edildi ve sonrasında Şekil 25' te de belirtildiği şekilde, pozitif ve negatif kontrol dışındaki kuyulara 5FU dozları verildi. Doz verilen hücrelerden birinci plate 24 saat, ikinci 48 saat ve üçüncü plate 72 saat boyunca 37^0C sıcaklıkta, %5 CO_2 ortamında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir plate 460-650 nm absorbans aralığında TriStar² LB 942 Multimode-reader spektrofotometrede analizi yapıldı. Sonuçlar, doz ile muamele edilmeyen hücrelerdeki canlılık oranına göre yorumlandı.

3.2.2.8.2. Apoptoz Analizi

5FU, normal süreçte RNA'nın ve DNA'nın yapısına girerek hücreye ölüm yolaklarını uyarmaktadır. HT-29FUR hücreleri 5FU' ya karşı dirençli oldukları için direnç oluşumu süresinde hücrelerde apoptozun azaldığı bilinmektedir. Bu süreci gözlemlemek için HT-29FUR hücrelerinde 5FU muamelesi sonrası, apoptosiz durumunda hücre dış yüzeyine hareket eden fosfotidilserine karşı yüksek affiniteyi değerlendiren Muse Annexin V& Dead Cell Kit ile apoptoz varlığı incelendi. Hücreler 6 kuyudan oluşan plaklara her bir kuyuda $75x10^3$ hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat sonra daha önceki deneylerimizde belirlenen dozlarda 0.1 µM, 0.5 µM, 1 uM, 5µM, 10 µM hücrelere 5FU verilerek 37^0C sıcaklıkta, %5 CO_2 ortamda 72 saat inkübe edildi (Şekil 27).



Şekil 27. Apoptozun belirlenmesi için yapılan Annexin V& Dead Cell analizinde kullanılacak hücre gruplarının oluşturulması.

Bu sürenin sonunda hücreler PBS ile yıkanıp Annexin V Dead boyası ile muamele edilerek 72 saat sonunda Muse Cell Analyzer (Merc Millipore, Almanya) cihazında analiz edildi. Tüm deney süresi üç kez tekrar edildi. Hücrelerde meydana gelen apoptozun belirlenmesinde kullanılan bu yöntem ile, aynı zamanda erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları da belirlenebildi.

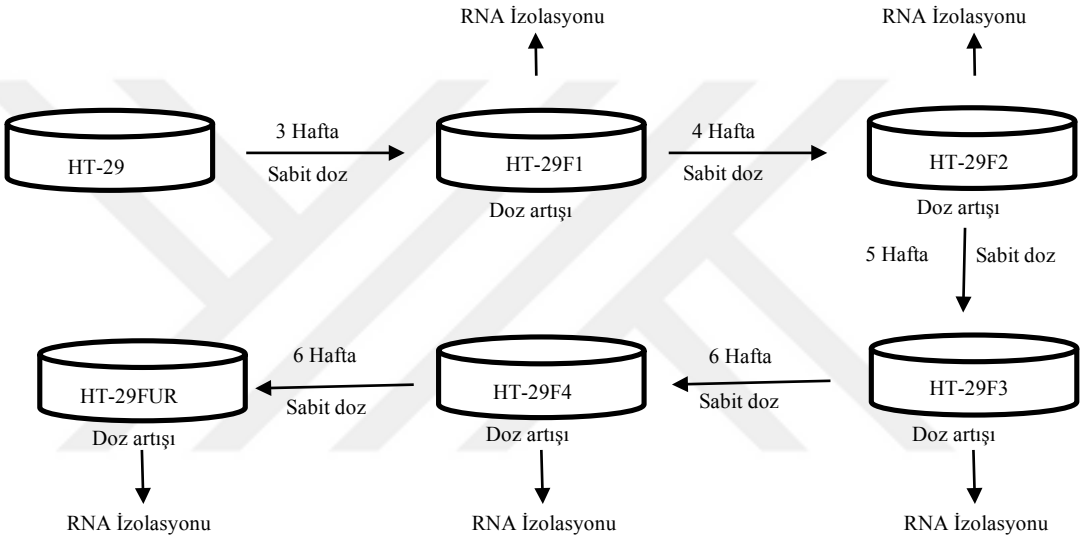
3.2.2.8.3. Kolon Hücrelerinde 5FU Direnci Oluşumuna Neden Olabilecek Hücresel Mekanizmalarda Görev Yapan Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin İncelenmesi

5FU' nun ve aktif metabolitlerinin bloke edilmesine neden olan yüksek DPD ve TS aktivasyonu, literatürde 5FU direncinin temel sebepleri olarak vurgulanmaktadır. Bununla birlikte sınırlı sayıdaki çalışmada, 5FU' nun hücre içerisine girdikten sonra etkisini gösteremeden "dışa atım (efflux)" mekanizması ile hücre dışına bırakılabileceği ifade edilmiştir. Çoklu ilaç direnç ailesinde yer alan

ATP-bağlayıcı kasket proteinlerinden ABCC5'in dışa atım proteini olarak 5FU direci ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Bu enzimlerin ve proteinlerin aktivasyonları onkogenik mutasyonlar, spesifik polimorfizmler yada transkrsiyon sonrası epigenetik düzenlemelerle meydana gelebilmektedir.

HT-29FUR' inde direnç gelişimi sırasında MDR proteinlerinin aktiviteleri Real-Time PCR cihazında mRNA düzeyinde incelendi. Bu analizler için ilk olarak her bir doz artışında RNA izolasyonu yapıldı (Şekil 28).



Şekil 28. RNA izolasyonlarının yapıldığı hücre grupları.

3.2.2.8.3.1. RNA İzolasyonu

Her dozun sonunda RNA izolasyonu gerçekleştirmek için, 6 adet 25 cm^2' lik flaska, her birinde $1x10^6$ hücre olacak şekilde hücreler ekildi ve 0 µM , 0.1 µM, 0.5 µM, 1 uM, 5µM, 10 µM 5FU içeren besiyeri verilerek, hücreler 37^0C sıcaklıkta, %5 CO_2 ortamda 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan alınan hücreler tripsin ile kaldırılarak 2 kez PBS ile yıkandı ve High Pure RNA Isolation Kit kullanılarak, kit protokolüne uygun şekilde hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

RNA izolasyonu için ilk olarak 200 µl PBS hücre süspansiyonu 1,5 ml' lik ependorf içerisine aktarıldı ve üzerine 200 µl Binding Buffer, 40 µl Proteinaz K ilave edilerek pipetaj yapıldı. Oluşturulan süspansiyon, ısıtıcı blokta 70 ^{0}C' de 10

dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası solüsyon oda ısısına gelince üzerine 100 µl izopropanol eklendi ve iyice karıştırıldı. Kit içerisinde yer alan High Filter Tüpleri toplama tüplerine yerleştirildi ve ependorf içerisindeki süspansiyon High Filter Tüplerin içeresine aktarıldı. High Filter Tüpler 8.000g' de 1 dakika santrifüje alındı. Santrifüjden sonra toplama tüpleri değiştirilerek High Filter Tüpler yeni toplama tüplerine aktarılarak üzerine 500 µl Inhibitor Removal Buffer ilave edildi ve santrifüj işlemi tekrarlandı. Daha sonra High Filter Tüpler yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve üzerlerine 500 µl Wash Buffer ilave edilerek 8.000 g' de 1 dakika santrifüj yapıldı. Santrfüjden sonra High Filter Tüplerin kapakları açılarak maksimum hızda 30 saniye santrifüj yapıldı. High Filter Tüpler yeni bir 1.5 ml' lik steril ve üzerine etiketlenmiş ependorf tüpe aktarıldı ve 200 µl RNAse/DNAse free su ilave edilerek 3 dakika oda ısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde tüpler 8.000 g' de 1 dakika santrifüş edildi ve total RNA izole edildi. Elde edilen RNA' nın kalitesi ve miktarı UV-Vİs Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) cihazında 280/260 nm dalga boyundaki optik dansitelerine ve konsantrasyonlarına bakılarak ölçüldü.

3.2.2.8.3.2. Complamenter DNA (cDNA) Sentezi

Çoklu İlaç Direnç Mekanizmasının, Dihydropyrimidine Dehydrogenase ve Thymidylate Synthase' ın ekspresyon seviyelerini incelemek için öncelikle total RNA' dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezinden önce konsantrasyonlarının eşit olması için tüm RNA' lardan 500 ng olacak şekilde yeni ara stoklar oluşturuldu ve cDNA sentezi 500 ng' lık ara stok RNA' lardan yapıldı. Bu işlem için High Capacity cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Kit' in reaksiyonu ve PCR' ı Tablo 14 ve Tablo 15'tee belirtildiği gibi yapıldı. Elde edilen cDNA' lar -20 ℃'ye kaldırıldı.

Tablo 14. High Capacity cDNA Synthesis reaksiyonunun hazırlanması

10X RT Buffer	2.0 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µL
10X RT Random Primers	2.0 µL
MultiScribeTM Reverse Transcriptase	1.0 µL
RNase Inhibitor	1.0 µL
Nuclease-free H2O	3.2 µL
Total	10.0 µL

Tablo 15. High Capacity cDNA Synthesis Kit rekasiyon koşulları

25 ℃	10 dk
37 ℃	120 dk
85 ℃	5 dk
4 ℃	∞

3.2.2.8.3.3. 5FU Direnci ile İlişkili Genlerin ekspresyon seviyelerinin RT-PCR ile incelenmesi

Elde edilen cDNA' lar kullanılarak çoklu ilaç direnç mekanizmasında yer alan 5 belirteç (ABCB1, ABCC5, ABCC7, ABCC9, ABCC11) 5FU' nun aktif metabolitlerinin oluşumunu engelleyen DPD ve TS' nin mRNA düzeyinde aktivitelerinin incelenmesi için Taqman Master Mix kullanılarak RT-PCR analizi gerçekleştirildi. Kontrol gen olarak GAPDH (Hs02786624_g1) kullanıldı. RT-PCR analizi için gerekli primerler, reaksiyon ve program Tablo 15, Tablo 16 ve Tablo 17' de belirtildi. RT-PCR analizi Step one Plus^{TM} Real-Time PCR (Applied Biosystem, ABD) cihazında analiz edildi. PCR sonuçları, cihazda kurulu olan

Applied Biosystems StepOneTM Real-Time PCR Software aracılığı ile CT değerleri şeklinde elde edildi. Veriler daha sonra " RT2 Profiller PCR Array Data Analysis version 3.5" (https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/) kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 15. MDR mekanizmasında incelenen genler, DPYD ve TS' nin özellikleri ve primer numaraları

Gen	Açık Adı	Primer Numarası*
ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member 1	Hs.489033
ABCC5	ATP binding cassette subfamily C member 5	Hs.368563
ABCC7	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	Hs.489786
ABCC9	ATP binding cassette subfamily C member 9	Hs.732701
ABCC11	ATP binding cassette subfamily C member 11	Hs.652267

* https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression.html

Tablo 16. RT-PCR reaksiyon karışımının hazırlanması

20X Taqman Gene Expression Assay	0.5 µL
2X Taqman Gene Expression Assay Master Mix	5 µL
cDNA (1-100 ng)	2 µL
Rnase-free water	2.5 µL
Toplam	10 µL

Tablo 17. RT-PCR reaksiyon koşulları

50 ℃	2 dk	
95 ℃	10 dk	
95 ℃	15 sn	
		40 döngü
60 ℃	60 dk	

3.2.2.9. 5FU' ya Karşı Direnç Gelişim Sürecinde Hücrelerinde LncRNA' ların Ekspresyon Değişimlerinin İncelenmesi

LncRNA' ların ekspresyon profilleri, HT-29 hücrelerinde 5FU direnci oluşum sürecinde her bir doz artışından önce **hücrelerden** elde edilen RNA örneklerinden RT-PCR analiz yöntemi kullanılarak incelendi.

3.2.2.9.1. cDNA Sentezi

Total RNA' dan cDNA sentezi yapmak için SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit kullanıldı. cDNA sentezinden önce konsantrasyonlarının eşit olması için tüm RNA' lardan 500 ng olacak şekilde yeni ara stoklar oluşturuldu ve cDNA sentezi 500 ng' lık ara stok RNA' lardan hasta materyallerinde de bahsedildiği şekilde yapıldı.

3.2.2.9.2. CCAT1, PTENP1, HOTAIR ve MALAT1' in Ekspresyon Profillerinin RT-PCR Analizi ile Belirlenmesi

CCAT1, PTENP1, HOTAIR ve MALAT1' in ekspresyon profilleri daha önce de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

3.2.2.10. 5FU' ya Karşı Direnç Gelişim Sürecinde EMT Yolağının Aktivitesinin İncelenmesi

Günümüzde Kolon kanserlerinde meydana gelen sistemik nüks ve ilaç dirençliliği kötü prognoz olarak tanımlanmaktadır ve bu iki mekanizma arasında bir sinerji olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle erken evre tümörlerde nüks potansiyeli belirlenip standart adjuvan tedavi seçeneği oluşturulsa bile hastaların ilaç direnci geliştirme olasılığı yüksek olduğu varsayılmaktadır. Bu iki süreçte EMT mekanizmasının rolünün belirlenmesi için HT-29FUR hücreleri oluşturulurken her bir doz artışından önce izole edilen RNA' lardan daha önce de belirtildiği şekilde EMT sinyal yolağının aktivitesi mRNA düzeyinde RT-PCR yöntemi ile analiz edildi.

3.2.2.11. 5FU' ya Karşı Direnç Gelişim Sürecinde Hücrelerinnin Agresivitelerinin ve Metastatik Özelliklerinin Belirlenmesi

5FU' ya dirençli hale getirilen HT-29 (HT-29FUR) hücrelerinin agresivitelerini ve metastatik potansiyelini gözlemlemek için erken evre olup takip süresi içerisinde nüks eden hastalarda anlamlılığı belirlenen *MACC1*, *MET* ve *NM-23H1* genlerinin ekspresyon profilleri ile hücrelerin migrasyon, invazyon, kolonisazyon yetenekleri incelendi. Her bir deney üç kez tekrarlandı ve elde edilen sonuçlar HT-29 hücreleri ile karşılaştırıldı.

3.2.2.11.1 5FU' ya Karşı Direnç Gelişim Sürecinde *MACC1, MET* ve *NM-23H1* Genlerinin Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi

MACC1, *MET* ve *NM-23H1'* in ekspresyon profilleri daha önce de belirtildiği ve Tablo 17' de ifade edildiği şekilde gerçekleştirildi.

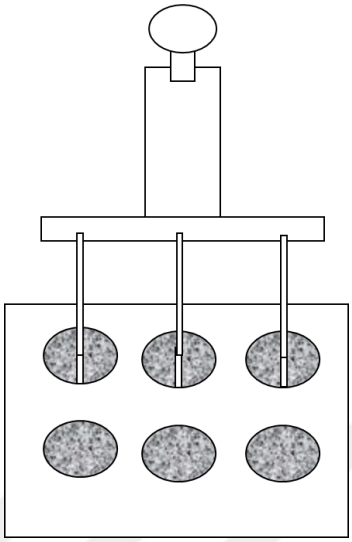
3.2.2.11.1 Migrasyon ve İnvazyon Analizi

HT-29FUR hücrelerinin migrasyon ve invazyon yapma yeteneklerini gözlemlemek için yara iyileştirmesi analizi kullanıldı. Bu analiz yaralı dokuda hücrelerin davranışı göz önüne alınarak oluşturulan bir yöntemdir.

Yaralı doku, hasarlı bölgeyi onarmak için karmaşık ve yapılandırılmış bir dizi olay başlatır. Bu olaylar, anjiyojenik faktörlerle artmış vaskülarizasyon ve invazyon, hücre çoğalması ve hücre dışı matris birikiminde artıştır. Yara iyileşme süreci, hücreler yaraya doğru polarize olur, çıkıntıyı başlatır, göç eder ve yara bölgesini kapatır. Bu işlemler, tek tek hücrelerin davranışını ve tüm doku kompleksini yansıtır. Yara iyileşmesi deneyleri araştırmacılar tarafından, hücre polarizasyonunu, doku matrisinin yeniden şekillenmesini incelemek veya hücre çoğalmasını, hücreler invazyonu ve hücrelerin göç oranlarını tahmin etmek için kullanılmaktadır. Bu deneyler tipik olarak bir birleştirilmiş hücre tek tabakasının kültürlenmesini ve ardından tek tabakanın içinden bir çizgi çizerek bir hücre grubunun yer değiştirmesini veya yok edilmesini içerir. Bu "yara" nın yarattığı açık boşluk, hücreler hareket ettikçe hasarlı bölgenin zamanla doldurulması esasına dayanır ve bu süreç ışık ya da inverted mikroslopla incelenir. Bu "iyileşme" etkisi hücre tipine, koşullarına ve "yaralı" bölgenin yüzey alanına bağlı olarak birkaç saat ila birkaç gün sürebilir.

Bu analiz için 6 kuyulu hücre kültür kaplarına $750x10^3$ hücre ekildi. Her bir kuyudaki hücre yoğunluğu %90'na ulaşıncaya kadar 37^0C sıcaklıkta, %5 CO_2

ortamda 72 saat inkübe edildi. Şekil 29' da ifade edildiği şekilde yapıldı ve iverted mikroskopta (Labomed, ABD) 6, 12, 18 ve 24 saat aralıklar ile incelendi (Şekil 29).



Şekil 29. Yara iyileştirmesi analizinde uygulanan çizik modeli

Oluşan yara alanının kapanma yüzdeleri, üç ayrı deney görüntüsü sonucu kullanılarak PowerPoint'te hesaplandı. Sonuçlar, muamele edilmeyen kontrole karşı yara kapanması oranı olarak ifade edildi ve Two-way Anova testi ile belirlendi.

3.2.2.11.2. Koloni Oluşumu Analizi

Klonojenik analiz veya koloni oluşumu yöntemi, tek bir hücrenin koloni haline gelme kabiliyetine dayanan bir in vitro yöntemdir. Bu analizde en az 50 hücrenin olduğu popülasyon koloni olarak tanımlanır. Analiz, temel olarak popülasyondaki her hücreyi "sınırsız" bir bölünme geçirme kabiliyeti açısından test eder. Klonojenik analiz, iyonlaştırıcı radyasyon ile muameleden sonra hücre üreme ölümünü belirlemek için tercih edilen bir yöntemdir, ancak diğer sitotoksik ajanların etkinliğini belirlemek için de kullanılabilir. Sadece bölünmüş hücrelerin bir kısmı koloniler üretme kapasitesini korur.

Bu analiz HT-29FUR hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerinin incelenmesi için kullanıldı. HT-29FUR hücrelerinin daha agresif karaktere ve metastaz yapma özelliklerine sahip olduğu düşünülmektedir. Bu hipotezi kanıtlamak için CellMAX^{TM} Colonogenic Assay Kit (BioPioneer, ABD)

kullanılarak HT-29FUR hücrelerinin HT-29 hücrelerine göre daha hızlı ve çok koloni oluşturma yetenekleri analiz edildi.

Bu analiz için HT-29 ve HT-29FUR hücreleri 6 well-plate' e her bir kuyuda $1x10^3$ hücre olacak şekilde ekildi ve 37^0C sıcaklıkta, %5 CO_2 ortamda 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler 0 µM , 0.1 µM, 0.5 µM, 1 uM, 5µM, 10 µM 5FU ile muamele edildi ve 37^0C sıcaklıkta, %5 CO_2 ortamda 9-15 gün inkübe edildi. Bu süre zarfında hücrelerin besiyeri 3 günde bir değiştirildi. İnkübasyon sonunda kuyulardaki besiyeri çekildi ve hücreler 2-3 kez PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 1ml fiksasyon tamponu ilave edildi ve 15 dk oda ısısında fiksasyon yapıldı. Daha sonra hücreler üzerine 1ml boyama solüsyonu eklendi ve 45 dakika oda ısısında boyama yapıldı. Boyama sonrası hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve mavi renk ile boyanan koloniler inverted mikroskop (Labomed, ABD) altında sayıldı. Hücrelerin koloni oluşturma oranları ve canlılık franksiyonları kitin önerdiği formüller ile hesaplandı.

$$\textbf{Kaplama Verimliliği=} \frac{\text{Oluşan Koloni Sayısı}}{\text{Ekilen Hücre Sayısı}} \times 100$$

$$\textbf{Canlılık Oranı=} \frac{\text{Doz Verilen Hücrenin Kaplama Alanı}}{\text{Kontrol Grubu Kaplama Verimliliği}} \times 100$$

3.2.3. İstatistiksel Analiz

Hastalara ait klinik ve patolojik özelliklerin nükse olan etkileri Bağımsız T, Ki-kare ve Tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) kullanılarak belirlendi. EMT belirteçlerinin, metastaz ile ilişkili genlerin, MDR belirteçlerinin ve LncRNA' ların ifade düzeyleri web-tabanlı "RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v3.5"programından yararlanılarak değerlendirildi. Moleküler parametrelerin eşik değerleri Reciever Operator Characteristics Curve (ROC) analizi ile belirlendi. Moleküler parametrelerin birbirleri ile olan sinerjik ilişkileri korelasyon testi ile incelendi. Moleküler parametreler ROC analizinden sonra kategorik değişkenler şekline getirildikten sonra klinik, patolojik ve nüks ile olan ilişkilerinin analizleri ki-kare testi gerçekleştirildi. Tanı anından nükse kadar geçen süre hastalıksız sağ kalım (Disease free survival- DFS) olarak tanımlandı ve değerlendirilen tüm parametrelerin DFS' ye olan etkileri Kaplan Meier Analizi ile belirlendi.

Hücre kültüründe verilere ait tamamlayıcı istatistikler sayı, yüzde, ortalama ve standart sapma olarak gösterildi ve gruplar arasındaki farklılıklar One-way ANOVA analizi ile belirlendi.

Tüm istatistiksel analizlerde SPSS (20.0) ve Graphpad Prism 16.0 programlarından yararlanıldı. Klinik, patolojik ve moleküler parametrelerin DFS' ye olan etkilerinin değerlendirildiği Kaplan Meier analizi MedCalc 16.0 programı ile gerçekleştirildi. Tüm istatistik analizlerinde p değerinin 0.05' ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların Klinik ve Patolojik Özellikleri

Hasta seçim ve ret kriterlerine uygun olarak belirlenen 126 olgunun 69' u erkek 55' i kadındı. Ortalama yaş 62.75 olarak belirlendi. Tümör 61 olguda sağ kolonda 65 olguda ise sol kolon yerleşimdeydi. Amerikan kanser komitesine (AJCC) göre yapılan sınıflandırmaya göre 11 olgu T1, 36 olgu T2, 79 olgu ise T3 olarak belirlendi. Kırk sekiz olguda tümör tomurcuklanması gözlemlendi.

Hastaların takip süresi ortalama 78 ay (56 ay–132 ay) olarak belirlendi. Takip süresi içerisinde 21 olguda sistemik nüks gelişimi gözlendi. Hastalara ait klinik ve patolojik özellikler Tablo 18'de gösterildi.

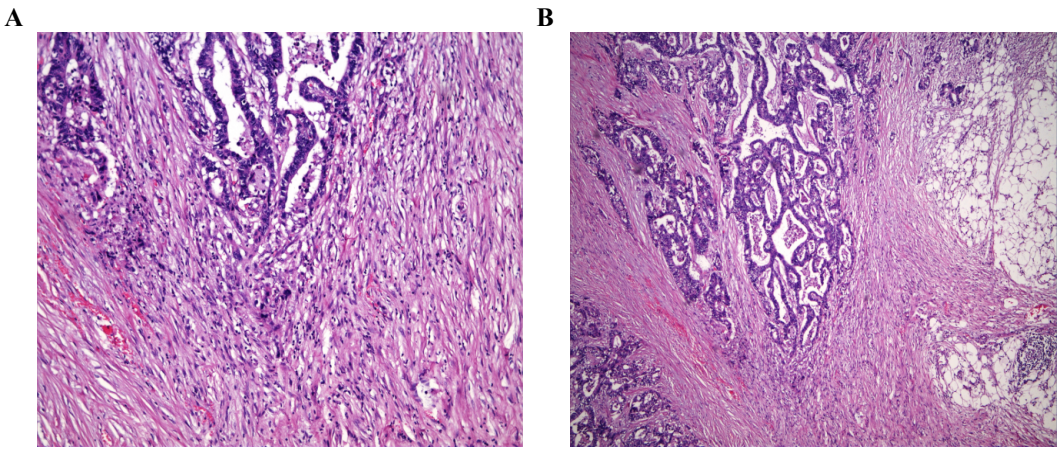
Tablo 18. Hastalara ait demografik ve patolojik özeliikler

Parametreler	Total n (%)	Parametreler	Total n (%)

Yaş		**Ülserasyon**	
40-49	12 (10.3)	Var	84 (66.7)
50-59	44 (34.2)	Yok	42 (33.3)
60-69	59 (46.8)	**Peritümöral Lenfositik Reaksiyon**	
70-79	11 (8.7)	Hafif	41 (32.5)
Cinsiyet		Orta	37 (29.4)
Kadın	57 (43.7)	Belirgin	21 (16.7)
Erkek	69 (56.3)	Negatif	27 (21.4)
Tumor Lokalisazyonu		**Benin Lenf Nodu Sayısı**	
İleoçekal	1 (0.8)	0-14	23 (18.3)
Splenik Fleksura	2 (1.6)	15-30	92 (73.0)
Hepatik Fleksura	3 (2.4)	>30	11 (8.7)
Çekum	19 (15.1)	**Tümör Büyüme Paterni**	
Çıkan Kolon	21 (16.7)	Ülserovejatatif	75 (59.5)
İnen Kolon	29 (23.0)	Ülseroinfiltratif	21 (16.7)
Rektosigmoid	16 (12.7)	Polipoid	12 (9.5)
Sigmoid	35 (25.7)	Karma	18 (14.3)
Peritümöral Desmoplastik Reaksiyon			
Hafif	28 (22.2)		
Orta	29 (23.0)		
Belirgin	38 (30.2)		
Negatif	31 (24.6)		

4.1.1. Erken Evre KK'larda Tümör Tomurcuklanması

Lenfatik, vazküler, perinöral invazyonu ve metastatik lenf nodu bulunmayan 126 erken evre kolon adenokarsinomunun %38.'inde (n= 48) tümör tomurcuklanması belirlendi (Şekil 30).



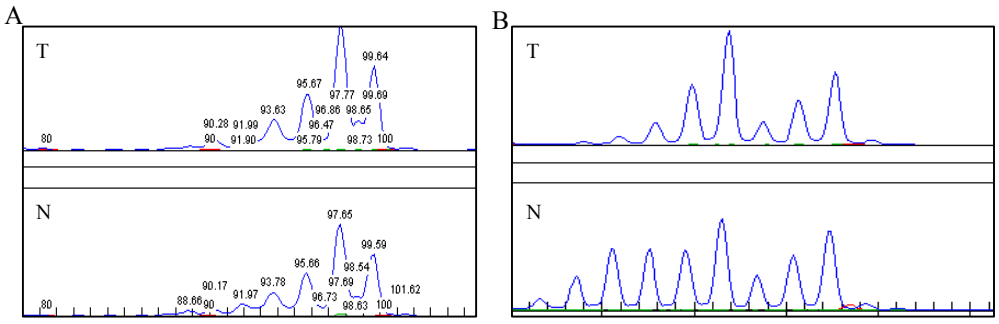
Şekil 30. Erken evre kolon tümörlerinde tümör tomurcuklanması (A: tomurcuklanma pozitif, B: tomurcuklanma negatif)

4.1.2. Erken Evre KK'ların Tümör Biyolojisi

4.1.2.1 Erken Evre KK'larda MSI durumu

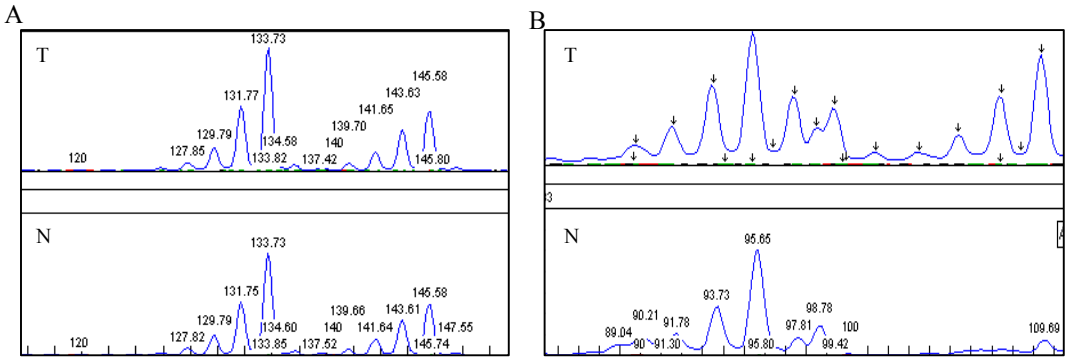
D2S123, D17S250, D5S346, BAT25 ve BAT26 belirteçleri kullanılarak gerçekleştirilen MSI analizinde; 126 erken evre kolon tümörünün %83.3'ü MSS (n= 105), %7.14' ü MSI-L (n=9), %9.52'si ise MSI-H (n=12) olarak değerlendirildi.

D2S123 belirteci MSI-L olarak değerlendirilen tümörlerin %44.44' ünde (n= 4), MSI-H tümörlerin ise %50' sinde pozitif bulundu (n=6) (Şekil 31).



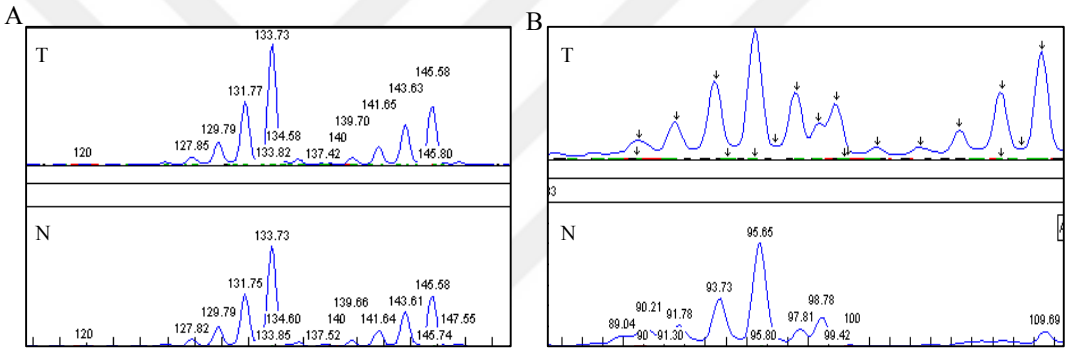
Şekil 31. (A) D2S123 normal (B) D2S123 pozitif T: Tümör, N: Normal

D17S250 belirteci MSI-L olarak değerlendirilen tümörlerin %22.22'sinde (n=2), MSI-H tümörlerin ise %8.33' ünde pozitif bulundu (n=1) (Şekil 32).



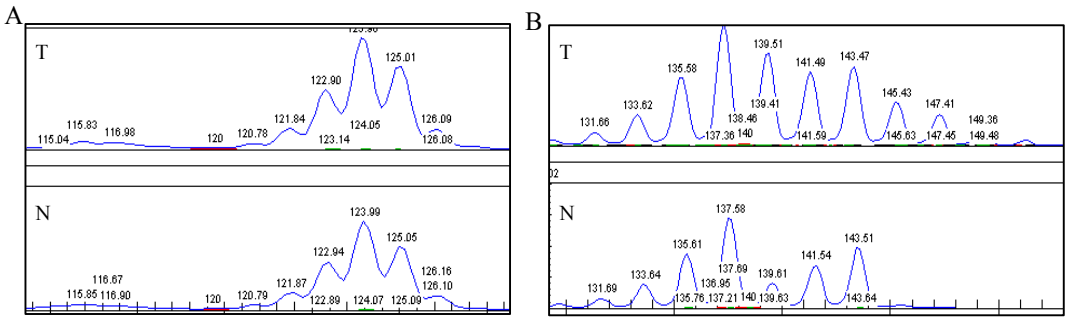
Şekil 32. (A) D17S250 normal (B) D17S250 pozitif T: Tümör, N: Normal

D5S346 belirteci MSI-L olarak değerlendirilen tümörlerin tümünde negatif olarak belirlendi. Bu belirteç, MSI-H tümörlerin ise %8.33'ünde pozitif bulundu (n=1) (Şekil 33).



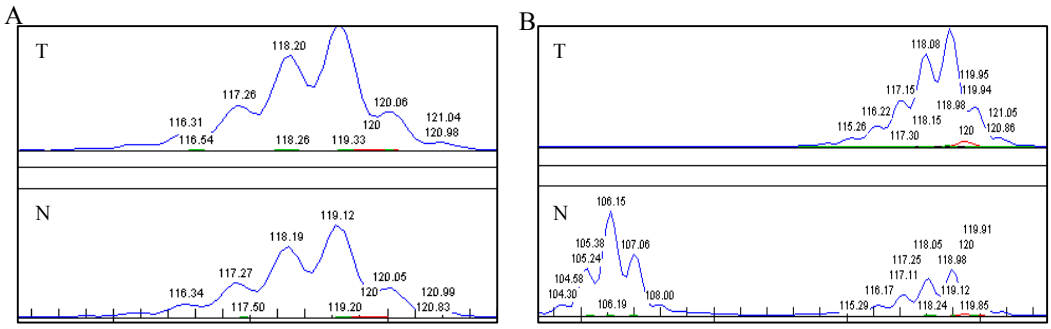
Şekil33. (A) D5S346 normal (B) 5S346 pozitif T: Tümör, N: Normal

BAT25 belirteci MSI-L olarak değerlendirilen tümörlerin %22.22'sinde (n=2), MSI-H tümörlerin ise %16.67 ünde pozitif bulundu (n=2) (Şekil 34).



Şekil 34. (A) BAT25 normal (B) BAT25 pozitif T: Tümör, N: Normal

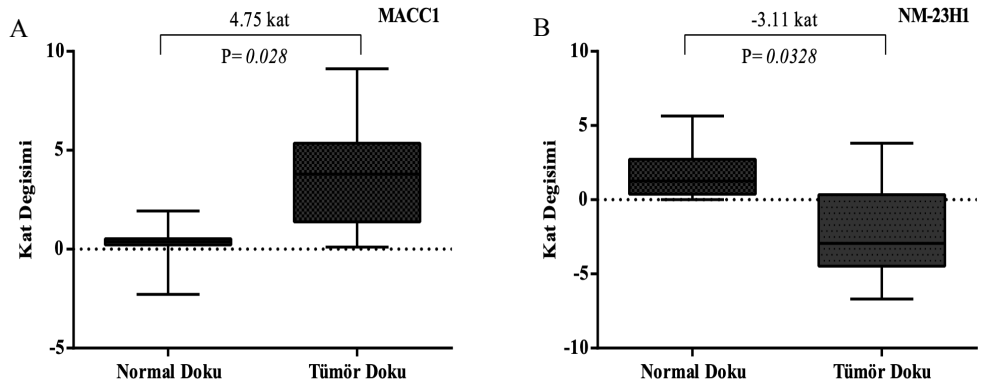
BAT26 belirteci MSI-L olarak değerlendirilen tümörlerin %11.11'inde (n=1), MSI-H tümörlerin ise %16.67'ünde pozitif bulundu (n=2) (Şekil 35).



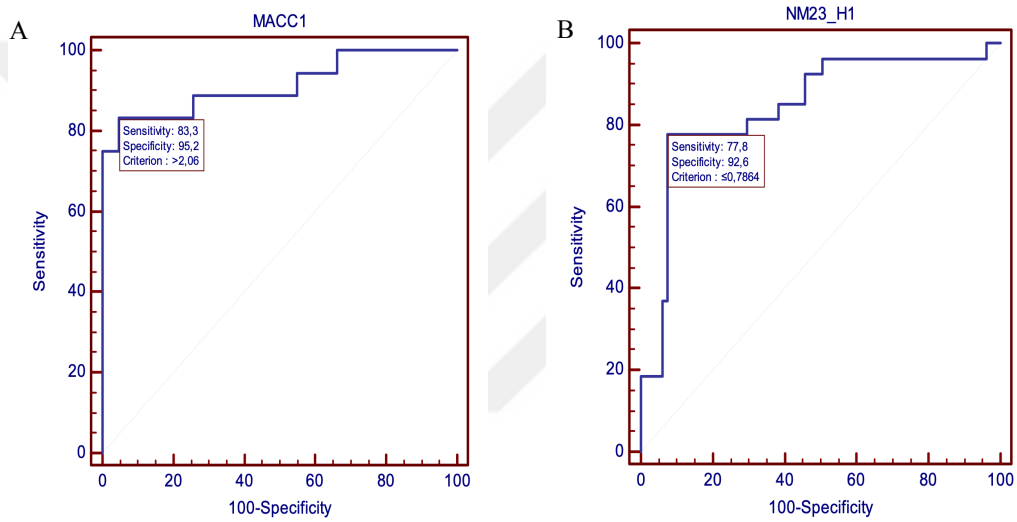
Şekil 35. (A) BAT26 normal (B) BAT26 pozitif T: Tümör, N: Normal

4.1.2.2. Erken Evre KK'larda Metastaz ile İlişkili Genlerin Aktivasyonu

Erken evre kolon tümörlerinde *MACC1* ve *NM-23H1'* in ekspresyon profilleri normal kolon dokusu ile karşılaştırılarak belirlendi. Kontrol gen olarak *GAPDH* kullanıldı. Normal kolon dokusuna göre erken evre kolon tümörlerinde *MACC1'* in 4.75 kat yüksek (p= 0.028) , *NM-23H1'* in ise 3.11 kat düşük ifade (p= 0.032) edildiği belirlendi (Şekil 36). Bu iki genin normal dokudaki ekspresyon değerleri ile erken evre kolon tümörlerindeki ekspresyon değerleri ROC curve analizi ile karşılaştırılarak *MACC1*' in eşik değeri 2.08, *NM-23H1'* in ise eşik değeri 0.8 olarak belirlendi (Şekil 37). Hastalar her iki genin ekspresyon durumuna göre iki gruba ayrıldı. Çalışmada değerlendirilen erken evre kolon tümörlerinin %76.2'sinde *MACC1*' in yüksek, %57.9' unda ise *NM-23H1* düşük eksprese edildiği belirlendi (Tablo 20). Yüksek *MACC1* ve düşük *NM-23H1* ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı korelasyon gözlemlenmedi (r= -0.064, p= 0.477).



Şekil 36. Erken evre kolon tümörlerinde *MACC1* ve *NM-23H1'* in ekspresyon profilii.



Şekil 37. Normal doku ile karşılaştırılarak elde edilen *MACC1* ve *NM-23H1'* in eşik değerleri. A. *MACC1'* in ROC curve analiz eğrisi. B. *NM-23H1'* in ROC curve analiz eğrisi.

Tablo 20. *MACC1* ve *NM-23H1'* in erken evre kolon tümörlerindeki ekspresyon değerleri ve bu genlerde yüksek/düşük ekspresyon gösteren hasta sayıları.

mRNAs	2^(-Avg.(Delta(Ct))		*P Değeri	Düşük	Yüksek
	Normal Doku	Tümör Doku		Ekspresyon n(%)	Ekspresyon n(%)
MACC1	0.019	0.094	**0.028**	30 (23.8)	96 (76.2)
NM-23H1	0.112	0.036	**0.032**	73 (57.9)	53 (42.1)

Sonuçlar RT2 profiler PCR array data analysis programından Bağımsız T Testi ile değerlendirildi. * 0.05' ten küçük p değeri kalın ve italik ifade edildi.

4.1.2.3. Erken Evre KK'larda EMT Belirteçlerinin Ekspresyon Profilleri

Erken evre kolon tümörlerinde EMT mekanizmasının aktivitesi EMT düzenleyicileri olan, E-*kaderin*, *N-kaderin*, *Snail*, *Slug*, *Zeb1*, *Twist*, *Vimentin* ve *MMP-9*' nun mRNA ekspresyon değerlerinin normal kolon dokusundaki ekspresyon değerleri ile karşılaştırılarak belirlendi. Kontrol gen olarak *GAPDH* kullanıldı (Tablo 21).

Tablo 21. EMT belirteçlerinin normal kolon dokusuna göre erken evre KK'lardaki ekspresyon profilleri

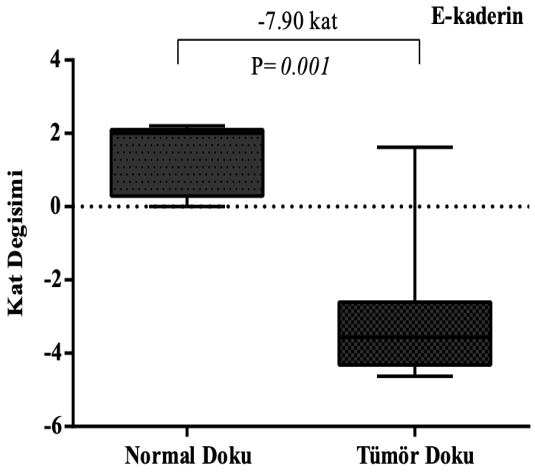
mRNAs	2^(-Avg.(Delta(Ct))		*P Değeri
	Normal Doku	Tümör Doku	
E-kaderin	0.256	0.032	0.001
N-kaderin	0.127	0.203	0.102
Snail	0.089	0.391	0.004
Slug	0.075	0.124	0.078
Zeb1	0.152	0.190	0.101
Twist	0.098	0.214	0.056
Vimentin	0.158	0.325	0.058
MMP-9	0.558	1.568	0.046

Sonuçlar RT2 profiler PCR array data analysis programından Bağımsız T Testi ile değerlendirildi. * 0.05' ten küçük p değeri kalın ve italik ifade edildi.

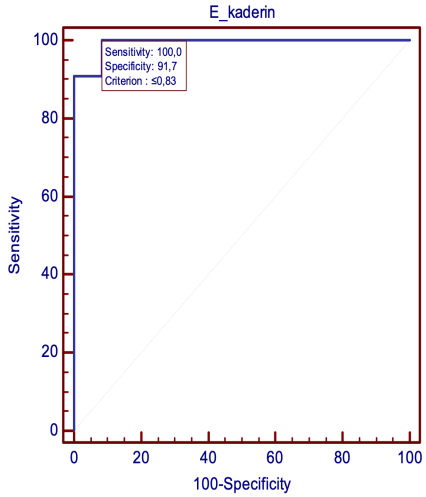
Değerlendirilen tüm EMT belirteçlerinin gen ekspresyon verilerinin eşik değerleri, belirteçlerin normal ve tümör dokularındaki kat değişimleri ile ROC curve eğrisi yapılarak belirlendi.

Normal kolon dokusu ile karşılaştırıldığında, erken evre kolon tümörlerinde, *E-kaderin* ekspresyonu 7.90 kat istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdi (p= 0.001). *E-kaderin* mRNA düzeyindeki ekspresyonunun kat değişim eşik değeri 0.83 olarak belirlendi. *E-kaderin*' nin değerlendirilen tümörlerin %55.6'sında düşük, %44.4'ünde ise yüksek eksprese olduğu saptandı (Şekil 38).

A



B



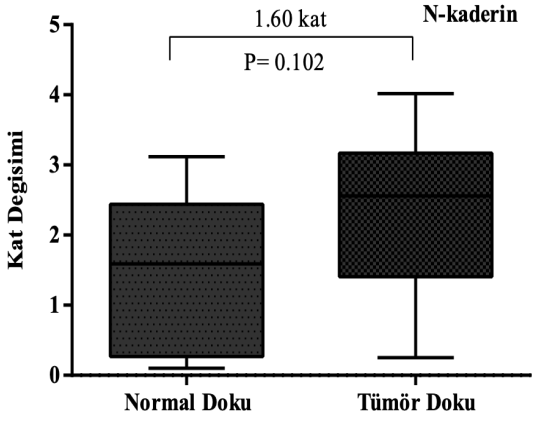
C

Belirteç	AUC	Standart Sapma	%95 CI	P Değeri	Eşik Değeri
E-Kaderin	0.992424	0.0107	0.838117-1000000	< 0.001	0.83

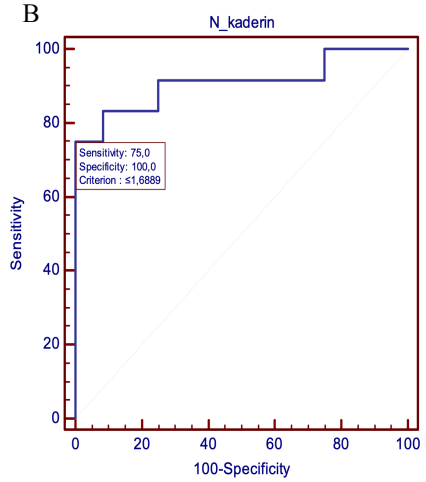
Şekil 38. (A) *E-kaderin'* in tümör ve normal dokudaki ekspresyon profili (P değeri Bağımsız T Testi ile elde edilmiştir). (B) *E-kaderin*' in Roc Curve analizi (C) E-kaderin' in AUC analiz değeri.

Tümör dokuda *N-kaderin'* nin mRNA düzeyinde ekspresyonu normal dokuya göre 1.60 kat yüksek bulundu (p= 0.102). *N-kaderin* mRNA düzeyindeki ekspresyonunun kat değişim eşik değeri 1.69 olarak belirlendi. Bu belirtecin değerlendirilen tümörlerin %57.1'inde düşük, %42.9'unda ise yüksek eksprese olduğu saptandı (Şekil 39).

A



B



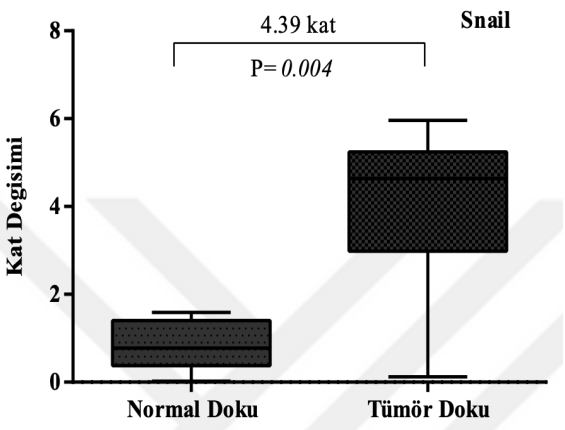
C

Belirteç	AUC	Standart Sapma	%95 CI	P Değeri	Eşik Değeri
N-Kaderin	0.909722	0.0672	0.720795-0.987427	< 0.001	1.6889

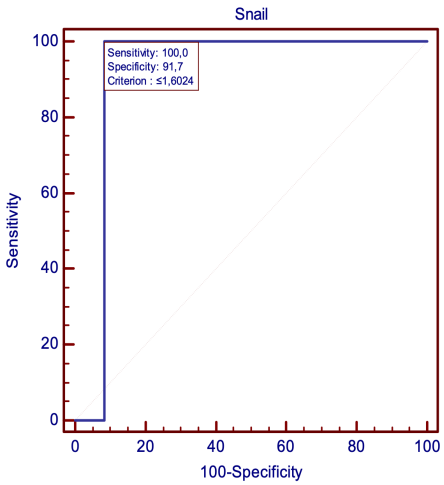
Şekil 39. (A) *N-kaderin'* in tümör ve normal dokudaki ekspresyon profili (P değeri Bağımsız T Testi ile elde edilmiştir). (B) *N-kaderin'* in ROC Curve analizi (C) *N-kaderin'* in AUC analiz değeri.

Tümör dokuda *Snail*' in mRNA düzeyinde ekspresyonu normal dokuya göre 4.39 kat yüksek bulundu (p= 0.004). *Snail* mRNA düzeyindeki ekspresyonunun kat değişim eşik değeri 1.60 olarak belirlendi. Bu belirtecin değerlendirilen tümörlerin %44.4' ünde düşük, %55.6' sında ise yüksek eksprese olduğu saptandı (Şekil 40).

A



B



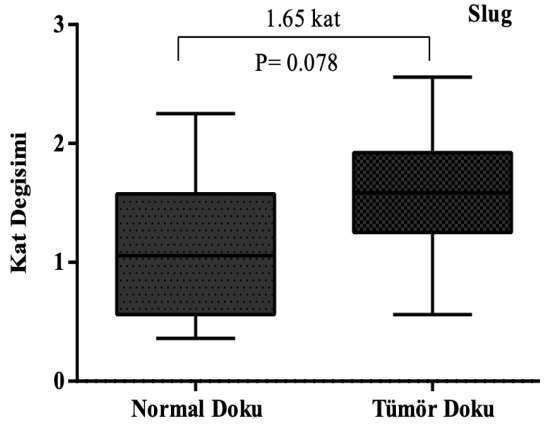
C

Belirteç	AUC	Standart Sapma	%95 CI	P Değeri	Eşik Değeri
Snail	0.916667	0.0833	0.730027-0.989744	< 0.001	1.6024

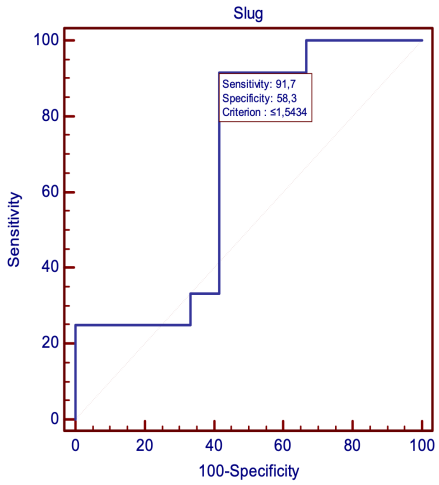
Şekil 40. (A) *Snail*' in tümör ve normal dokudaki ekspresyon profili (P değeri Bağımsız T Testi ile elde edilmiştir). (B) *Snail*' in ROC Curve analizi (C) *Snail'* in AUC analiz değer

Tümör dokuda *Slug*' ın mRNA düzeyinde ekspresyonu normal dokuya göre 1.65 kat yüksek bulundu (p= 0.078). *Slug* mRNA düzeyindeki ekspresyonunun kat değişim eşik değeri 1.54 olarak belirlendi. Bu belirtecin değerlendirilen tümörlerin %27'inde düşük, %73'ünde ise yüksek eksprese olduğu saptandı (Şekil 41).

A



B



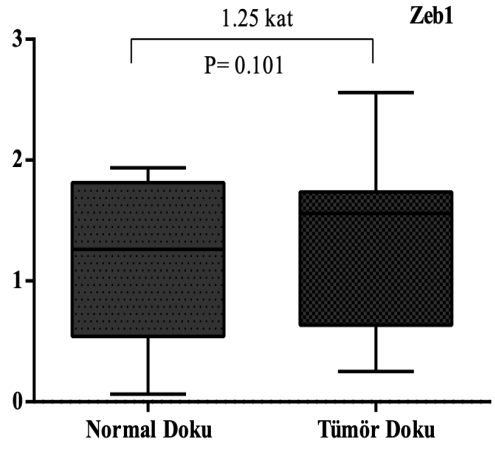
C

Belirteç	AUC	Standart Sapma	%95 CI	P Değeri	Eşik Değeri
Slug	0.673611	0.121	0.453723-0.848834	0.1510	1.5434

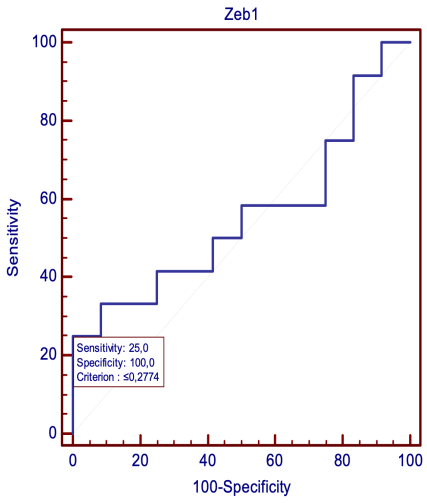
Şekil 41. (A) *Slug*' ın tümör ve normal dokudaki ekspresyon profili (P değeri Bağımsız T Testi ile elde edilmiştir). (B) Slug' ın ROC Curve analizi (C) *Slug*' ın AUC analiz değeri.

Tümör dokuda *Zeb1*' in mRNA düzeyinde ekspresyonu normal dokuya göre 1.25 kat yüksek bulundu (p= 0.101). *Zeb1* mRNA düzeyindeki ekspresyonunun kat değişim eşik değeri 0.28 olarak belirlendi. Bu belirtecin değerlendirilen tümörlerin %46' sında düşük, %54' ünde ise yüksek eksprese olduğu saptandı (Şekil 42).

A



B



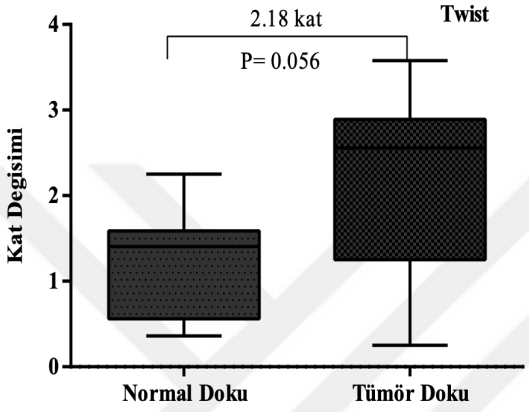
C

Belirteç	AUC	Standart Sapma	%95 CI	P Değeri	Eşik Değeri
Zeb1	0.555556	0.125	0.340808-0.756092	0.6580	0.2774

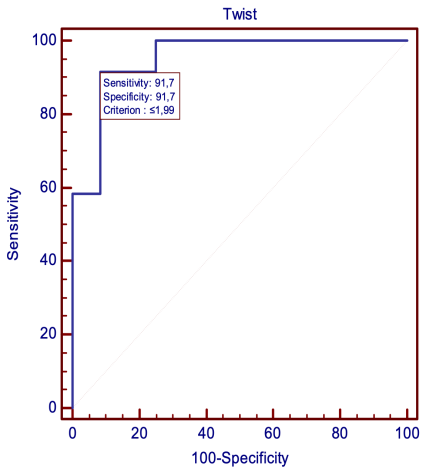
Şekil 42. (A) *Zeb1*' in tümör ve normal dokudaki ekspresyon profili (P değeri Bağımsız T Testi ile elde edilmiştir). (B) *Zeb1*' in ROC Curve analizi (C) *Zeb1*' in AUC analiz değeri.

Tümör dokuda *Twist*' in mRNA düzeyinde ekspresyonu normal dokuya göre 2.18 kat yüksek bulundu (p= 0.056). *Twist*' in mRNA düzeyindeki ekspresyonunun kat değişim eşik değeri 1.99 olarak belirlendi. Bu belirtecin değerlendirilen tümörlerin %45.2'sinde düşük, %54.8'inde ise yüksek eksprese olduğu saptandı (Şekil 43).

A



B



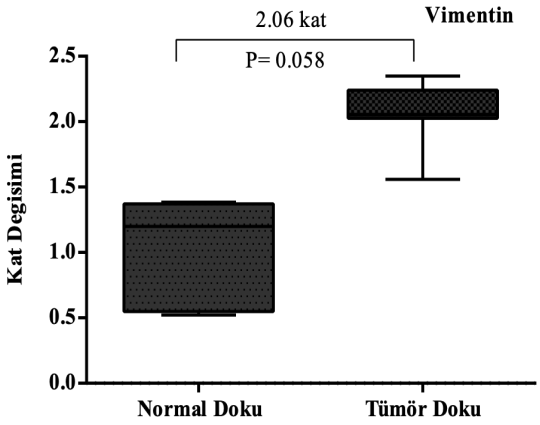
C

Belirteç	AUC	Standart Sapma	%95 CI	P Değeri	Eşik Değeri
Twist	0.951389	0.0409	0.778517-0.998066	< 0.001	1.99

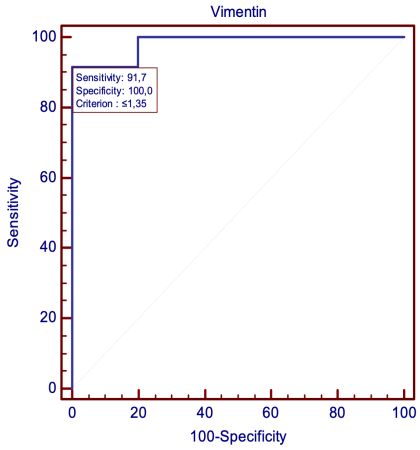
Şekil 43. (A) *Twist*' in tümör ve normal dokudaki ekspresyon profili (P değeri Bağımsız T Testi ile elde edilmiştir). (B) *Twist*' in ROC Curve analizi (C) *Twist*' in AUC analiz değeri.

Tümör dokuda Vimentin' in mRNA düzeyinde ekspresyonu normal dokuya göre 2.06 kat yüksek bulundu (p= 0.058). Vimentin' in mRNA düzeyindeki ekspresyonunun kat değişim eşik değeri 1.35 olarak belirlendi. Bu belirtecin değerlendirilen tümörlerin %39.7'sinde düşük, %60.3'ünde ise yüksek eksprese olduğu saptandı (Şekil 44).

A



B



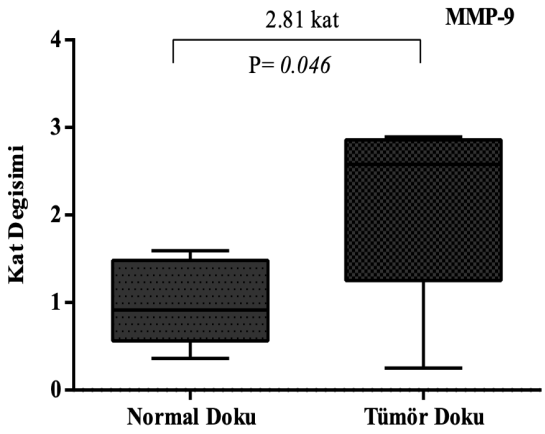
C

Belirteç	AUC	Standart Sapma	%95 CI	P Değeri	Eşik Değeri
Vimentin	0.983333	0.0236	0.776590-1.000000	< 0.001	1.35

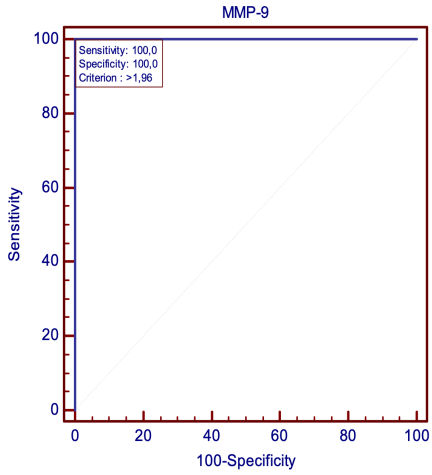
Şekil 44. (A) *Vimentin*'in tümör ve normal dokudaki ekspresyon profili (P değeri Bağımsız T Testi ile elde edilmiştir). (B) *Vimentin*'in ROC Curve analizi (C) *Vimentin*'in AUC analiz değeri.

Tümör dokuda *MMP-9'* un mRNA düzeyinde ekspresyonu normal dokuya göre 2.81 kat istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (p= 0.046). *MMP-9*'un mRNA düzeyindeki ekspresyonunun kat değişim eşik değeri 1.96 olarak belirlendi. Bu belirteç değerlendirilen tümörlerin %36.5'inde düşük, %63.5'inde ise yüksek eksprese olduğu saptandı (Şekil 45).

A



B



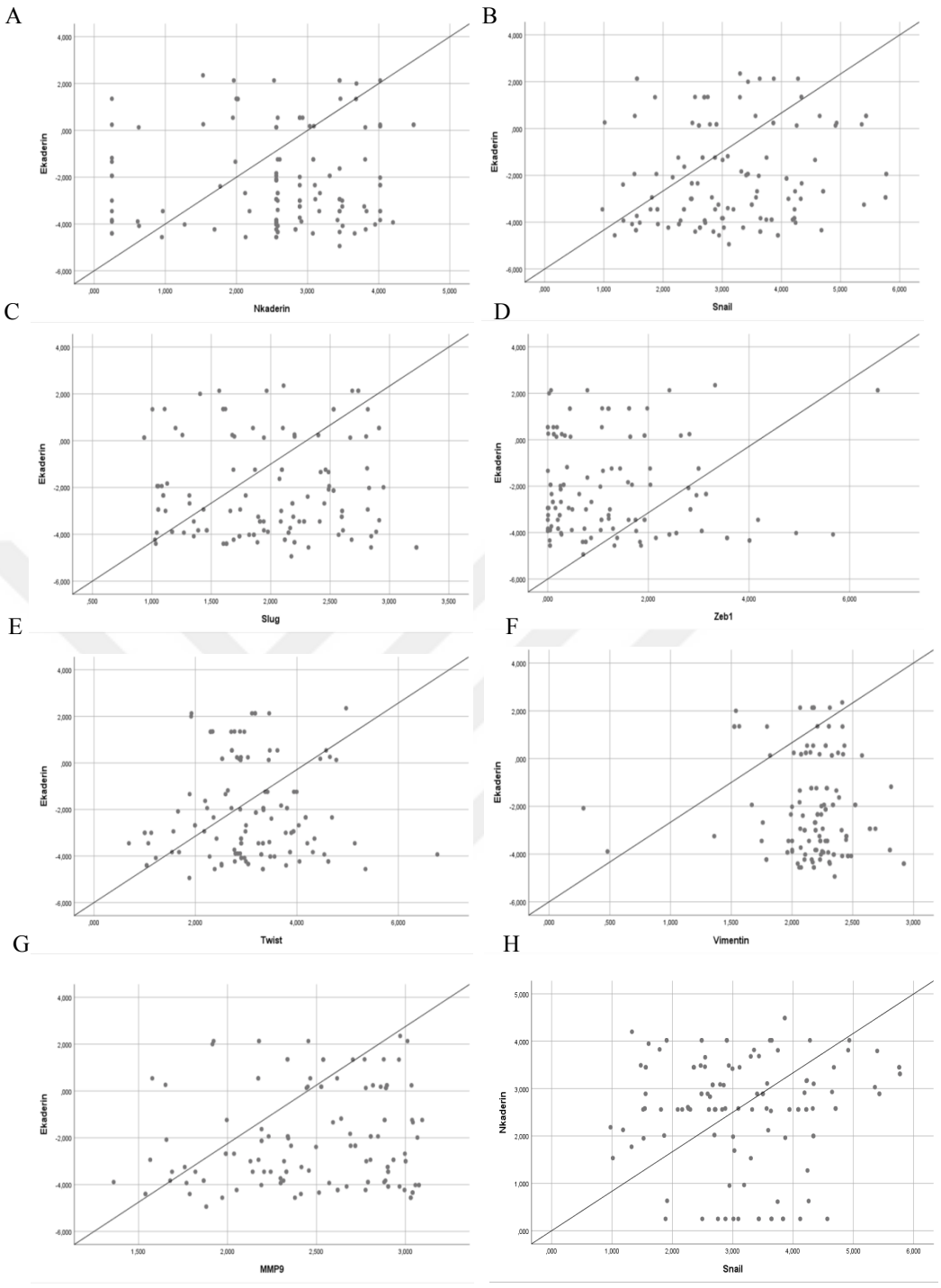
C

Belirteç	AUC	Standart Sapma	%95 CI	P Değeri	Eşik Değeri
MMP-9	1.000.000	0.000	0.781981-1.000000	< 0.001	1.96

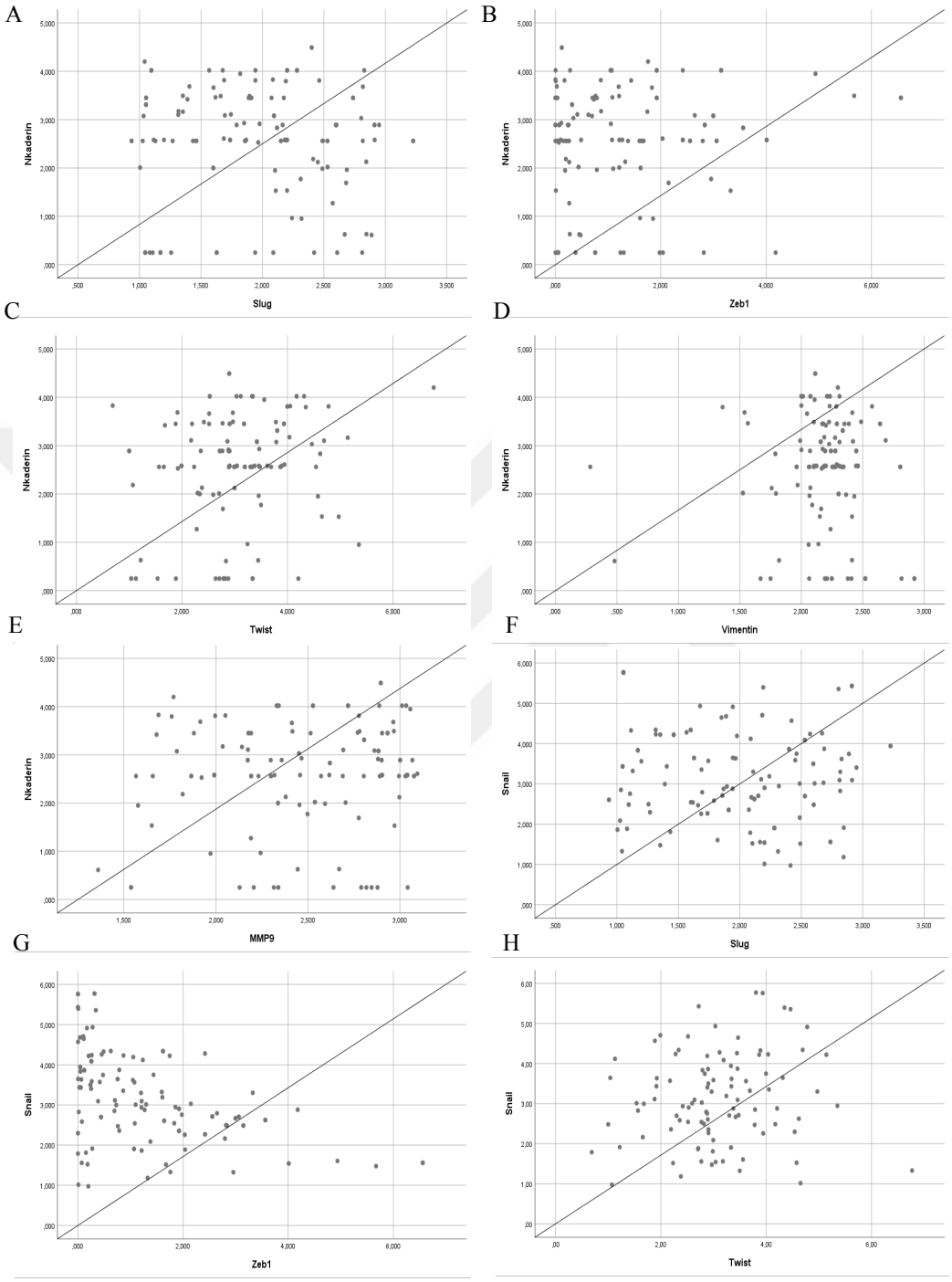
Şekil 45. (A) *MMP-9'un* tümör ve normal dokudaki ekspresyon profili (P değeri Bağımsız T Testi ile elde edilmiştir). (B) *MMP-9'un* ROC Curve analizi (C) *MMP-p'un* AUC analiz değeri.

4.1.2.3.1. Erken Evre KK'larda EMT Belirteçlerinin Birbirleri ile İlişkisi

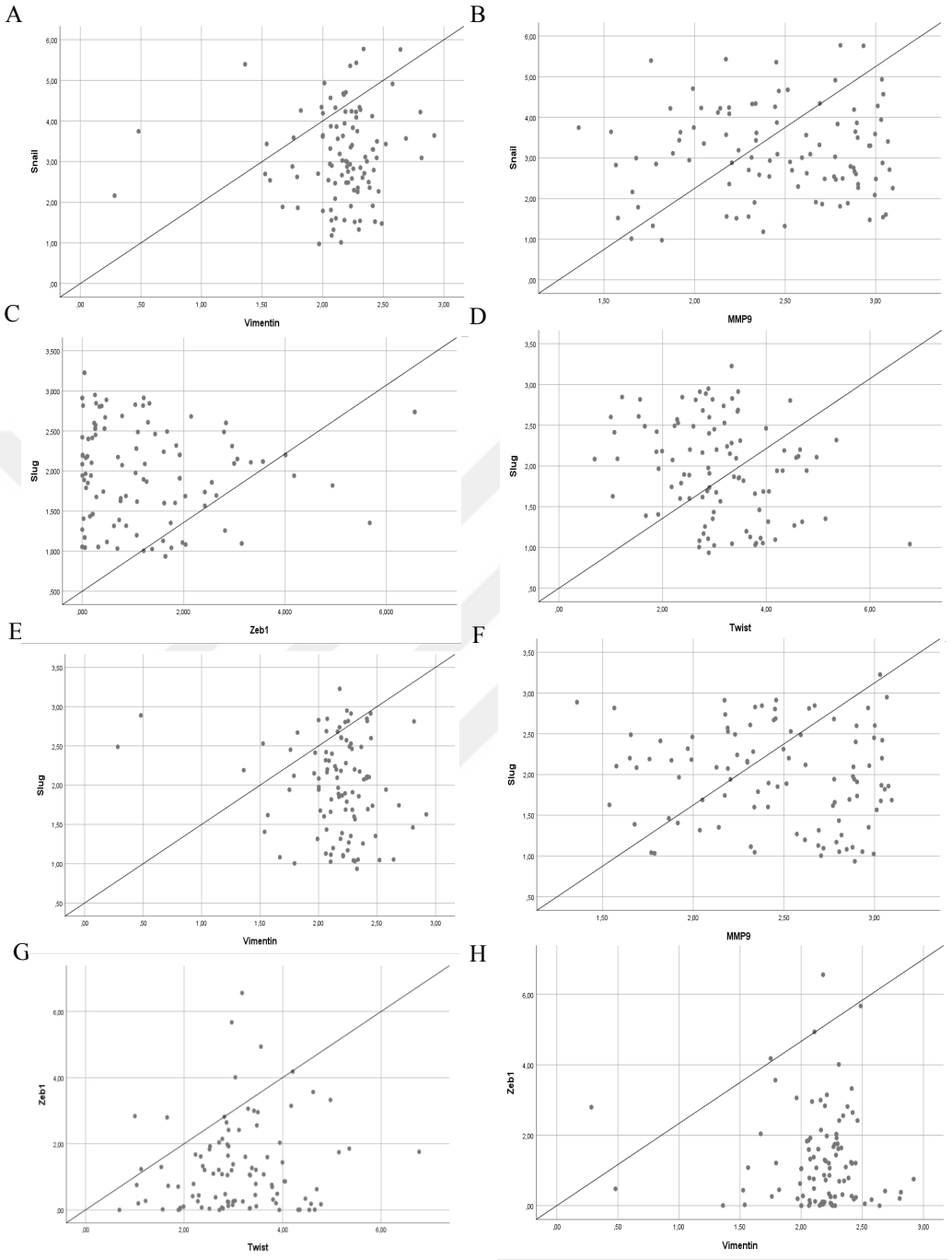
EMT belirteçlerinin ekspresyon profillerinin birbirleri üzerine olası etkileri Sperman's rho korelasyon testi ile incelendi. Erken evre kolon tümörlerinde EMT belirteçlerinin ekspresyonlarının korelasyonları Şekil 46-49'da belirtilmiştir. Yapılan analize göre *Zeb1*'in *Snail* ile anlamlı negatif, *MMP-9* ile ise anlamlı pozitif korelasyon gösterdiği saptandı (Correlation Coefficient= -0.094, p= 0.001; Correlation Coefficient= 0.089, p= 0.006, sırasıyla).



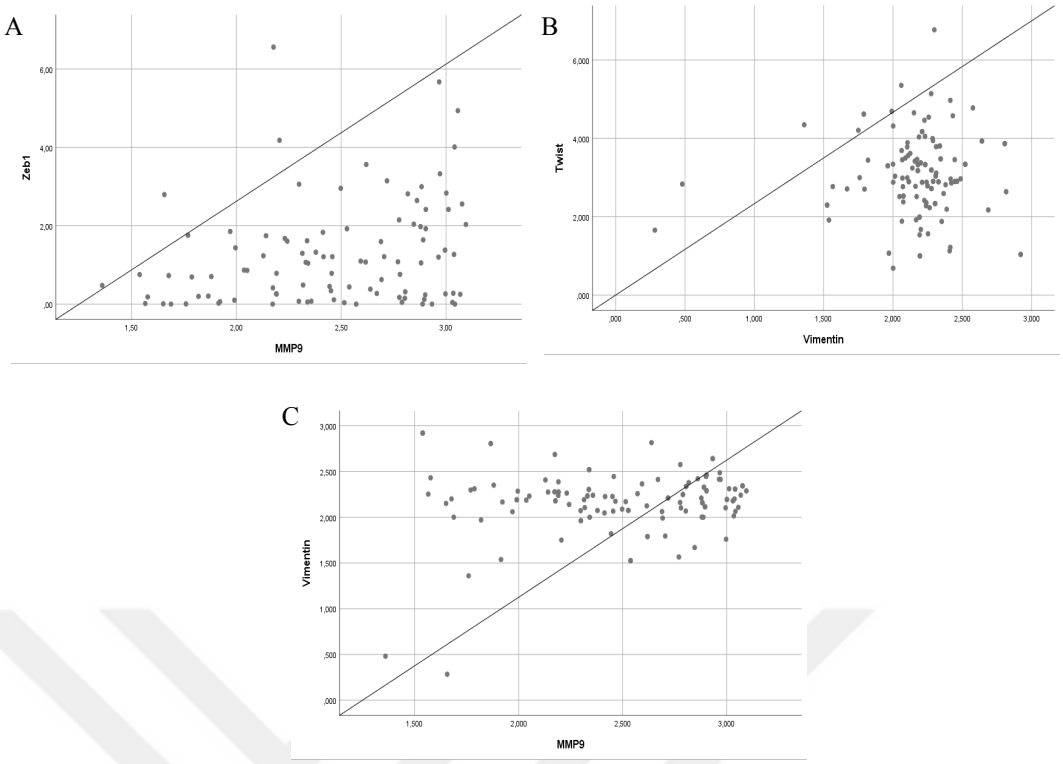
Şekil 46. Erken evre 126 Kolon tümör dokusunda E-Kaderin ekspresyonunun *N-Kaderin* (A), *Snail* (B), *Slug* (C), *Zeb1* (D), *Twist* (E), *Vimentin* (F), *MMP-9* (G) ekspresyon profilleri ile korelasyonu*, N-Kaderin* ekspresyonunun *Snai*l (H) ekspresyonu ile korelasyonu.



Şekil 47. Erken evre 126 Kolon tümör dokusunda *N-Kaderin* ekspresyonunun *Slug* (A), *Zeb1* (B), *Twis*t (C), *Vimentin* (D), *MMP*-9 (E) ile korelasyonu, *Snail* ekspresyonunun *Slug* (F), *Zeb1* (G) ve *Twist* (H) ekspresyonu ile korelasyonu.



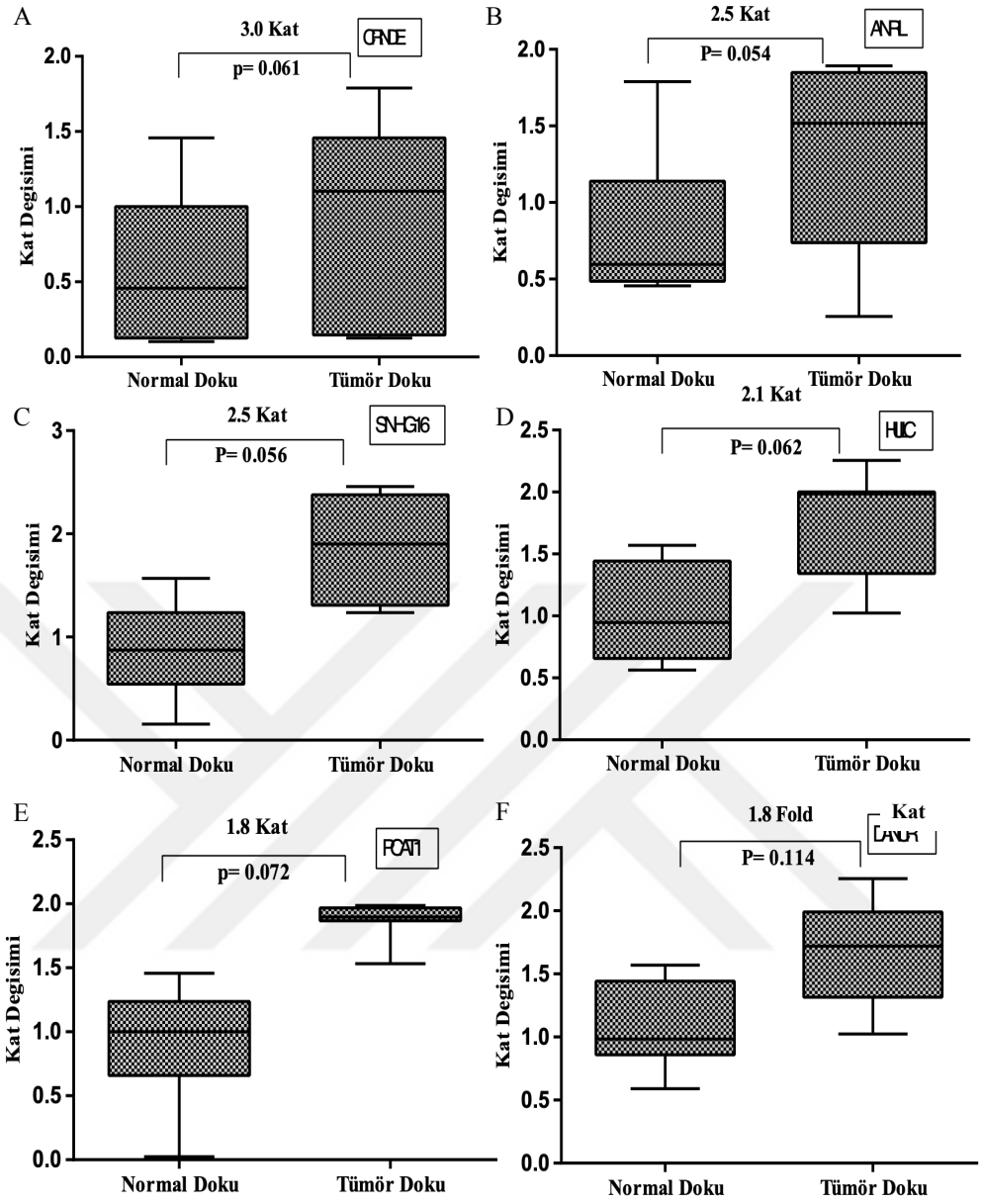
Şekil 48. Erken evre 126 Kolon tümör dokusunda Snail ekspresyonunun *Vimentin* (A), *MMP-9* (B) ekspresyonu ile korelasyonu, *Slug* ekspresyonunun *Zeb1* (C), *Twist* (D), *Vimentin* (E) *MMP-9* (F) ile korelasyonu, *Zeb1* ekspresyonunun *Twist* (G) ve *Vimentin* (H) ekspresyonu ile korelasyonu.



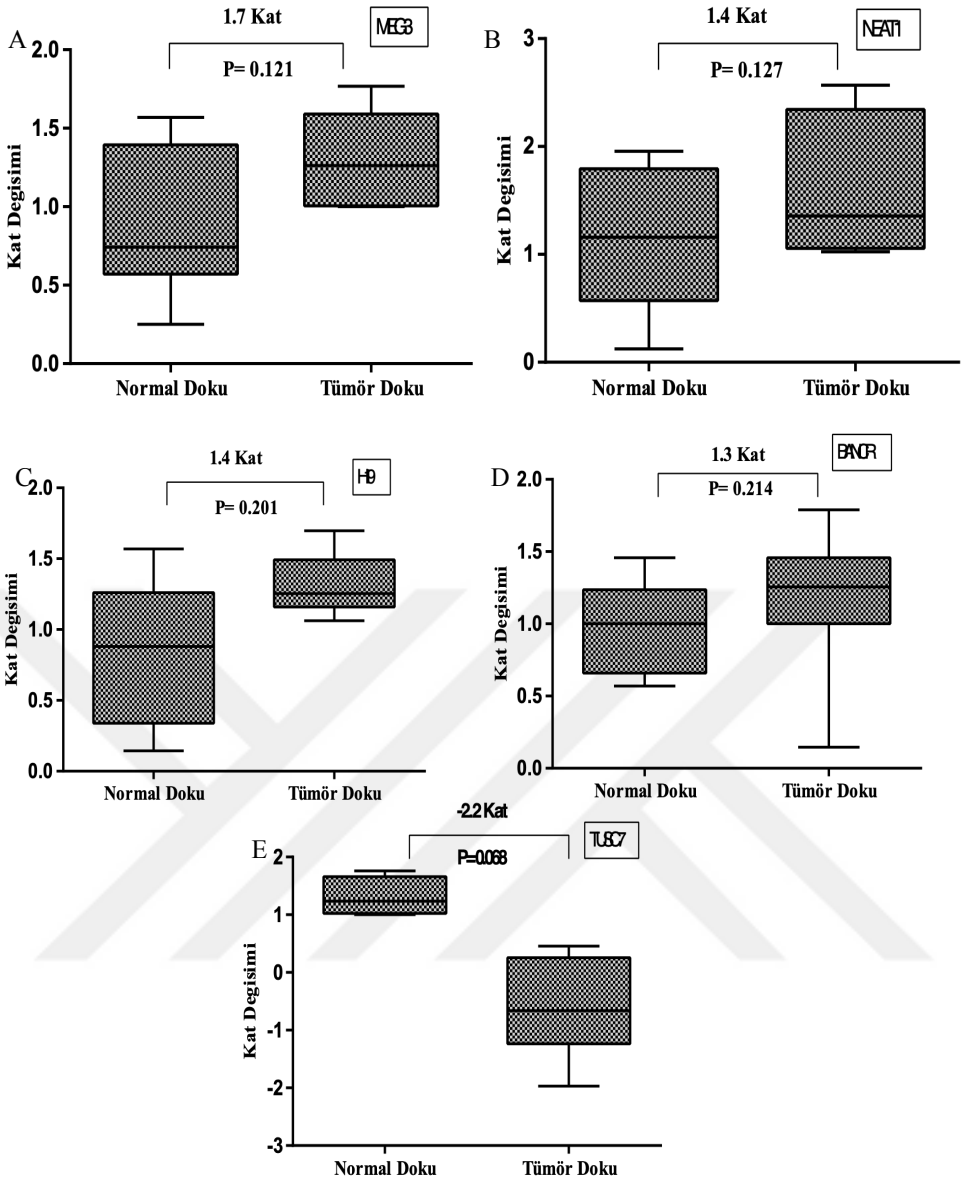
Şekil 49. Erken evre 126 Kolon tümör dokusunda *Zeb1* ekspresyonunun *MMP-9* (A), *Twist* ekspresyonunun *Vimentin* (B), *Vimentin* ekspresyonunun *MMP-9* (C) ekspresyonu ile korelasyonu.

4.1.3. Erken Evre KK'larda LncRNA Ekspresyon Profilleri

Erken evre kolon tümörlerinde Tablo 13'te ifade edilen 15 farklı LncRNA' nın ekspresyon profilleri normal kolon dokusu ile karşılaştırılarak belirlendi. Kontrol gen olarak GAPDH kullanıldı. Değerlendirilen LncRNA' lar arasından istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, CRNDE, ANRIL, SNGH16, HULC, PCAT1, DANCR, MEG3, NEAT1, H19 ve BANCR' nin ekspresyonlarının normal kolon dokusuna göre erken evre kolon tümörlerde daha fazla, TUSC' nin ekspresyonunun ise daha az olduğu belirlendi ($p > 0.05$) (Şekil 50, Şekil 51).

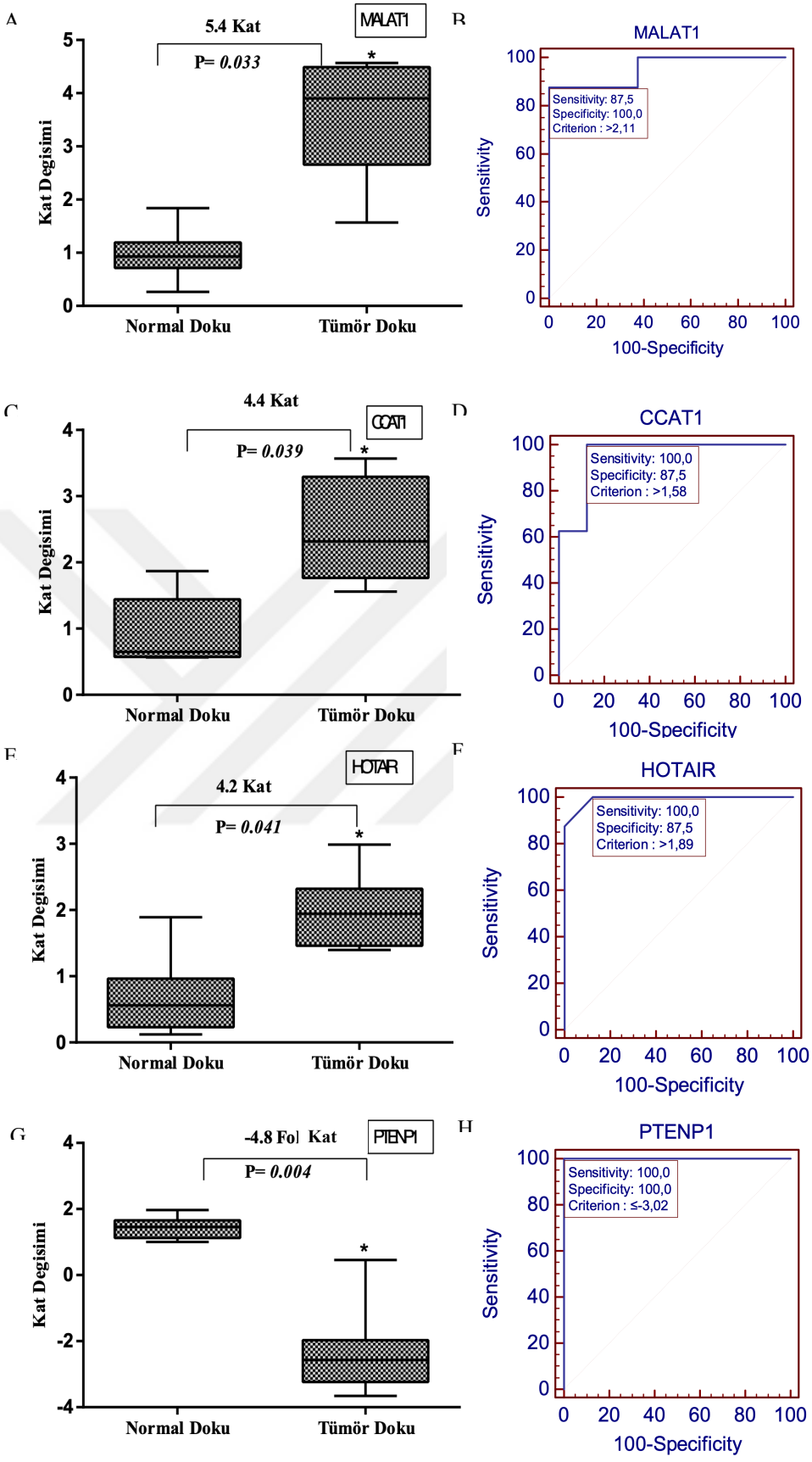


Şekil 50. Erken evre kolon tümörlerinde CRNDE (A), ANRIL (B), SNGH16 (C), HULC (D), PCAT1 (E), DANCR'ın (F) ekspresyon profilleri.



Şekil 51. Erken evre kolon tümörlerinde MEG3 (A), NEAT1 (B), H19 (C), BANCR (D), TUSC7'nin (E) ekspresyon profilleri.

Bununla birlikte erken evre kolon tümörlerinde, MALAT1, CCAT1 ve HOTAIR' in ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı, PTENP1' in ekspresyonun ise istatiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlendi (MALAT1; 5.4-kat, p= 0.033; CCAT1; 4.4-kat, p= 0.039; HOTAIR; 4.2-kat, p= 0.041; PTENP1; -4.8-kat, p= 0.004). ROC curve analizi ile anlamlılığı belirlenen LncRNA'ların eşik değerleri hesaplandı. Bu analize göre MALAT1' in eşik değeri 2.11, CCAT1 in 1.58, HOTAIR'in 1.90, PTENP1'in ki ise -3.02 olarak belirlendi (Şekil 52).



Şekil 52. Normal kolon dokusu ile karşılaştırıldığında erken evre kolon tümörlerinde anlamlı ekspresyon farklılığı gösteren MALAT1 ekspresyonu (A) ve MALAT1'in eşik değeri, CCAT1 ekspresyonu (C) ve CCAT1'in eşik değeri (D), HOTAIR ekspresyonu (E) ve HOTAIR'in eşik değeri (F), PTENP1 ekspresyonu (G) ve PTENP1'in eşik değeri (H)

4.1.3.1 Erken Evre KK'larda LncRNA' ların Tümörün Klinik ve Patolojik Özellikleri Üzerine Etkileri

Erken evre kolon tümörlerinde anlamlılığı belirlenen LncRNA' ların tümör klinopatolojik özellikleri üzerine olası etkilerini araştırmak için MALAT1, CCAT1, HOTAIR ve PTENP1' in eşik değerlerine göre her biri için düşük eksprese ve yüksek eksprese şeklinde iki gruba ayrılarak bu gruplarda cinsiyet, yaş, tümör büyüme paterni, tümör lokalizasyonu, tümör tomurcuklanması ve takip süresi içerisinde ki sistemik nüks durumu incelendi.

CCAT1 ve HOTAIR' in herhangi bir klinopatholojik özellik arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 22).

Tümör tomurcuklanması saptanan 48 vakanın 42' sinde (%87.5) MALAT1 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (Tablo 22).

Tablo 22. LncRNA' ların hasta demografik, klinik ve patolojik özellikleri üzerine etkileri.

Özellikler	LncRNA' ların ekspresyon profilleri							
	MALAT1		CCAT1		HOTAIR		PTENP1	
	Yüksek (n=73)	Düşük (n=53)	Yüksek (n= 73)	Düşük (n= 53)	Yüksek (n= 70)	Düşük (n=56)	Yüksek (n= 44)	Düşük (n= 82)
Cinsiyet								
Erkek	31 (54.4)	26 (45.6)	32 (56.1)	25 (43.9)	26 (45.6)	31 (54.4)	32 (56.1)	25 (43.9)
Kadın	37 (53.6)	32 (46.4)	30 (43.5)	39 (56.5)	41 (59.4)	28 (40.6)	38 (55.1)	31 (44.9)
T1	8 (66.7)	4 (33.3)	7 (58.3)	5 (41.7)	5 (41.7)	7 (58.3)	5 (41.7)	7 (58.3)
	18 (50.0)	18 (50.0)	19 (52.8)	17 (47.2)	22 (61.1)	14 (38.9)	10 (27.8)	26 (72.2)
T2								
T3	47 (60.3)	31 (39.7)	47 (60.3)	31 (39.7)	43 (55.1)	35 (44.9)	29 (37.2)	49 (62.8)
Tümör Tomurcuklanması								
Var	42 (87.5)	6 (12.5)	26 (54.2)	22 (45.8)	28 (58.3)	20 (41.7)	10 (20.8)	38 (79.2)
Yok	31 (39.7)	47 (60.3)	47 (60.3)	31 (39.7)	42 (53.8)	36 (46.2)	34 (43.6)	44 (56.4)

Kategorik değişkenler ki-kare testi ile analiz edildi. * 0.05' ten küçük olan p değerleri anlamlı kabul edilerek kalın ve italik ifade edildi.

4.1.3.2. Erken Evre KK'larda LncRNA'ların Tümör Biyolojisi Üzerine Etkileri

Erken evre kolon tümörlerinde anlamlılığı belirlenen LncRNA'ların tümör biyolojisi üzerine olası etkilerini değerlendirmek için, 126 tümör doku, MALAT1, CCAT1, HOTAIR ve PTENP1'in eşik değerlerine göre her biri için düşük eksprese ve yüksek eksprese şeklinde iki gruba ayrıldıktan sonra bu gruplarda *MACC1*, *NM-23H1* ve MSI durumu ki-kare testi ile incelendi. MSI durumu ile herhangi bir LncRNA arasında istatistiksel bir anlamlılık saptanmadı ($p > 0.05$) . CCAT1 ve HOTAIR ekspresyon düzensizlikleri ile *MACC1* ve *NM23-H1* ekspresyonları arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmedi ($p > 0.05$). *MACC1* ekspresyonu yüksek olan 96 tümörde, *MACC1* ekspresyonu düşük olan 30 tümöre göre MALAT1 2.3 kat daha yüksek, PTENP1 ise 2.0 kat daha düşük olduğu tespit edildi ($p = 0.001$, $p = 0.015$; sırasıyla). Ayrıca MALAT1 ekspresyonu *NM23-H1* ekspresyonu düşük tümörlerde 1.9 kat anlamlı artış gösterdi ($p = 0.012$) (Tablo 23).

Tablo 23.LncRNA'ların erken evre kolon tümörlerinin biyolojik özellikleriile ilişkisi

Özellikler	LncRNA' ların ekspresyon profilleri							
	MALAT1		CCAT1		HOTAIR		PTENP1	
	Yüksek (n=73)	Düşük (n=53)	Yüksek (n= 73)	Düşük (n= 53)	Yüksek (n= 70)	Düşük (n=56)	Yüksek (n= 44)	Düşük (n= 82)
MSI durumu								
MSS	62 (57.4)	46 (42.6)	61 (56.5)	47 (43.5)	61 (56.5)	47 (43.5)	38 (35.2)	70 (64.8)
MSI-L	3 (33.3)	6 (66.7)	6 (66.7)	3 (33.3)	4 (44.40)	5 (55.6)	3 (33.3)	6 (66.7)
MSI-H	8 (88.9)	1 (11.1)	6 (66.7)	3 (33.3)	5 (55.6)	4 (44.4)	3 (33.3)	6 (66.7)
MACC1								
Yüksek	68 (70.8)	28 (29.2)	60 (62.5)	36 (37.5)	54 (56.3)	42 (43.8)	28 (29.2)	68 (70.8)
Düşük	5 (16.7)	25 (83.3)	13 (43.3)	17 (56.7)	16 (53.3)	14 (46.7)	16 (53.3)	14 (46.7)
NM-23H1								
Yüksek	24 (45.3)	29 (54.7)	37 (69.8)	16 (30.2)	38 (71.7)	15 (28.3)	16 (30.2)	37 (69.8)
Düşük	49 (67.1)	24 (32.9)	36 (49.3)	37 (50.7)	32 (43.8)	41 (56.2)	28 (38.4)	45 (61.6)

Tablo 23.LncRNA'ların erken evre kolon tümörlerinin biyolojik özellikleriile ilişkisi

Özellikler	LncRNA' ların ekspresyon profilleri							
	MALAT1		CCAT1		HOTAIR		PTENP1	
	Yüksek (n=73)	Düşük (n=53)	Yüksek (n= 73)	Düşük (n= 53)	Yüksek (n= 70)	Düşük (n=56)	Yüksek (n= 44)	Düşük (n= 82)
MSI durumu								
MSS	62 (57.4)	46 (42.6)	61 (56.5)	47 (43.5)	61 (56.5)	47 (43.5)	38 (35.2)	70 (64.8)
MSI-L	3 (33.3)	6 (66.7)	6 (66.7)	3 (33.3)	4 (44.40)	5 (55.6)	3 (33.3)	6 (66.7)
MSI-H	8 (88.9)	1 (11.1)	6 (66.7)	3 (33.3)	5 (55.6)	4 (44.4)	3 (33.3)	6 (66.7)
MACC1								
Yüksek	68 (70.8)	28 (29.2)	60 (62.5)	36 (37.5)	54 (56.3)	42 (43.8)	28 (29.2)	68 (70.8)
Düşük	5 (16.7)	25 (83.3)	13 (43.3)	17 (56.7)	16 (53.3)	14 (46.7)	16 (53.3)	14 (46.7)
NM-23H1								
Yüksek	24 (45.3)	29 (54.7)	37 (69.8)	16 (30.2)	38 (71.7)	15 (28.3)	16 (30.2)	37 (69.8)
Düşük	49 (67.1)	24 (32.9)	36 (49.3)	37 (50.7)	32 (43.8)	41 (56.2)	28 (38.4)	45 (61.6)

Kategorik değişkenler ki-kare testi ile analiz edildi. * 0.05' ten küçük olan p değerleri anlamlı kabul edilerek kalın ve italik ifade edildi.

4.1.3.3. Erken Evre KK'larda LncRNA'ların EMT ile İlişkisi

Erken evre kolon tümörlerinde anlamlılığı belirlenen LncRNA'ların EMT mekanizması ile ilişkisini incelemek için, 126 tümör doku, LncRNA'ların eşik değerlerine göre her biri için düşük eksprese ve yüksek eksprese şeklinde iki gruba ayrıldıktan sonra bu gruplarda EMT belirteçlerinin ekspresyon profilleri ki-kare testi analiz edildi. MALAT1 ekspresyonu yüksek *Vimentin* ekspresyonuna sahip tümör dokularında 1.9 kat, yüksek *Snail* ekspresyonuna sahip tümör dokularda 2.1 kat ve yüksek *Slug* ekspresyonuna sahip tümör dokularda ise 2.0 kat anlamlı artış gösterirken, düşük *E-kaderin* ekspresyonu sahip tümör dokularda ise 1.8 kat istatistiksel olarak anlamlı azalış belirlendi (sırasıyla p= 0.008, p= 0.001, p= 0.024, p= 0.001,).

CCAT1 ekspresyonu yüksek *MMP-9* ekspresyonuna sahip tümör dokularda, düşük *MMP-9* ekspresyonuna sahip tümör dokulara göre 2.0 kat istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi (p= 0.001).

HOTAIR ekspresyonu, yüksek *Snail* ekspresyonuna sahip tümörlerde 2.1 kat, yüksek *Slug* ekspresyonuna sahip tümörlerde 1.9 kat, yüksek *MMP-9* ekspresyonuna sahip tümörlerde ise 1.8 kat istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (p= 0.003, p= 0.015, p= 0.032; sırasıyla).

PTENP1 ekspresyonu, düşük *E-kaderin* ekspresyonuna sahip tümörlerde yüksek *E-kaderin* ekspresyonuna sahip tümörlerde ise 2.0 kat, yüksek *N-kaderin* ekspresyonuna sahip 56 tümörde düşük *N-kaderin* ekspresyonuna sahip 71 bireye göre 2.2 kat daha az eksprese edildiği belirlendi (sırasıyla p= 0.032, p= 0.037) (Tablo 24).

Tablo 24. LncRNA'ların EMT ile ilişkisi

EMT belirteçlerinin ekspresyon profilleri	LncRNA' ların ekspresyon profilleri											
	MALAT1			CCAT1			HOTAIR			PTENP1		
	Yüksek (n=73)	Düşük (n=53)	P	Yüksek (n=73)	Düşük (n=53)	P	Yüksek (n=70)	Düşük (n=56)	P	Yüksek (n=44)	Düşük (n=82)	P
Vimentin			***0.008***			0.096			0.202			0.228
Yüksek	37 (48.7)	39 (51.3)		40 (52.6)	36 (47.4)		45 (59.2)	31 (40.8)		29 (38.2)	47 (61.8)	
Düşük	38 (72.0)	14 (28.0)		33 (66.0)	17 (34.0)		25 (50.0)	25 (50.0)		15 (30.0)	35 (70.0)	
E-Cadherin			***0.001***			0.142			0.111			***0.032***
Yüksek	15 (26.8)	41 (73.2)		29 (51.8)	27 (48.2)		35 (62.5)	21 (37.5)		25 (44.6)	31 (55.4)	
Düşük	58 (82.9)	12 (17.1)		44 (62.9)	26 (37.1)		35 (50.0)	35 (50.0)		19 (27.1)	51 (72.9)	
N-Cadherin			0.276			0.195			0.492			***0.037***
Yüksek	34 (61.8)	21 (38.2)		29 (52.7)	26 (47.3)		30 (54.5)	25 (45.5)		14 (25.5)	41 (74.5)	
Düşük	39 (54.9)	32 (45.1)		44 (62.0)	27 (38.0)		40 (56.3)	31 (43.7)		30 (42.3)	41 (57.7)	
Twist			0.290			0.568			0.255			0.165
Yüksek	42 (60.9)	27 (39.1)		40 (58.0)	29 (42.0)		36 (52.2)	33 (47.8)		21 (30.4)	48 (69.6)	
Düşük	31 (54.4)	26 (45.6)		33 (57.9)	24 (42.1)		34 (59.6)	23 (40.7)		23 (40.4)	34 (59.6)	
Snail			***0.001***			0.228			***0.003***			0.220
Yüksek	26 (37.1)	44 (62.9)		38 (54.3)	32 (45.7)		47 (67.1)	23 (32.9)		27 (38.6)	43 (61.4)	
Düşük	47 (83.9)	9 (16.1)		35 (62.5)	21 (37.5)		23 (41.1)	33 (58.9)		17 (30.4)	39 (69.6)	
Slug			***0.024***			0.534			***0.015***			0.159
Yüksek	48 (52.2)	44 (47.8)		53 (57.6)	39 (42.4)		57 (62.0)	35 (38.0)		35 (38.9)	57 (62.0)	
Düşük	25 (73.5)	9 (26.5)		20 (58.8)	14 (41.2)		13 (38.2)	21 (61.8)		9 (26.5)	25 (73.5)	
MMP-9			0.143			***0.001***			***0.032***			0.569
Yüksek	43 (53.8)	37 (46.3)		62 (77.5)	18 (22.5)		39 (48.8)	41 (51.2)		28 (35.0)	52 (65.0)	
Düşük	30 (65.2)	16 (34.8)		11 (23.9)	35 (76.1)		31 (67.4)	15 (32.6)		16 (34.8)	30 (65.2)	

4.1.4. Erken Evre KK'larda Prognozu Etkileyen Faktörler

En az 5 yıl takibi olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Ortalama takip süresi 78 ay olarak belirlendi (60-132 ay). Takip süresi içerisinde 21 hastada karaciğer lokalizasyonlu uzak organ metastaz gelişimi gözlendi.

Erken evre kolon tümörlerinde sistemik nüks gelişimine etki eden faktörlerin belirlenebilmesi için 126 tümör takip süresi içerisinde nüks gelişimi durumlarına göre; sistemik nüks (+) ve sistemik nüks (-) şeklinde iki gruba ayrıldı. Bu iki grupta ilk olarak yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, tümör evresi ve tomurcuklanma gibi klinik ve patolojik parametreler incelendi.

Erken evre kolon tümörlerinde yaş, cinsiyet, tümör evresi ve tümör lokalizasyonu gibi parametrelerin nüks oluşumu ile istatistiksel olarak anlamlılıkları saptanmadı ($p > 0.05$). Takip süresi içerisinde nüks gelişimi belirlenen 21 erken evre kolon tümörünün 19'unda tümör tomurcuklanması varlığı tespit edilerek, tümör tomurcuklanması ve nüks gelişimi arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık belirlendi ($p = 0.048$, Tablo 25).

Tablo 25. Klinik ve patolojik özelliklerin sistemik nüks oluşumu üzerine etkileri.

Özellikler	**Nüks (-)** n= 105 (%)	**Nüks (+)** n= 21 (%)	***P Değeri**
Yaş			0.312
40-59	45 (80.4)	11 (19.4)	
59-60	60 (85.7)	10 (14.3)	
Cinsiyet			0.267
Erkek	57 (82.6)	12 (17.4)	
Kadın	46 (60.8)	9 (39.2)	
Tümör Lokalizasyonu			
Sağ Kolon	48 (78.6)	13 (21.4)	0.061
Sol Kolon	57 (87.7)	8 (12.3)	
T Evresi			0.161
T1	8 (72.7)	3 (27.3)	
T2	27 (75.0)	9 (25.0)	
T3	70 (88.6)	9 (11.4)	
Tümör Tomurcuklanması			***0.048***
Var	29 (60.4)	19 (39.6)	
Yok	76 (97.4)	2 (2.60)	

Kategorik değişkenler ki-kare testi ile analiz edildi. * 0.05' ten küçük olan p değerleri kalın ve italik ifade edildi.

Metastaz ile ilişkili genlerden *MACC1* ve *NM-23H1'*in ve EMT sürecinin erken evre kolon tümörlerinde nüks gelişimine olası etkilerini değerlendirmek için, nüks gelişimi belirlenen 21 tümör, nüks gelişim gözlenmeyen 105 tümör ile karşılaştırılarak, ilgili genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon profilleri incelendi.

Takip süresi içerisinde nüks gelişimi belirlenen 21 erken evre kolon tümöründe *MACC1* ekspresyonu 6.76 kat yüksek, *NM23-H1* ekspresyonu ise 2.72 kat düşük bulundu. Bu iki genin mRNA düzeyindeki ekspresyonları sistemik nüks oluşumu ile istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi (sırasıyla p= 0.034, p= 0.044, Tablo 26).

Tablo 26. MACC1 ve Nm-23H1' in nüks üzerine etkileri.

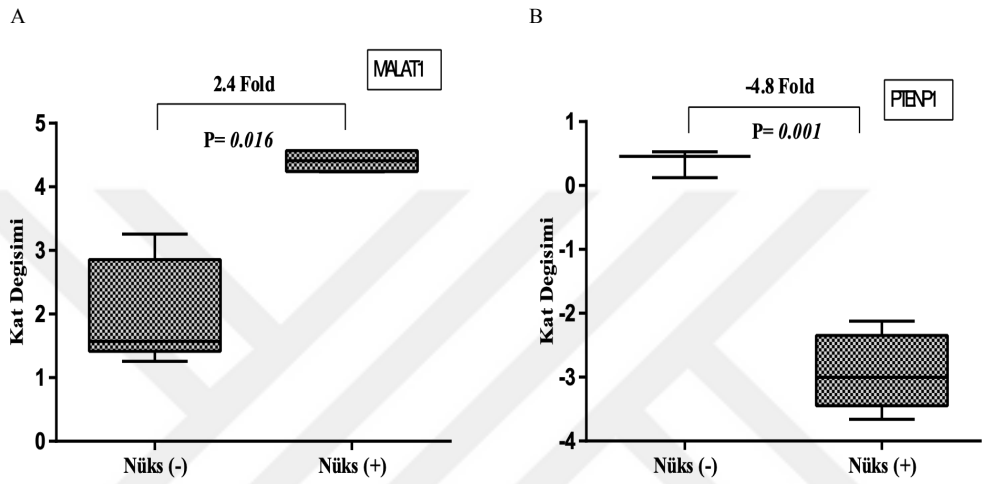
mRNA ekspresyonları	Sistemik nüks (-) (n= 105)		Sistemik nüks (+) (n= 21)		(-)/(+)	
	n (%)	2^(-Avg.(Delta(Ct))	n (%)	2^(-Avg.(Delta(Ct))	Kat Değişimi	*P Value
MACC1		0.025		0.169	6,76	***0.034***
Yüksek	77 (80.2)		19 (19.8)			
Düşük	28 (93.3)		2 (6.70)			
NM-23H1		0.071		0.032	-2,72	***0.044***
Yüksek	45 (84.9)		8 (15.1)			
Düşük	60 (82.2)		13 (17.8)			

Sonuçlar RT2 profiler PCR array data analysis programından Bağımsız T Testi ile değerlendirildi. * 0.05' ten küçük p değeri kalın ve italik ifade edildi.

Takip süresi içerisinde nüks gelişimi belirlenen 21 erken evre kolon tümöründe EMT belirteçlerinde, nüks gözlenmeyen tümör dokuları ile karşılaştırıldığında, *N-kaderin* (1.26 kat, p= 0.131), *Vimentin* (1.34 kat, p= 0.463), *Twist* (1.43 kat, p= 0.071), *Slug* (1.81 kat, p= 0.319), *ZEB1* (1.43 kat, P= 0.082) ve *MMP-9'* un (1.79 kat, p= 0.335) mRNA'larının ekspresyon profillerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmadı.

E-kaderin ekspresyonu nüks gelişim gözlenen 21 tümör dokuda, nüks gelişimi gözlenmeyen tümör dokularına göre 3.56 kat istatistiksel olarak anlamlı azalış, *Snail* ekspresyonu ise 21 tümör dokuda 2.81 kat istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (sırasıyla p= 0.006, p= 0.002, Tablo 26).

Takip süresi içerisinde nüks gelişimi belirlenen 21 erken evre kolon tümöründe, normal kolon dokusu ile karşılaştırılarak erken evre kolon tümörlerinde anlamlılığı belirlenen LncRNA'lardan MALAT1, CCAT1, HOTAIR ve PTENP1'in ekspresyon profilleri incelendi. Takip süresi içerisinde sistemik nüks gözlenmeyen 105 vaka ile nüks gözlenen 21 vaka karşılaştırıldığında MALAT1 ekspresyonunun 2.4 kat yüksek, PTENP1 ekspresyonu ise 4.8 kat düşük olduğu belirlendi (sırasıyla p= 0.016, p= 0.001, Şekil 53).



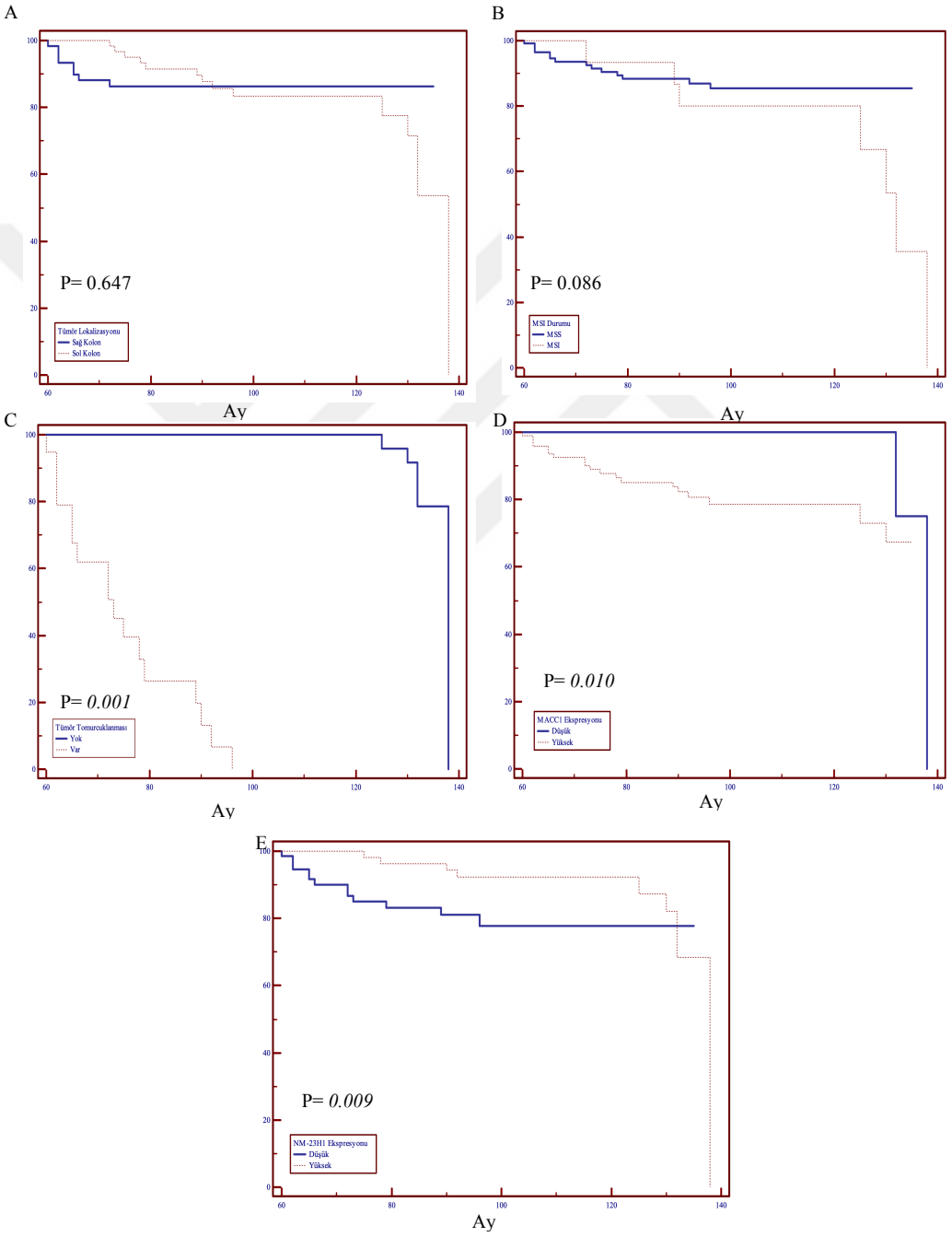
Şekil 53. Takip süresi içerisinde nüks gelişimi belirlenen erken evre kolon tümörlerinde MALAT1 (A) ve PTENP1'in (B) ekspresyon profilleri.

4.1.4.1. Erken Evre KK'larda Hastalıksız Sağ Kalım Süresini Etkileyen Faktörler

126 erken evre kolon tümöründe, takip süresi içerisinde, en erken 60., en geç ise 138. ayda sistemik nüks gelişimi gözlemlendi. Ortalama nüks etme süresi 8.3 yıl (5-11 yıl) olarak belirlendi.

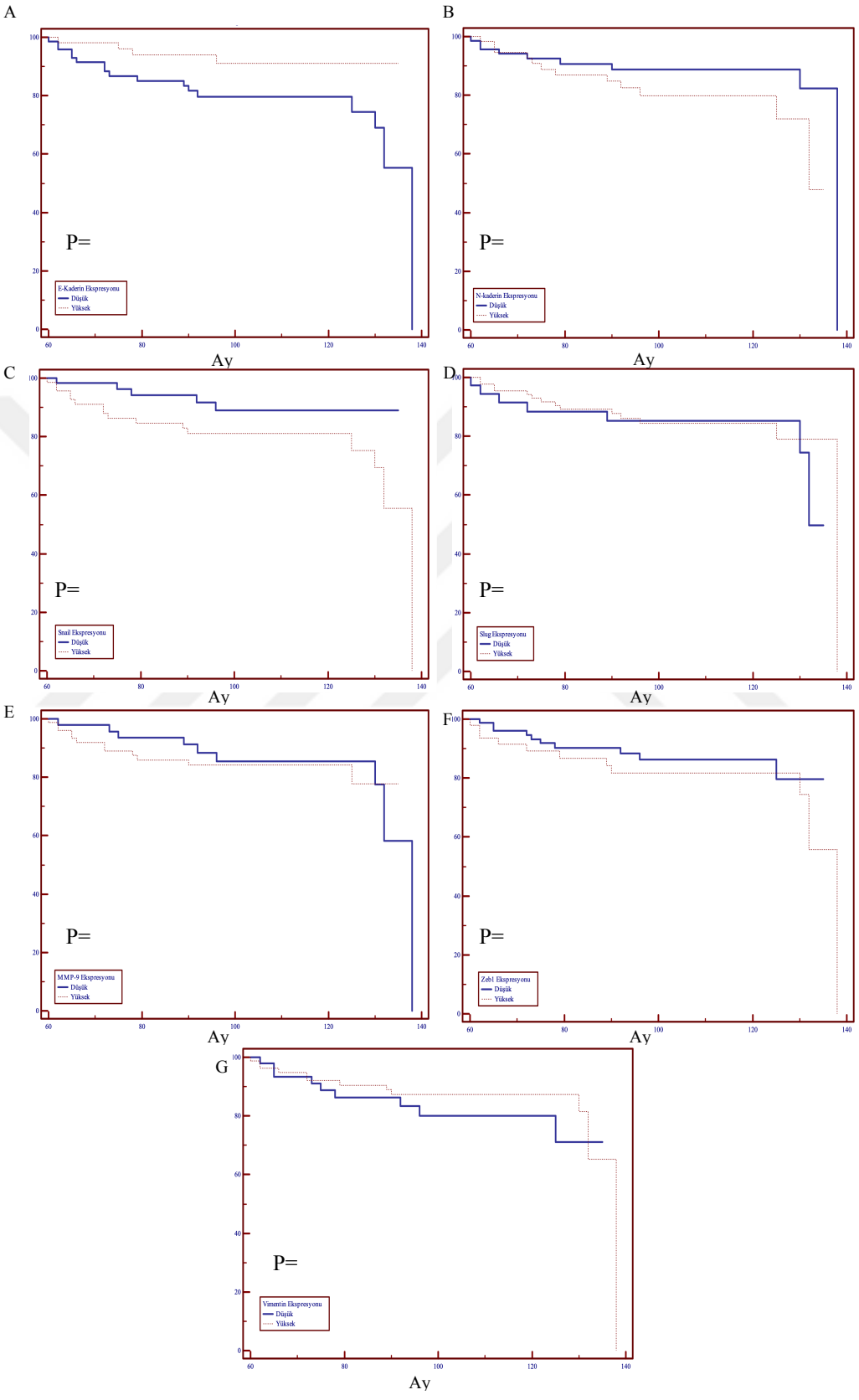
KK'larla ilgili gerçekleştirilen birçok çalışmada tümör lokalizasyonunun, tümör tomurcuklanmasının ve MSI durumunun hastalıksız sağ kalımı kısalttığı belirtebilmektedir. Bu nedenle ilk olarak 126 erken evre kolon tümöründe bu parametrelerin ve bir önceki 100 vaka ile gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda anlamlılığı belirlenen *MACC1* ve *NM23-H1*'in hastalıksız sağ kalım süresi üzerine etkileri Kaplan Meier testi ile analiz edildi.

Kötü prognostik özellikleri bulunmayan erken evre kolon tümörlerinde tümör lokalizasyonunun ve MSI durumunun hastalıksız sağ kalım süresi ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi saptanmadı (sırasıyla p= 0.647, p= 0.086). Tümör tomurcuklanmasının varlığı, yüksek *MACC1* ekspresyonu ve düşük *NM-23H1* ekspresyonu kısa hastalıksız sağ kalım süresi ile istatistiksel anlamlılık gösterdi (sırasıyla p= 0.001, p= 0.010, p= 0.009, Şekil 54).



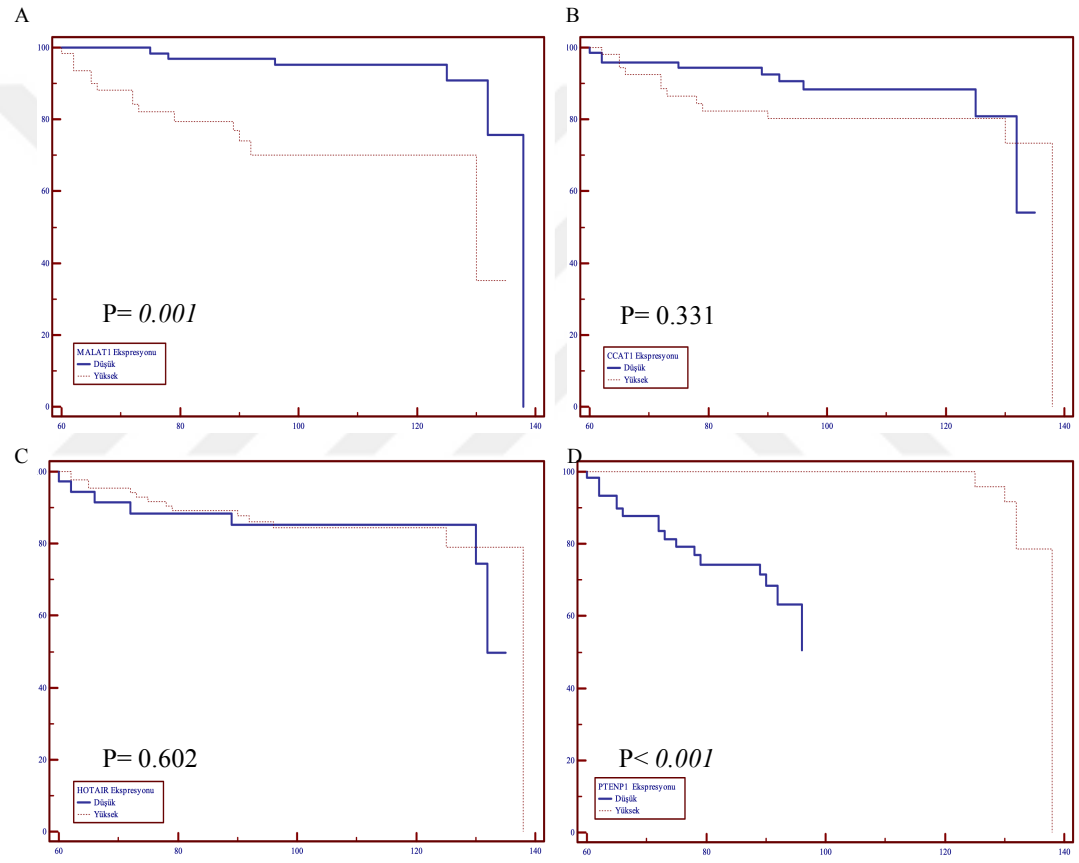
Şekil 54. Tümör lokalizasyonunun (A), MSI durumunun (B), Tümör tomurcuklanmasın (C), *MACC1* ekspresyonunun (D) ve *NM-23H1* ekspresyonunun (E) hastalıksız yaşam süresi üzerine etkileri.

EMT belirteçlerinden sadece *E-kaderin'in* düşük ekspresyonu kısa hastalıksız sağ kalım ile istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi (p= 0.033, Şekil 55).



Şekil 55. EMT belirteçlerinin *E-kaderin* (A), *N-kaderin* (B), *Snail* (C), *Slug* (D), *MMP-9* (E), *Zeb1* (F), *Vimentin* (G) ekspresyonunun hastalıksız sağ kalım süresi üzerine etkileri.

Normal kolon dokusu ile karşılaştırıldığında erken evre kolon tümörlerinde anlamlılığı belirlenen LncRNA'lardan MALAT1, CCAT1, HOTAIR ve PTENP1'in ekspresyon profillerinin hastalıksız sağ kalım üzerine etkileri incelendiğinde yüksek MALAT1 ekspresyonu ve düşük PTENP1 ekspresyonu kısa hastalıksız sağ kalım süresi ile istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir (sırasıyla p= 0.001, p< 0.001, Şekil 56).



Şekil 56. MALAT1 (A), CCAT1 (B), HOTAIR (C), PTENP1 (D) ekspresyonunun hastalıksız sağ kalım süresi üzerine etkileri.

4.1.4.12 Erken Evre KK'larda Prognozu Etkileyen Faktörlerin Çok Değişkenli Modelleme ile Gösterilmesi

Erken evre kolon tümörlerinde *MACC1*, *NM23-H1*, MALAT1 ve PTENP1'in prognozu belirlemede bağımsız faktör olma durumlarını tespit etmek için çok değişkenli regresyon modelleri analiz edildi. Tümör tomurcuklanmasının,

yüksek MALAT1, *MACC1* ve düşük *NM-23H1* ve PTENP1 ekspresyonlarının erken evre kolon tümörlerinde bağımsız birer prognositk belirteç oldukları tespit edildi ($p< 0.05$, Tablo 27 ve Tablo 28).

Tablo 27. Erken evre kolon tümörlerinde genel sağkalımı etkileyen faktörlerin çok değişkenli regresyon modeli ile gösterilmesi

Özellikler	SE	Sig.	Exp(B)	95,0% CI for Exp(B)	
				Lower	Upper
MSI durumu	0,359	0,111	0,288	0,143	0,582
Tümör tomurcuklanması	0,375	0,030	1,763	0,846	3,674
Tümör lokalizasyonu	0,376	0,116	2,463	1,179	5,144
Tümör evresi	-	0,115	-	-	-
Macc1	0,373	0,000	0,814	0,002	1,689
Nm-23H1	0,344	0,005	0,902	0,046	1,771
Vimentin	0,429	0,157	0,544	0,235	1,263
E-kaderin	0,802	0,295	0,431	0,059	2,078
N-Kaderin	0,458	0,857	0,921	0,375	2,258
Snail	0,863	0,216	0,344	0,063	1,865
Slug	0,842	0,656	1,456	0,279	7,582
Zeb1	0,49	0,445	1,453	0,556	3,794
Twist	0,463	0,203	1,283	0.398	3.494
Mmp9	0,516	0,755	1,175	0,427	3,231
Malat1	0,315	0,014	0,57	0,008	1,056
Hotair	0,78	0,905	1,098	0,238	5,062
CCAT1	0,326	0,952	0,98	0,517	1,858
PTENP1	0,766	0,001	5,688	0,189	7,862

Tablo 28. Nüks eden erken evre kolon tümörlerinde çok değişkenli regresyon analizi ile prognostik belirteçlerin belirlenmesi.

Özellikler	SE	Sig.	Exp(B)	95,0% CI for Exp(B)	
				Lower	Upper
NM-23H1	0,255	0,011	1,11	0,674	1,828
MACC1	0,252	0,003	0,933	0,569	1,529
Tümör tomurcuklanması	0,302	0,019	1,232	0,681	2,228
PTENP1	0,753	0.000	59,476	13,599	260,122
MALAT1	0,278	0,047	0,612	0,355	1,055

4.2. HT-29FUR Hücrelerinin Oluşturulması

Sistemik nüks potansiyeli saptanan hastalarda adjuvan tedavinin önerilmesi durumunda gelişebilecek ilaç direncini belirlemek için HT-29 hücre hatlarına altı ay boyunca düzenli olarak 5FU uygulanarak, 5FU'ya dirençli HT-29FUR hücreleri elde edilmesi hedeflendi.

4.2.1. HT-29'da 5FU' nun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Literatürde 5FU'nun HT-29 hücreleri üzerindeki etkinliği 48-72 saatleri arasında olduğu belirtilmiştir. HT-29 hücrelerin %50' den fazlasını öldüren 5FU dozu ise çalışmalarda farklılık göstermektedir. 5FU'nun 2. pasaj HT-29 hücrelerinde etkili olduğu dozları belirlemek için literatürdeki çalışmalar temel alınarak Tablo 29'da ifade edilen $5x10^{-3}$ µg/ml ve $1x10^{2}$ µg/ml arasında 30 farklı 5FU dozu, HT-29 hücreleri ile muamele edildi. Daha sonra hem doza hem de zamana bağlı olarak hücre proliferasyon testi WST-1 ile analizler gerçekleştirildi.

Tablo 29. HT-29 hücrelerine uygulanan 5FU dozları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kontrol	Kontrol	Kontrol	$1x10^{-3}$ µg/ml	$1x10^{-3}$ µg/ml	$1x10^{-3}$ µg/ml	$1x10^{-2}$ µg/ml	$1x10^{-2}$ µg/ml	$1x10^{-2}$ µg/ml	$1x10^{-1}$ µg/ml	$1x10^{-1}$ µg/ml	$1x10^{-1}$ µg/ml
B	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
C	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	150 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml	250 µg/ml	250 µg/ml
D	300 µg/ml	300 µg/ml	300 µg/ml	350 µg/ml	350 µg/ml	350 µg/ml	400 µg/ml	400 µg/ml	400 µg/ml	450 µg/ml	450 µg/ml	450 µg/ml
E	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	DMSO	DMSO	DMSO						

WST-1 analizine göre HT-29 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat 5FU ile muamelesinden sonra hücre canlılığı değerlendirildi. 5FU' nun HT-29 hücreleri üzerine etkili saati 72 saat olarak belirlendi. 5FU' nun 72. saatteki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, 1 µg/ml 5FU ile muamele edilen HT-29 hücrelerindeki canlılık oranı %78.1 olarak, 5 µg/ml 5FU ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde ise canlılık oranı %49.7 olarak belirlendi ($p<0.0001$) (Tablo 30, Tablo 31, Tablo 32). HT-29 hücrelerindeki 5FU'nun etkisi Şekil 57'de ifade edildi.

Tablo 30. 5FU' nun 24 saat sonunda HT-29 hücrelerine etkisi

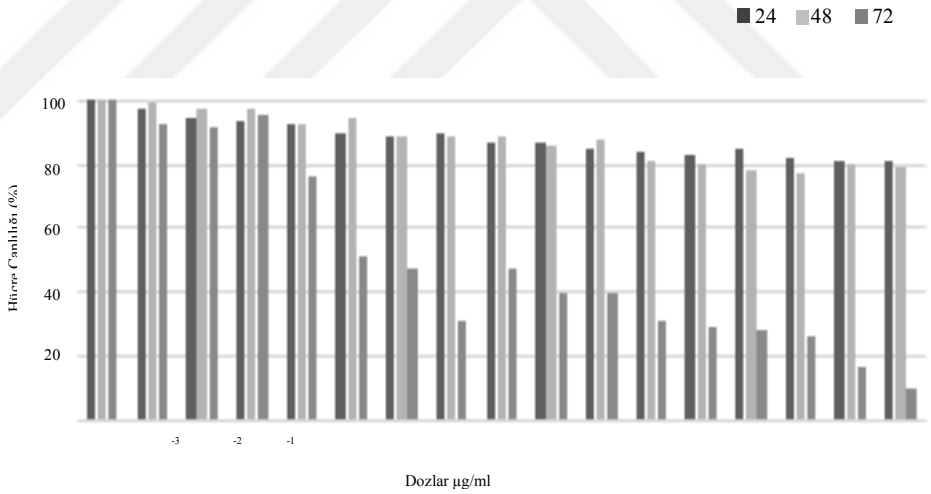
24	**Kontrol**	**1x10^{-3}** µg/ml	**1x10^{-2}** µg/ml	**1x10^{-1}** µg/ml	**1** µg/ml	**5** µg/ml	**10** µg/ml	**50** µg/ml	**100** µg/ml	**150** µg/ml	**200** µg/ml	**250** µg/ml	**300** µg/ml	**350** µg/ml	**400** µg/ml	**450** µg/ml	**500** µg/ml
OD	0,508	0,508	0,431	0,491	0,507	0,493	0,483	0,485	0,446	0,478	0,465	0,445	0,453	0,465	0,443	0,402	0,435
	0,592	0,588	0,564	0,494	0,509	0,492	0,485	0,482	0,478	0,475	0,461	0,471	0,462	0,461	0,441	0,481	0,441
	0,538	0,507	0,561	0,544	0,508	0,491	0,491	0,499	0,497	0,472	0,459	0,457	0,449	0,459	0,457	0,449	0,459
OD ort	0,546	0,534	0,518	0,509	0,508	0,492	0,486	0,488	0,473	0,475	0,461	0,457	0,454	0,461	0,447	0,444	0,445
canlılık	100	93,04	78,937	89,927	92,857	90,293	88,461	88,827	81,684	87,545	85,164	81,501	82,967	85,164	81,135	73,626	79,67
	100	107,6927	103,296	90,476	93,223	90,109	88,827	88,278	87,545	86,996	84,432	86,266	84,612	84,432	80,769	88,095	80,769
	100	92,857	102,7477	99,633	93,04	89,926	89,9267	91,391	91,0256	86,445	84,065	83,699	82,234	84,065	83,699	82,234	84,065
canlılık ort	100	97,863	94,9939	93,345	93,04	90,109	89,072	89,499	86,752	86,996	84,555	83,821	83,272	84,554	81,868	81,318	81,501

Tablo 31. 5FU' nun 48 saat sonunda HT-29 hücrelerine etkisi

48	Kontrol	1x10^{-3} µg/ml	1x10^{-2} µg/ml	1x10^{-1} µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml	300 µg/ml	350 µg/ml	400 µg/ml	450 µg/ml	500 µg/ml
OD	0,697	0,678	0,677	0,648	0,636	0,632	0,622	0,617	0,599	0,571	0,527	0,519	0,519	0,512	0,509	0,541	0,542
	0,604	0,691	0,614	0,639	0,504	0,643	0,629	0,615	0,563	0,57	0,602	0,583	0,501	0,518	0,511	0,5	0,502
	0,674	0,6	0,634	0,632	0,682	0,601	0,511	0,52	0,588	0,555	0,612	0,507	0,554	0,511	0,506	0,542	0,51
OD ort	0,658	0,656	0,641	0,639	0,607	0,625	0,587	0,584	0,583	0,565	0,58	0,536	0,524	0,513	0,5086	0,527	0,518
canlılık	100	102,987	102,835	98,43	96,607	96	94,481	93,721	90,9873	86,734	80,05	78,835	78,835	77,772	77,316	82,177	82,329
	100	104,962	93,265	97,063	76,556	97,67	95,544	93,417	85,518	86,582	91,443	88,556	76,101	78,683	77,62	75,949	76,253
	100	91,139	96,303	96	103,594	91,291	77,62	78,987	89,316	84,303	92,962	77,0126	84,151	77,62	76,86	82,329	77,468
canlılık ort	100	99,696	97,468	97,164	92,253	94,987	89,215	88,708	88,607	85,873	88,151	81,4683	79,696	78,025	77,2658	80,151	78,683

Tablo 32. 5FU' nun 72 saat sonunda HT-29 hücrelerine etkisi

72	Kontrol	1x 10^{-3} µg/ml	1x 10^{-2} µg/ml	1x 10^{-1} µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml	300 µg/ml	350 µg/ml	400 µg/ml	450 µg/ml	500 µg/ml
OD	0,744	0,622	0,6	0,578	0,517	0,332	0,212	0,21	0,102	0,194	0,164	0,102	0,192	0,183	0,181	0,103	0,093
	0,746	0,601	0,604	0,539	0,521	0,311	0,101	0,205	0.278	0,195	0,163	0,191	0,192	0,173	0,172	0,104	0,072
	0,761	0,609	0,604	0,632	0,504	0,339	0,309	0,202	0,312	0,261	0,263	0,201	0,188	0,184	0,173	0,111	0,061
OD ort	0,75	0,611	0,603	0,583	0,514	0,327	0,207	0,206	0,207	0,217	0,197	0,165	0,191	0,18	0,175	0,106	0,075
canlılık	100	94,481	91,139	87,797	78,532	50,43	32,203	31,899	15,494	29,468	24,911	15,494	29,165	27,797	27,494	15,646	14,127
	100	91,291	91,747	81,873	79,139	47,241	15,342	31,139	36,746	29,62	24,759	29,013	29,165	26,278	26,127	15,797	10,937
	100	92,506	91,747	96	76,557	51,494	46,937	30,684	47,392	39,646	39,949	30,532	28,557	27,949	26,278	16,861	9,266
canlılık ort	100	92,759	91,544	88,557	78,076	49,722	31,494	31,241	31,443	32,911	29,873	25,013	28,962	27,342	26,633	16,101	11,443



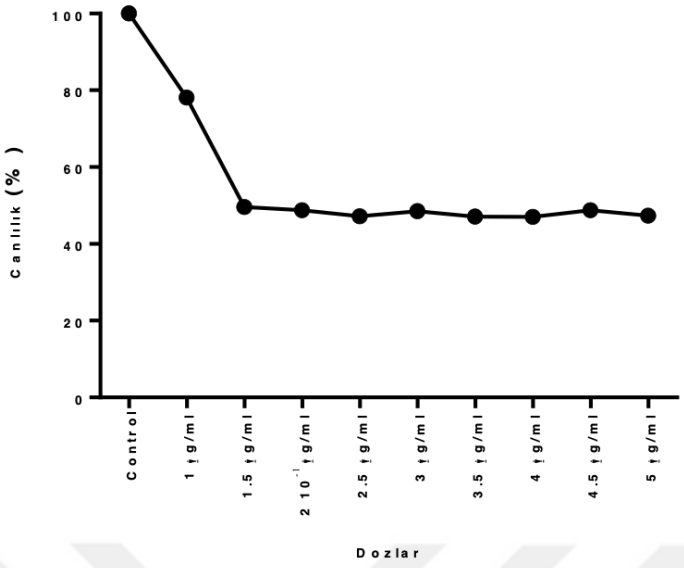
Şekil 57 24, 48 ve 72 saatlik 5FU ile muamelesi sonrasında HT-29 hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları ($p<0.001$, One sample t test

5FU' nun HT-29 hücrelerinde lethal etki gösterdiği dozu belirlemek için Tablo 32'de ifade edilen 1 µg/ml ve 5 µg/ml arasında yedi doz daha belirlenerek bu dozların 72 saat muameleleri sonucu etkileri WST-1 analizi ile incelendi. WST-1 analizine göre HT-29 hücrelerinin 72 saat yedi farklı doz 5FU ile muamelesinden sonra elde edilen değerler Tablo 33'de gösterildi.

5FU’ nun yedi farklı dozunun 72. saatteki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, 1 µg/ml 5FU ile muamele edilen HT-29 hücrelerindeki canlılık oranı %78.1, 1.5 µg/ml 5FU ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde ise canlılık oranı %49.6 olduğu gözlemlendi ($p<0.0001$, Tablo 33). 5FU’nun HT-29 hücrelerindeki lethal etki ettiği doz 1.5 µg/ml olarak belirlendi. HT-29 hücrelerindeki 5FU’ nun lethal etkisi Şekil 58’ de ifade edildi.

Tablo 33. 1 µg/ml ile 5 µg/ml arasında belirlenen 7 farklı 5FU dozunun nun 72 sonunda HT-29 hücreleri üzerine sitotoksk etkisinin WST-1 analizi ile gösterilmesi

72	**Kontrol**	**1** µg/ml	**1.5** µg/ml	**2x10^{-1}** µg/ml	**2.5** µg/ml	**3** µg/ml	**3.5** µg/ml	**4** µg/ml	**4.5** µg/ml	5 µg/ml
OD	0,844	0,523	0,301	0,312	0,332	0,321	0,312	0,376	0,298	0,316
	0,846	0,511	0,308	0,3	0,298	0,308	0,31	0,201	0,294	0,305
	0,768	0,509	0,371	0,351	0,302	0,329	0,309	0,352	0,371	0,314
OD ort	0,819	0,514	0,326	0,321	0,3106	0,319	0,31	0,309	0,321	0,311
canlılık	100	79,443	45,721	47,392	50,430	48,759	47,392	57,11395	45,265	48
	100	77,620	46,784	45,569	45,266	46,785	47,089	30,532	44,658	46,329
	100	77,316	56,354	53,316	45,873	49,975	46,937	53,468	56,354	47,696
canlılık ort	100	78,126	49,620	48,759	47,190	48,506	47,139	47,038	48,759	47,342



Şekil 58 72 saatlik 5FU ile muamelesi sonrasında HT-29 hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları.

WST-1 testi verileri ile literatürdeki çalışmaların birlikte değerlendirilmesi sonucunda HT-29 hücrelerinde, 5FU direnci kazanımı süreci sırasında 72. saatte test edilecek 5 farklı 5FU dozu (0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml) belirlendi.

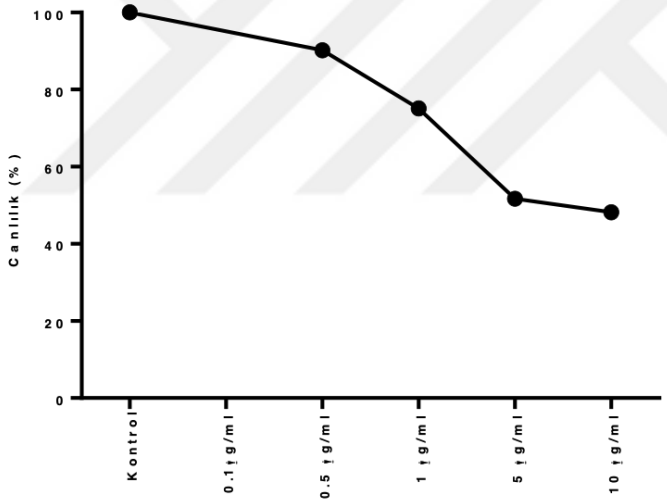
4.2.1.1 5FU' nun Direnç Kazanım Sürecindeki HT-29 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

5FU'ya dirençli HT-29 hücrelerini oluşturmak için hücreler başlangıç dozu olarak belirlenen 0.1 µg/ml 5FU ile 72 saat muamele edilerek hücreler belli aralıklar ile temiz besiyerinde dinlendirildi. Üç hafta süresince bu işleme devam edildi. Üçüncü haftada HT29-F1 olarak isimlendirilen bu hücrelerde WST-1 analizi gerçekleştirildi. WST-1 analizine göre HT-29F1 hücrelerinin 72 saat 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml 5FU ile muamelesinden sonra elde edilen değerler Tablo 34'de gösterildi. 5FU muamele edilmeyen HT-29F1 hücreleri kontrol olarak kullanıldı.

0,1 µg/ml 5FU HT-29 hücrelerinde canlılık oranı %85.56 iken HT-29F1 hücrelerinde canlılık oranı %100.86 olarak belirlendi (Şekil 59). Üç hafta boyunca 0,1 µg/ml 5FU uygulanarak elde edilen HT-29F1 hücrelerinde 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml HT-29 hücrelerine göre sırasıyla 1.13, 1.05, 0.96, 1.04, 1.53 kat olarak belirlendi (Tablo 34).

Tablo 34 5FU' nun 72 sonunda HT-29F1 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile gösterilmesi

72	Kontrol	0,1 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
OD	0,702	0,732	0,509	0,612	0,397	0,302
	0,711	0,651	0,612	0,439	0,321	0,311
	0,76	0,609	0,6598	0,432	0,304	0,339
OD ort	0,724	0,664	0,594	0,494	0,341	0,317
canlılık	100	111,19	77,316	92,962	60,304	45,873
	100	98,886	92,962	66,684	48,759	47,241
	100	92,506	100,223	65,62	46,177	51,494
canlılık ort	100	100,861	90,167	75,089	51,747	48,203



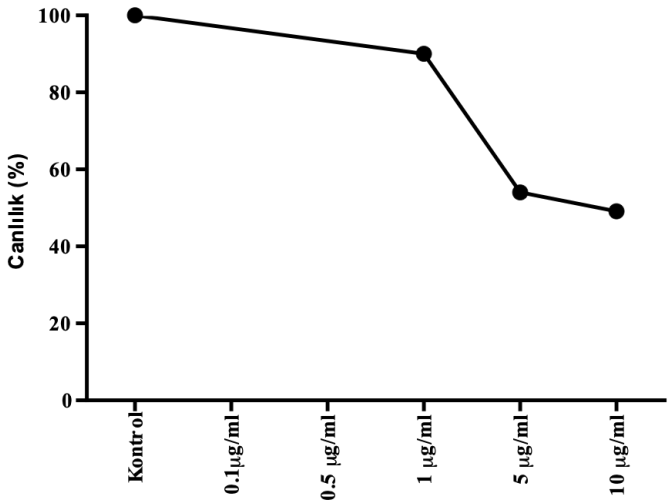
Şekil 59. 72 saatlik 5FU ile muamelesi sonrasında HT-29F1 hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları.

HT-29F1 hücrelerine bir sonraki doz olan 0.5 µg/ml 5FU ile 72 saat muamele edildi. Hücreler daha sonra temiz besiyerinde dinlenmeye bırakıldı. Hücreler bulundukları alanın yaklaşık %80'nini kapladıktan sonra aynı doz ile muamele aşamaları 4 hafta süresince uygulandı. Dördüncü haftada HT29-F2 olarak isimlendirilen bu hücrelerde WST-1 analizi gerçekleştirildi. WST-1 analizine göre HT-29F2 hücrelerinin 72 saat 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml 5FU ile muamelesinden sonra elde edilen değerler Tablo 35'de gösterildi. 5FU muamele edilmeyen HT-29F2 hücreleri kontrol olarak kullanıldı.

0.5 µg/ml 5FU HT-29 hücrelerinde canlılık oranı %85.2 iken HT-29F2 hücrelerinde canlılık oranı %100.10 olarak belirlendi (Şekil 60). Üç hafta 0.1 µg/ml 5FU, daha sonra 1 ay boyunca 0.5 µg/ml 5FU uygulanarak 7 hafta sonunda elde edilen HT-29F2 hücrelerinde direnç 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml HT-29 hücrelerine göre sırasıyla 1.13, 1.16, 1.15, 1.08 ve 1.56 kat olarak belirlendi (Tablo 35).

Tablo 35. 5FU' nun 72 saatlik muamele sonunda HT-29F2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile gösterilmesi

72	**Kontrol**	**0,1 µg/ml**	**0,5 µg/ml**	**1 µg/ml**	**5 µg/ml**	**10 µg/ml**
OD	0,821	0,632	0,512	0,609	0,302	0,298
	0,798	0,651	0,689	0,578	0,354	0,365
	0,752	0,706	0,776	0,592	0,412	0,307
OD ort	0,79	0,663	0,659	0,593	0,356	0,323
canlılık	100	96	77,772	92,506	45,873	45,266
	100	98,886	104,658	87,797	53,772	55,443
	100	107,241	117,873	89,924	62,582	46,633
canlılık ort	100	100,709	100,101	90,076	54,076	49,114



Şekil 60. 72 saatlik 5FU ile muamelesi sonrasında H-29F2 hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları.

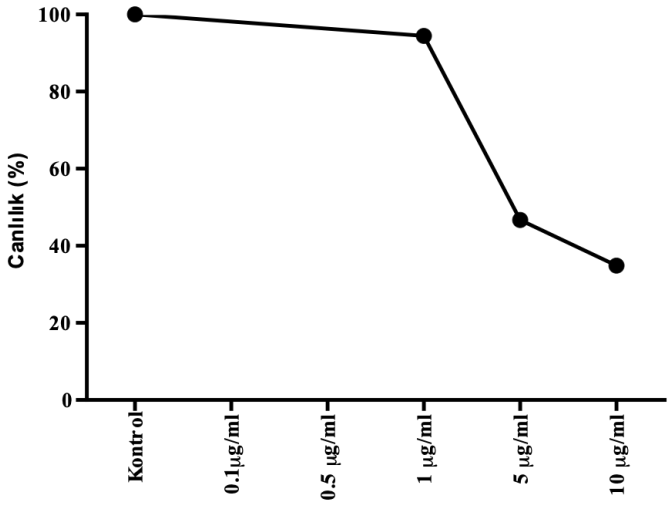
HT-29F2 hücrelerine bir sonraki doz olan 1 µg/ml 5FU ile 72 saat muamele edildi. Hücreler daha sonra temiz besiyerinde dinlenmeye bırakıldı. Hücreler

bulundukları alanın yaklaşık %80'nini kapladıktan sonra aynı doz ile muamele aşamaları 5 hafta süresince uygulandı. Beşinci haftada HT29-F3 olarak isimlendirilen bu hücrelerde WST-1 analizi gerçekleştirildi. WST-1 analizine göre HT-29F3 hücrelerinin 72 saat 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml 5FU ile muamelesinden sonra elde edilen değerler Tablo 36'da gösterildi. 5FU muamele edilmeyen HT-29F3 hücreleri kontrol olarak kullanıldı.

1 µg/ml 5FU HT-29 hücrelerinde canlılık oranı %78.05 iken HT-29F3 hücrelerinde canlılık oranı %94.43 olarak belirlendi (Şekil 61). Üç hafta 0.1 µg/ml 5FU, 4 hafta 0.5 µg/ml 5FU daha sonrasında 5 hafta boyunca 1 µg/ml 5FU uygulanarak 12 hafta sonunda elde edilen HT-29F3 hücrelerinde direnç 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml HT-29 hücrelerine göre sırasıyla 1.2, 1.15, 1.21, 0.93 ve 1.11 kat olarak belirlendi.

Tablo 36. 5FU' nun 72 saatlik muamele sonunda HT-29F2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile gösterilmesi

72	**Kontrol**	**0,1 µg/ml**	**0,5 µg/ml**	**1 µg/ml**	**5 µg/ml**	**10 µg/ml**
OD	0,764	0,712	0,657	0,641	0,306	0,204
	0,725	0,704	0,687	0,599	0,318	0,212
	0,745	0,699	0,654	0,625	0,299	0,273
OD ort	0,745	0,705	0,666	0,622	0,308	0,23
canlılık	100	108,152	99,797	97,367	46,481	30,987
	100	106,937	104,354	90,987	48,304	32,203
	100	106,177	99,342	94,937	45,418	41,468
canlılık ort	100	107,089	101,165	94,43	46,734	34,886



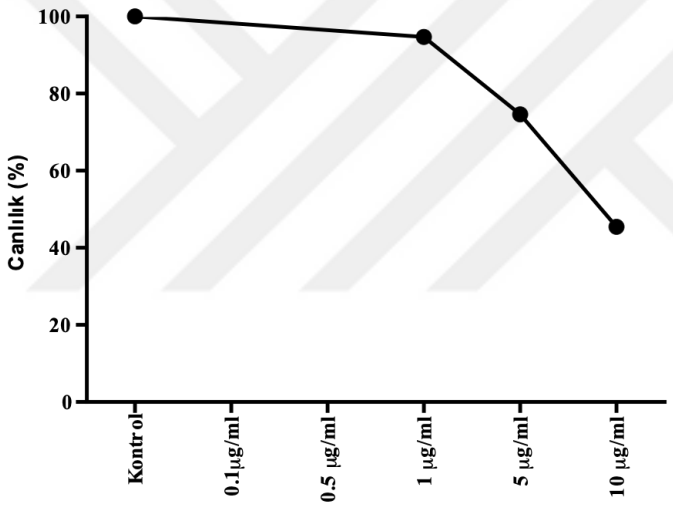
Şekil 61. 72 saatlik 5FU ile muamelesi sonrasında HT-29F3 hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları.

HT-29F3 hücrelerine bir sonraki doz olan 5 µg/ml 5FU ile 72 saat muamele edildi. Hücreler daha sonra temiz besiyerinde dinlenmeye bırakıldı. Hücreler bulundukları alanın yaklaşık %80'nini kapladıktan sonra aynı doz ile muamele aşamaları 6 hafta süresince uygulandı. Altıncı haftada HT29-F4 olarak isimlendirilen bu hücrelerde WST-1 analizi gerçekleştirildi. WST-1 analizine göre HT-29F4 hücrelerinin 72 saat 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml 5FU ile muamelesinden sonra elde edilen değerler Tablo 37'de gösterildi. 5FU muamele edilmeyen HT-29F4 hücreleri kontrol olarak kullanıldı.

5 µg/ml 5FU HT-29 hücrelerinde canlılık oranı %49.72 iken HT-29F4 hücrelerinde canlılık oranı %74.63 olarak belirlendi (Şekil 62).Üç hafta 0.1 µg/ml 5FU, dört hafta 0.5 µg/ml 5FU, 5 hafta 1 µg/ml 5FU, 5 hafta boyunca 5 µg/ml 5FU uygulanarak 17 hafta sonunda elde edilen HT-29F4 hücrelerinde direnç 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml HT-29 hücrelerine göre sırasıyla 1.22, 1.16, 1.21, 1.50 ve 1.51 kat olarak belirlendi (Şekil 62).

Tablo 38. 5FU' nun 72 saatlik muamele sonunda HT-29F3 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile gösterilmesi

72	Kontrol	0,1 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
OD	0,853	0,784	0,612	0,653	0,405	0,227
	0,808	0,663	0,599	0,652	0,487	0,368
	0,814	0,703	0,791	0,564	0,582	0,302
OD ort	0,825	0,717	0,667	0,656	0,491	0,299
canlılık	100	119,089	92,962	99,19	61,519	34,481
	100	100,709	90,987	99,038	73,975	55,899
	100	106,785	120,152	100,861	88,405	45,873
canlılık ort	100	108,861	101,367	94,696	74,633	47,418



Şekil 62. 72 saatlik 5FU ile muamelesi sonrasında HT-29F4 hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları.

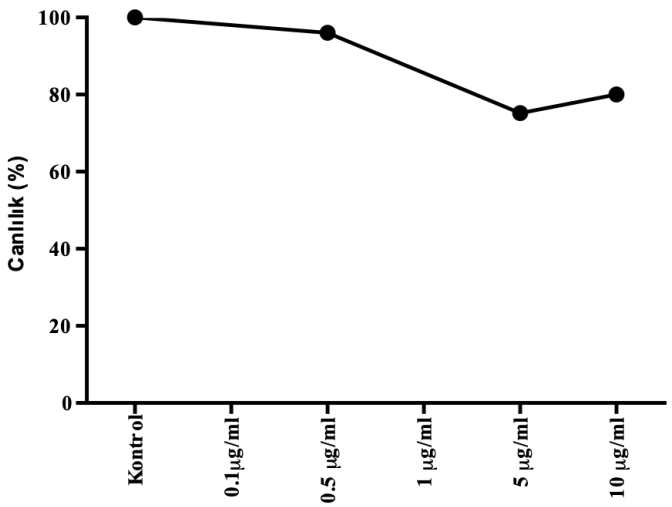
HT-29F4 hücrelerine belirlenen son doz olan 10 µg/ml 5FU ile 72 saat muamele edildi. Hücreler daha sonra temiz besiyerinde dinlenmeye bırakıldı. Hücreler bulundukları alanın yaklaşık %80'nini kapladıktan sonra aynı doz ile muamele aşamaları 6 hafta süresince uygulandı. Altıncı haftada HT29FUR olarak isimlendirilen bu hücrelerde WST-1 analizi gerçekleştirildi. WST-1 analizine göre HT-29FUR hücrelerinin 72 saat 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml 5FU ile muamelesinden sonra elde edilen değerler Tablo 39'da gösterildi. 5FU muamele edilmeyen HT-29F4 hücreleri kontrol olarak kullanıldı. Üç hafta 0.1 µg/ml 5FU, dört

hafta 0.5 µg/ml 5FU, 5 hafta 1 µg/ml 5FU, 5 hafta 5 µg/ml 5FU ve 5 hafta da son doz olan 10 µg/ml uygulanarak toplamda 24 hafta sonunda elde edilen HT-29FUR hücrelerinde direnç 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml HT-29 hücrelerine göre sırasıyla 1.14, 1.18, 1.32, 1.72 ve 2.54 kat istatistiksel olarak anlamlı artış belirlendi (p= 0.001).

10 µg/ml 5FU HT-29 hücrelerinde canlılık oranı %47.12 iken HT-29FUR hücrelerinde canlılık oranı %80.05 olarak belirlendi (Şekil 64)

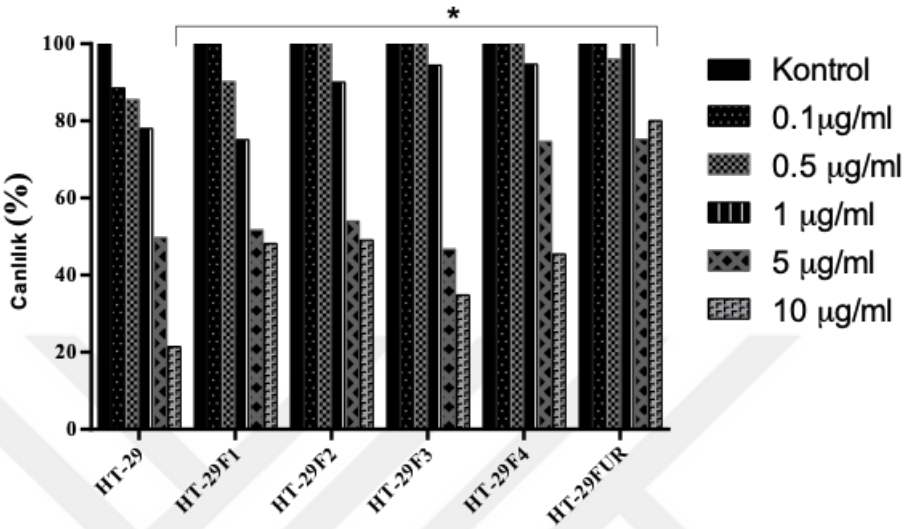
Tablo 39. 5FU' nun 72 saatlik muamle sonunda HT-29F1 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile gösterilmesi

72	**Kontrol**	**0,1 µg/ml**	**0,5 µg/ml**	**1 µg/ml**	**5 µg/ml**	**10 µg/ml**
OD	0,789	0,697	0,6	0,673	0,523	0,484
	0,736	0,603	0,699	0,698	0,585	0,573
	0,802	0,699	0,698	0,656	0,577	0,524
OD ort	0,776	0,666	0,682	0,676	0,562	0,527
canlılık	100	105,873	91,139	102,228	79,443	73,519
	100	91,595	100,987	106,025	88,861	87,038
	100	106,177	106,025	99,646	87,646	79,595
canlılık ort	100	101,215	104,051	102,633	85,316	80,051



Şekil 64. 72 saatlik 5FU ile muamelesi sonrasında HT-29FUR hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları.

Sonuç olarak 6 ayın sonunda oluşturulan HT-29FUR hücrelerinde 5 µg/ml ve 10 µg/ml 5FU muamelesi sonucu canlılık oranı, HT-29, HT-29F1, HT-29F2, HT-29F3 ve HT-29F4 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p< 0.001$, Şekil 65).



Şekil 65. 72 saatlik 5FU ile muamelesi sonrasında HT-29F1, HT-29F2, HT-29F3, HT-29F4 ve HT-29FUR hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları.

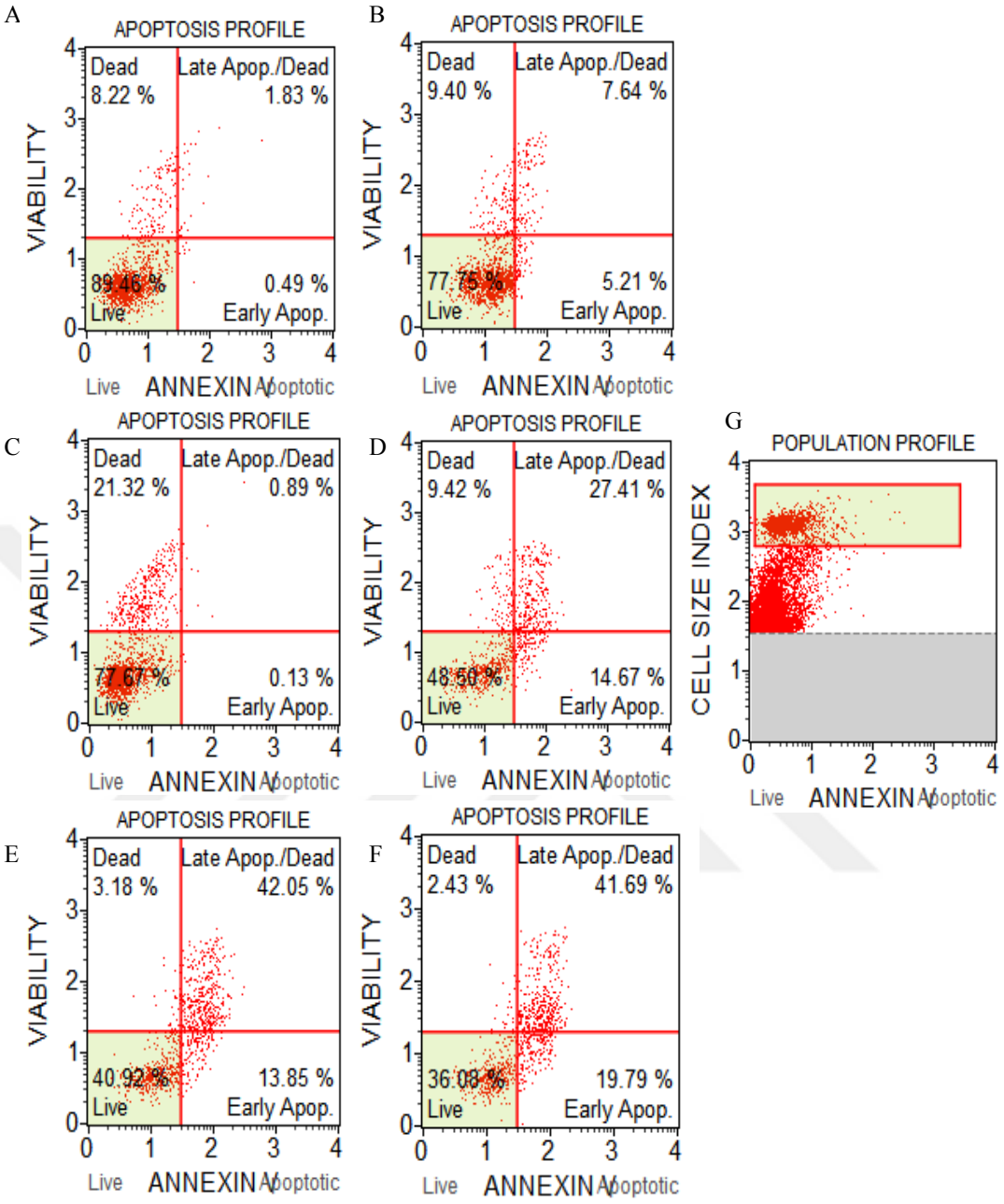
4.2.2. 5FU' nun HT-29FUR Hücrelerinde Apoptotik Etkisi

5FU kanser hücrelerinde DNA ve RNA' nın yapısına girerek bu yapılarda kırıklar oluşturduğu ve hücreyi apoptoza götürdüğü bilinmektedir. HT-29 ve 5FU' ya karşı direnç kazandırılan HT-29FUR hücreleri 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml 5FU ile 72 saat muamele edilerek bu hücrelerdeki canlılık, nekroz ve apoptoz oranları Annexin V (Merck Millipore, Almanya) kiti ile analiz edildi.

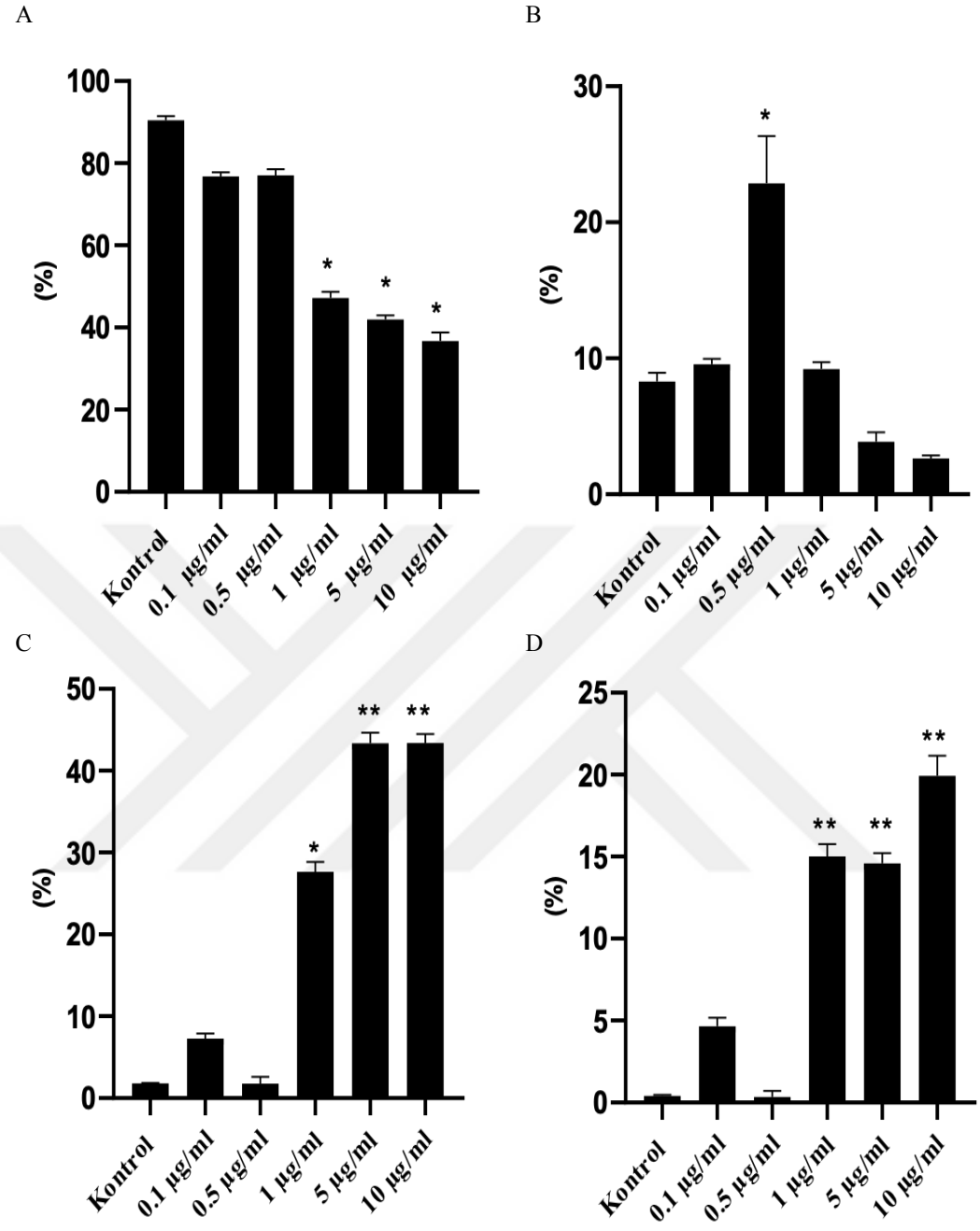
HT-29 hücrelerinde herhangi bir 5FU dozu verilmeden Annexin V testi uygulandığında hücrelerin %89.46'sında canlılık görülürken, %8.22'sinin nekroza, %1.83'nün geç apoptoza, %0.49'unun ise erken apoptoza gittiği, 72 saatlik 0.1 µg/ml 5FU ile muamele sonrası %77.75 oranında canlılık gözlenirken, hücrelerin %79.40'nın nekroza, %7.64'nün geç apoptoza, %5.21'nin ise erken apoptoza uğradığı belirlendi. HT-29 hücrelerine 72 saatlik 0.5 µg/ml 5FU uygulandıktan sonra hücre canlılığı %77.67 olarak belirlenirken, hücrelerin %21.32'sinin nekroza, %0.89'unun geç apoptoza, %0.13'nün ise erken apoptoza gittiği gözlemlendi. HT-29 hücrelerine

72 saatlik 1 µg/ml 5FU dozu uygulanması sonucunda hücre canlılığı %48.50' ye düştüğü belirlenirken bu azalış doz verilmeyen hücreye göre istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi (P= *0.001*). Bu dozda HT-29 hücrelerinin %9.41'nin nekroza uğradığı gözlemlenirken, geç apoptoz ve erken apoptoz oranlarında, 5FU muamelesiz hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı (sırasıyla %27.41, %14,67, p= 0.002, p= 0.030). HT-29 hücreleri 72 saat 5 µg/ml 5FU ile muamele edildikten sonra hücre canlılık oranı %40.92 olarak belirlenirken, bir önceki dozda olduğu gibi, 5FU muamelesiz hücrelere göre, erken ve geç apopotoz oranlarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (sırasıyla %42.05, %13,85, p= 0.001, p= 0.023). Bu doza maruz bırakılan HT-29 hücrelerinin nekroz oranı ise %3.18 olarak belirlendi. Son doz olan 10 µg/ml 5FU ile 72 saat muamele edilen HT-29 hücrelerinde canlılık %36.08, nekroz %2.43, geç apoptoz %41.69, erken apoptoz ise %19.79 oranlarında saptandı. 10 µg/ml 5FU' ya 72 saat boyunca maruz bırakılan HT-29 hücrelerindeki canlılık oranı, doz verilmeyen HT-29 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş gösterirken geç ve erken apoptoz oranlarında ise istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p< 0.05$).

Sonuç olarak yüksek doz 5FU'nun HT-29 hücrelerinin %50'sinden fazlasını apoptoza götürdüğü belirlendi (Şekil 66 ve Şekil 67).



Şekil 66. 0 µg/ml (A), 0.1 µg/ml (B), 0.5 µg/ml (C), 1 µg/ml (D), 5 µg/ml (E) ve 10 µg/ml (F) 5FU ile 72 saat muamele edilen HT-29 hücrelerdeki canlılık, nekroz, geç apoptoz ve erken apoptoz oranları

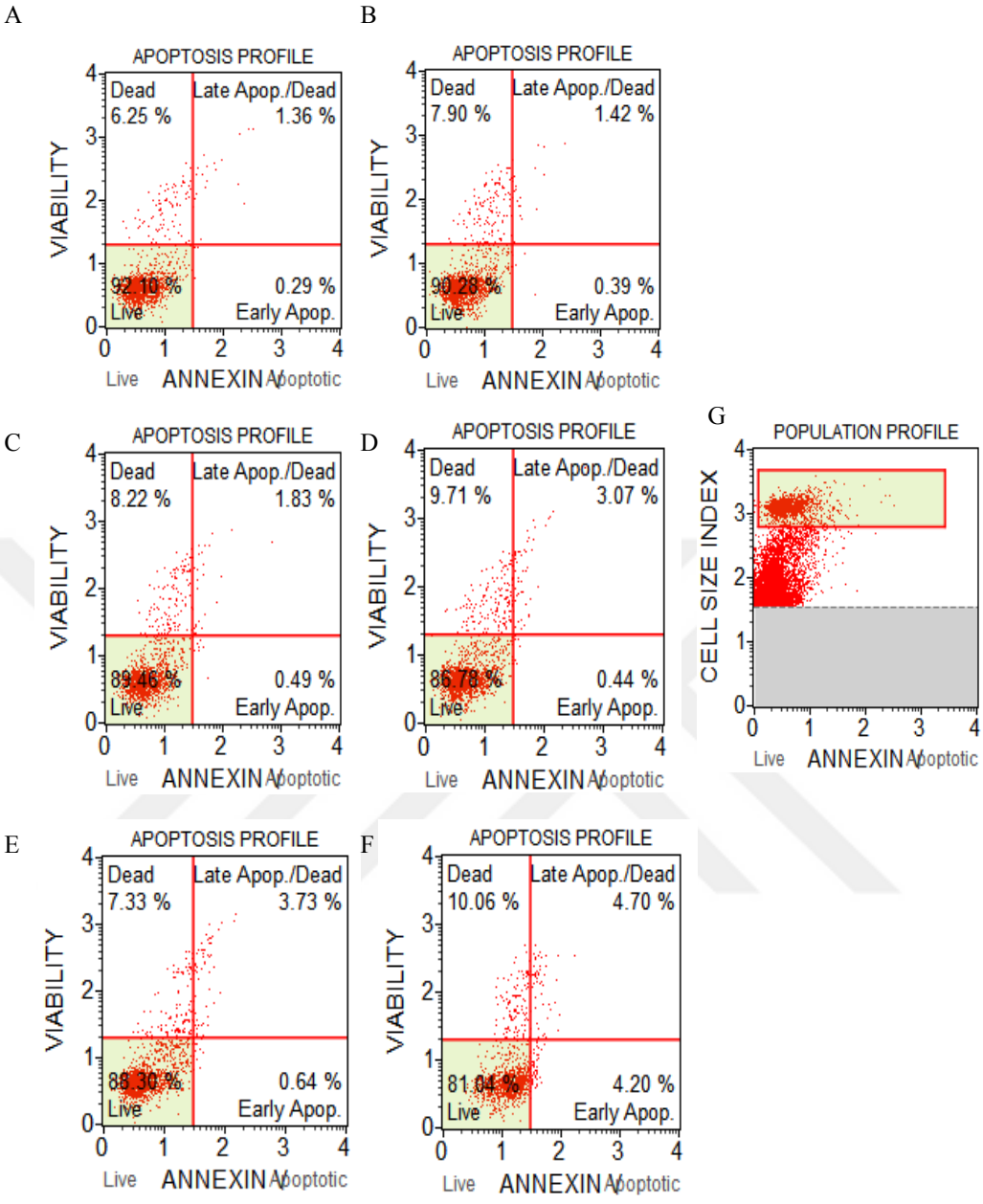


Şekil 67. 72 saat farklı dozlarda 5FU ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde canlılık (A), nekroz (B), geç apoptoz (C) ve erken apoptoz oranları (D) (*p< 0.05, **p< 0.001, n=3: One-way ANOVA)

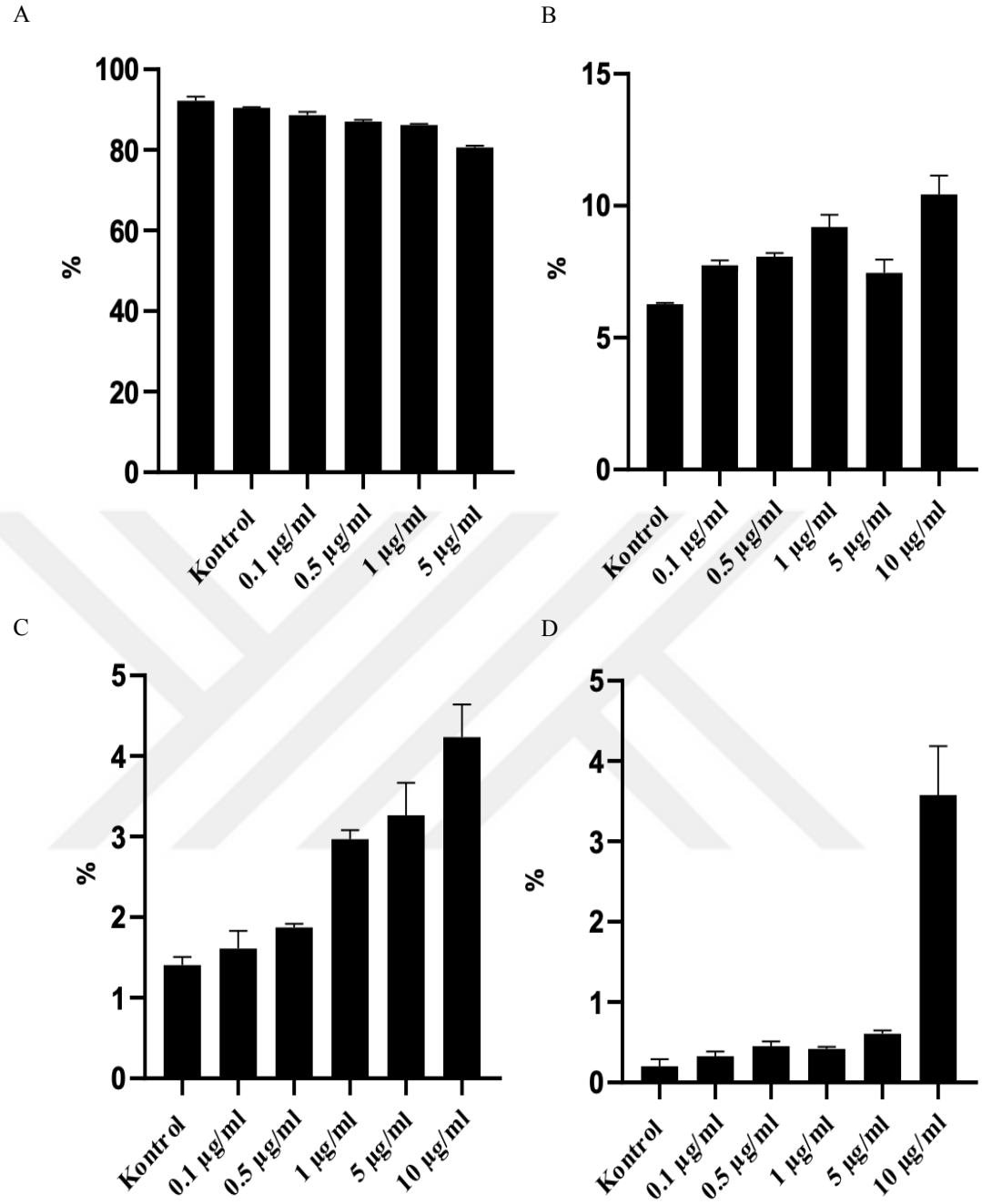
HT-29FUR hücrelerinde herhangi bir 5FU dozu verilmeden Annexin V testi uygulandığında hücrelerin %92.10'nunda canlılık görülürken, %6.15'nin nekroza, %1.36'sının geç apoptoza, %0.29'unun ise erken apoptoza gittiği, 72 saatlik 0.1 µg/ml 5FU ile muamele sonrası %90.29 oranında canlılık gözlenirken, hücrelerin %7.9'unun nekroza, %1.42'sinin geç apoptoza, %0.39'nun ise erken apoptoza uğradığı belirlendi.

HT-29FUR hücrelerine 72 saatlik 0.5 µg/ml 5FU uygulandıktan sonra hücre canlılığı %89.46 oranında belirlenirken, hücrelerin %8.22'sinin nekroza, %1.83'nün geç apoptoza, %0.49'unun ise erken apoptoza gittiği gözlemlendi. HT-29FUR hücrelerine 72 saatlik 1 µg/ml 5FU dozu uygulanması sonucunda hücre canlılığı %86.78, nekroz %9.71, geç apoptoz %3.07, erken apoptoz ise %0.44 oranlarında belirlendi. HT-29FUR hücreleri 72 saat 5 µg/ml 5FU ile muamele edildikten sonra hücre canlılık oranı %86.30, nekroz oranı %7.33, erken ve geç apoptoz oranları ise sırasıyla %3.73, %0.64 olarak gözlendi. Son doz olan 10 µg/ml 5FU ile 72 saat muamele edilen HT-29 hücrelerinde canlılık %81.04, nekroz %10.06, geç apoptoz %4.70, erken apoptoz ise %4.20 oranlarında saptandı.

Sonuç olarak yüksek doz 5FU, HT-29FUR hücrelerinde canlılık ve apoptoz oranlarına istatistiksel olarak anlamlı bir etki yaratmadığı belirlendi ($p > 0.05$, Şekil 68 ve Şekil 69).



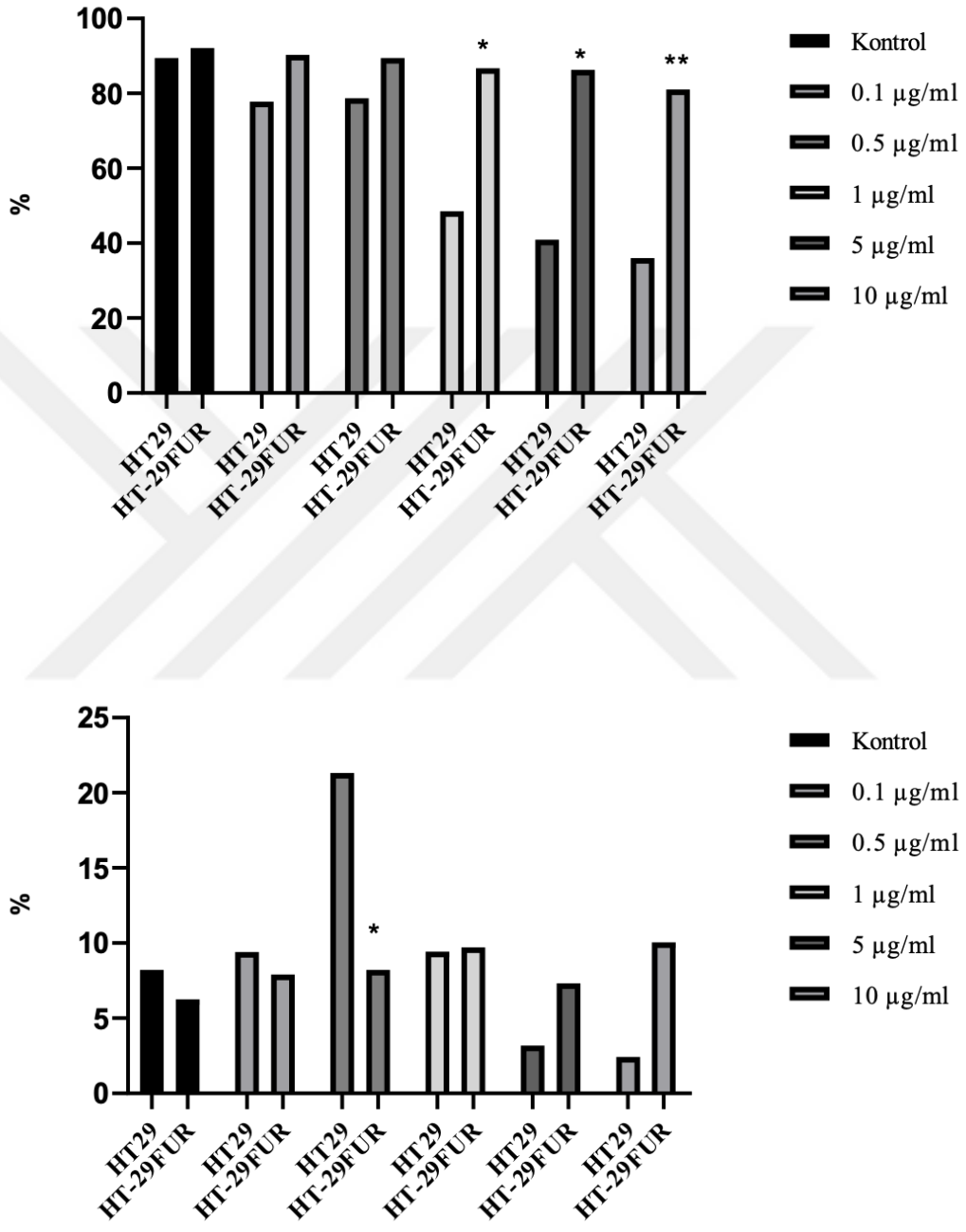
Şekil 68. 0 µg/ml (A), 0.1 µg/ml (B), 0.5 µg/ml (C), 1 µg/ml (D), 5 µg/ml (E) ve 10 µg/ml (F) 5FU ile 72 saat muamele edilen HT-29FUR hücrelerdeki canlılık, nekroz, geç apoptoz ve erken apoptoz oranları



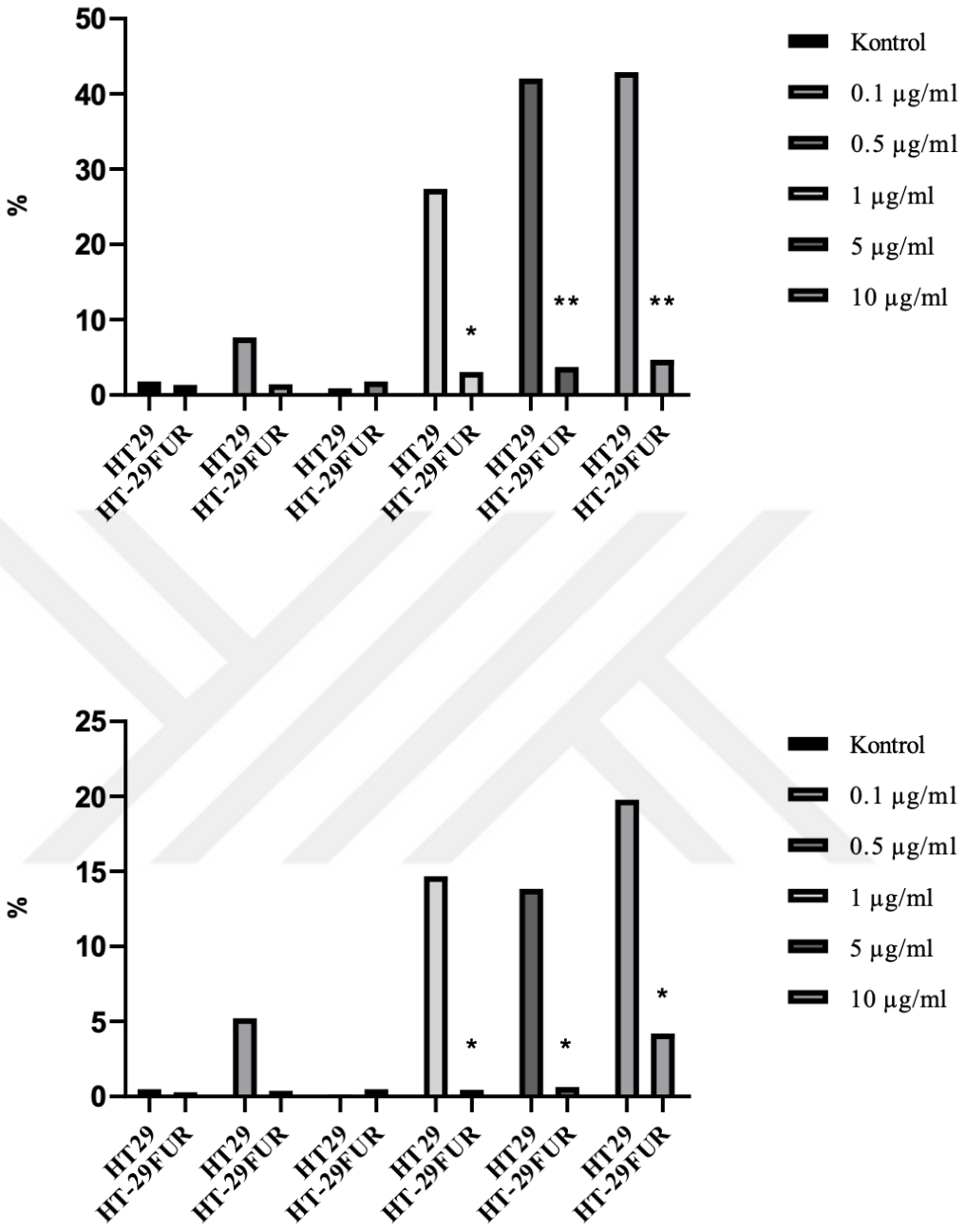
Şekil 69. 72 saat farklı dozlarda 5FU ile muamele edilen HT-29FUR hücrelerinde canlılık (A), nekroz (B), geç apoptoz (C) ve erken apoptoz oranları (D) (n=3).

Farklı dozlarda 72 saatlik 5FU muameleleri sonrası, HT-29 hücrelerine oranla HT-29FUR hücrelerinde, genel olarak zamana ve doza bağlı olarak canlılık oranlarında erken ve geç apoptoz yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış belirlendi ($p<0.001$).

Farklı dozlarda 72 saatlik 5FU muameleleri sonrası HT-29 hücreleri ile HT-29FUR hücrelerindeki canlılık, ölüm, geç apoptoz ve erken apoptoz oranlarının karşılaştırması Şekil 70 ve Şekil 71'de ifade edildi.



Şekil 70. 72 saatlik çeşitli dozlarda 5FU muameleleri sonrası HT-29 hücrelerine göre HT-29FUR hücrelerinde canlılık (A) ve nekroz (B) oranları (*p< 0.05, **p< 0.001, n=3: One-way ANOVA)



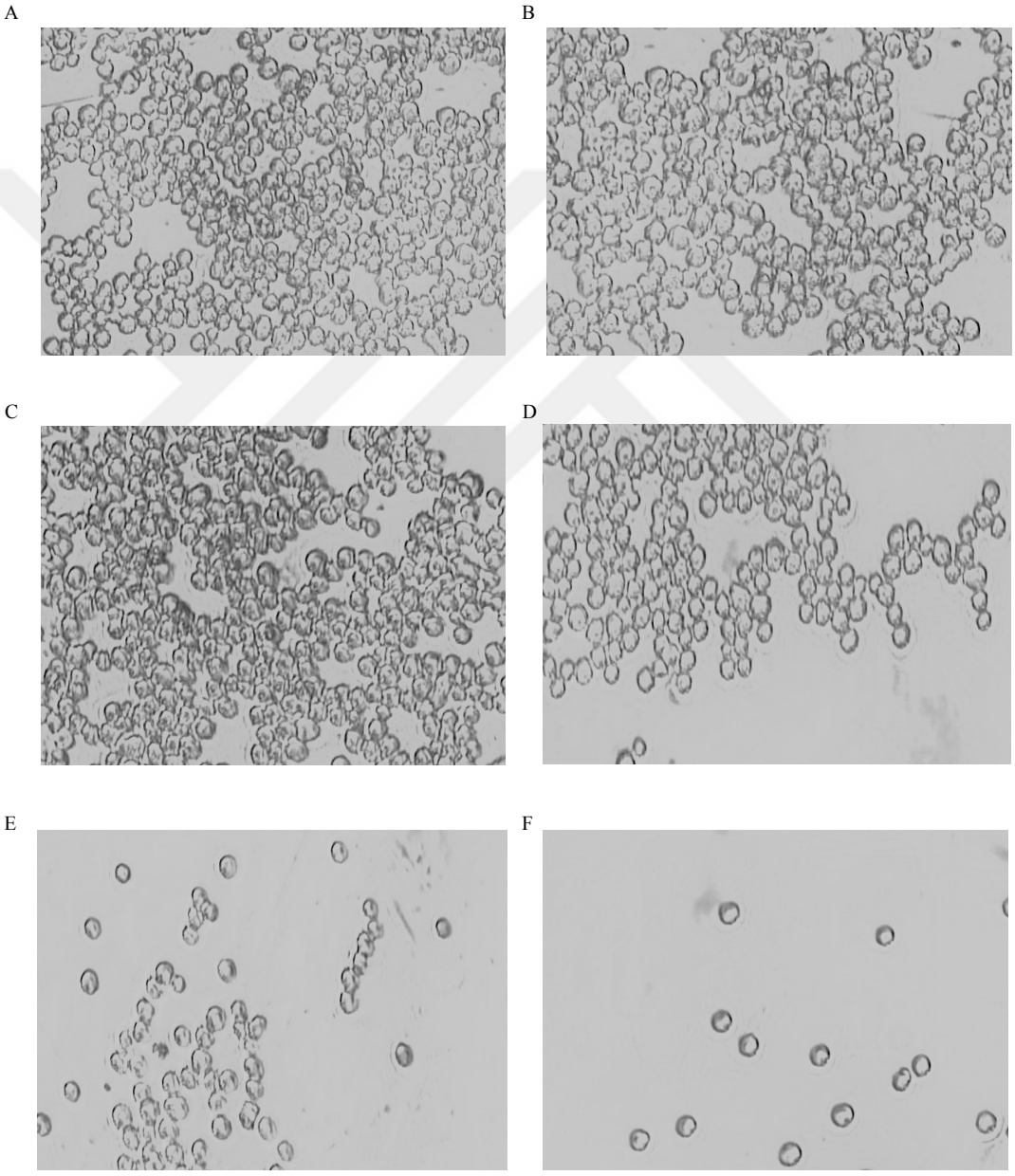
Şekil 71. 72 saatlik çeşitli dozlarda 5FU muameleleri sonrası HT-29 hücrelerine göre HT-29FUR hücrelerinde erken apoptoz (A) ve geç apoptoz (B) oranları (*p< 0.05, **p< 0.001, n=3: One-way ANOVA)

4.2.3. 5FU' nun Kolon Kanser Hücre Hatlarının Morfolojileri Üzerine Etkisi

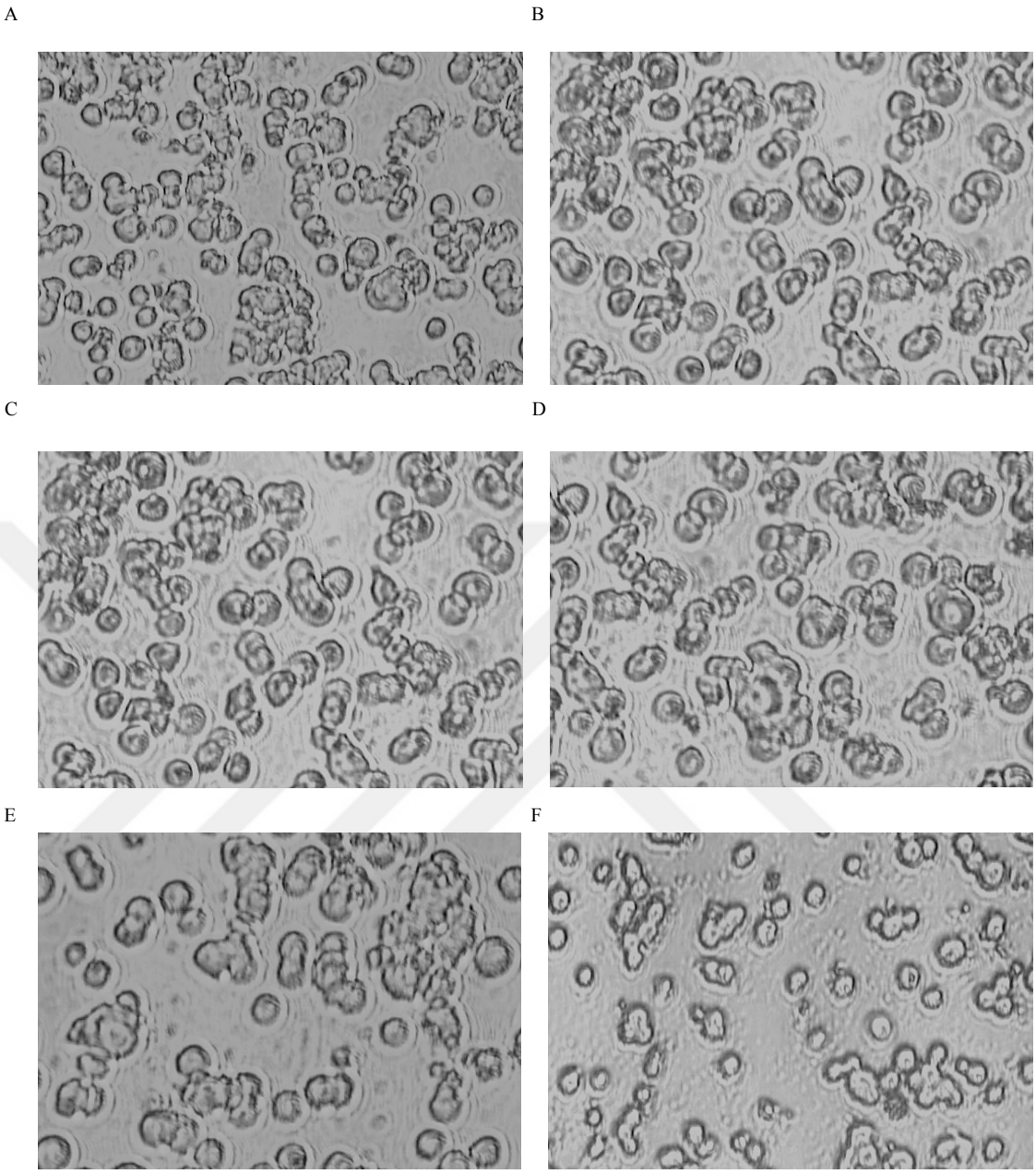
HT-29FUR hücrelerinin elde edilme süreci boyunca her bir doz artışından sonra 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml 5FU ile 72 saat muamele

edilen hücreler inverted mikroskop ile görüntülenerek morfolojileri incelendi (Şekil72-Şekil77).

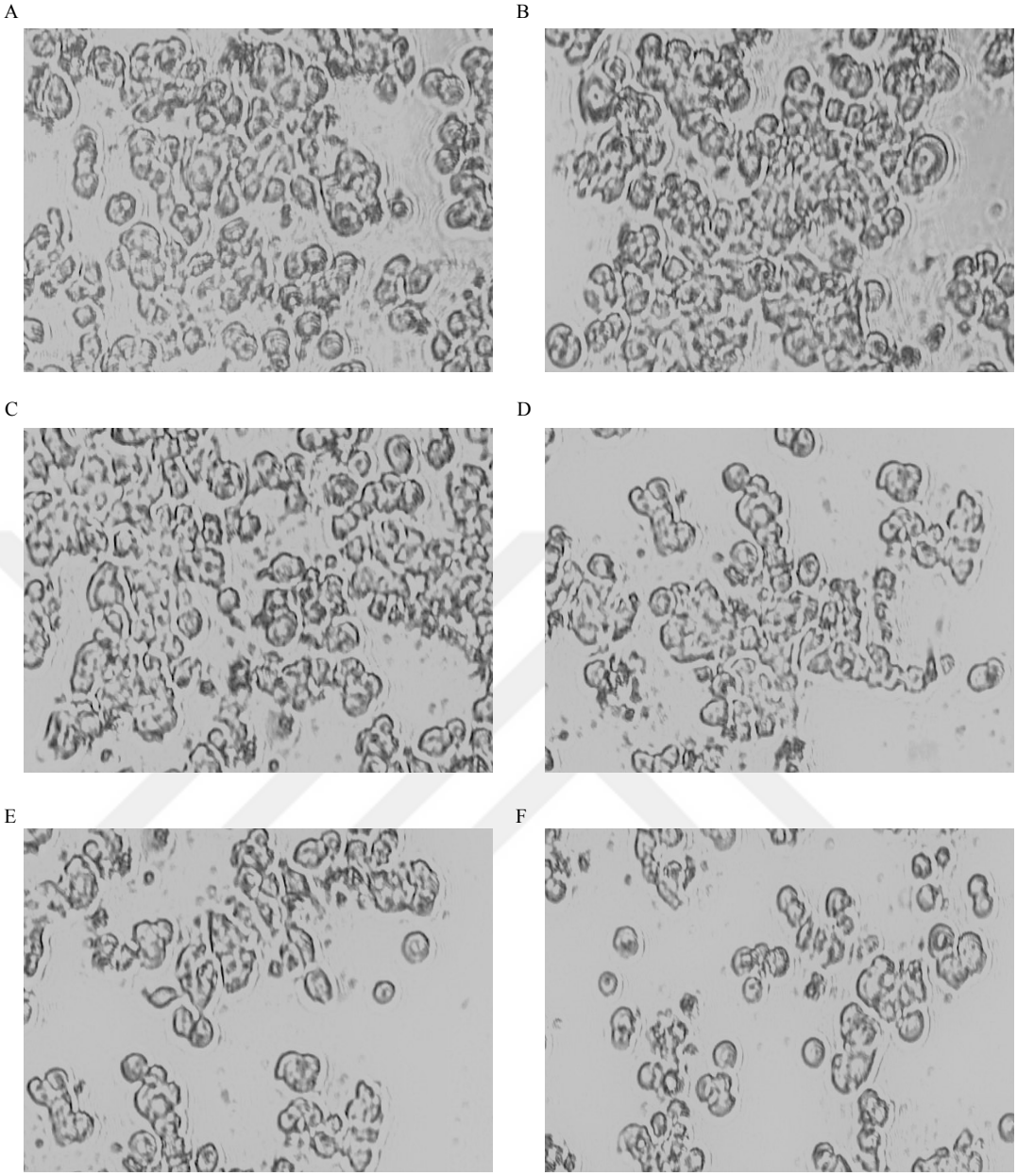
HT-29 hücreleri 5FU'ya karşı direnç geliştirirken sırasıyla 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml 5FU dozları ile 72 saat muamele edildikten sonra, hücrelerin morfolojilerinin değiştiği, birbirlerine daha yakın pozisyonda kaldıkları gözlendi.



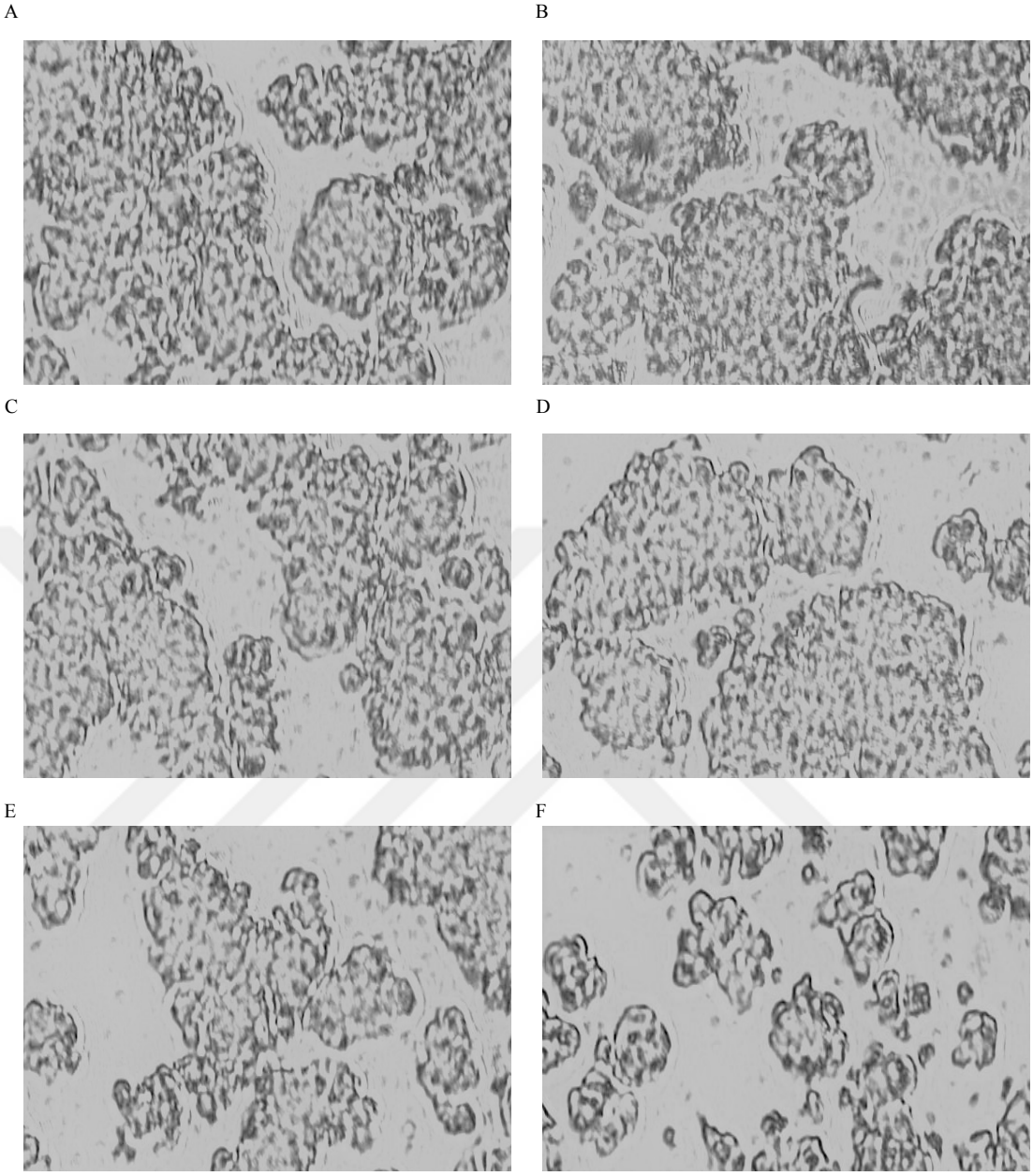
Şekil 72. HT-29 hücreleri sırasıyla 0.1 µg/ml (A), 0.5 µg/ml (B), 1 µg/ml (C), 5 µg/ml (D)ve 10 µg/ml 5FU dozları ile 72 saat muamele edildikten sonraki morfolojileri (40X).



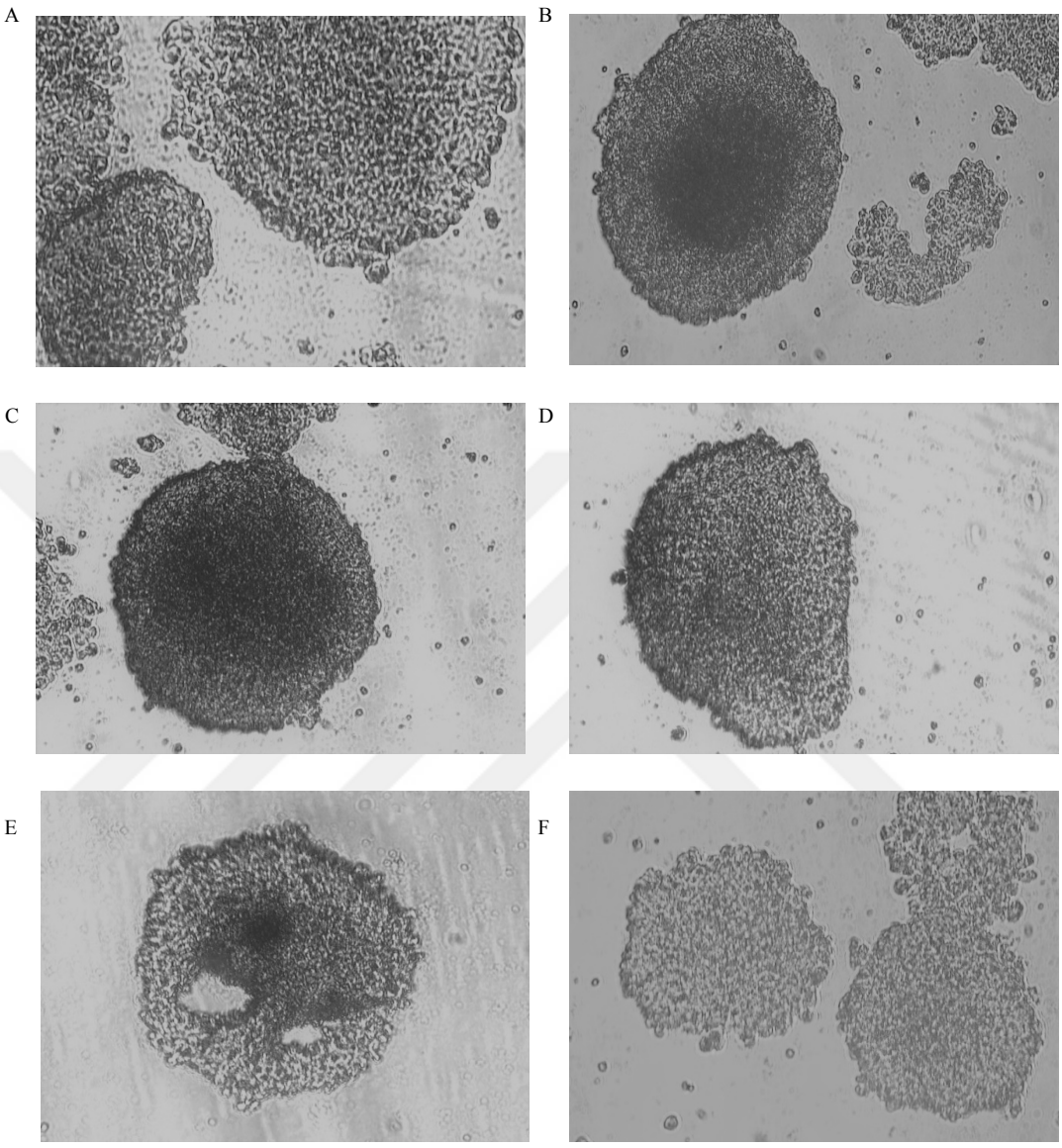
Şekil 73. HT-29F1 hücreleri sırasıyla 0.1 µg/ml (A), 0.5 µg/ml (B), 1 µg/ml (C), 5 µg/ml (D)ve 10 µg/ml 5FU dozları ile 72 saat muamele edildikten sonraki morfolojileri (40X).



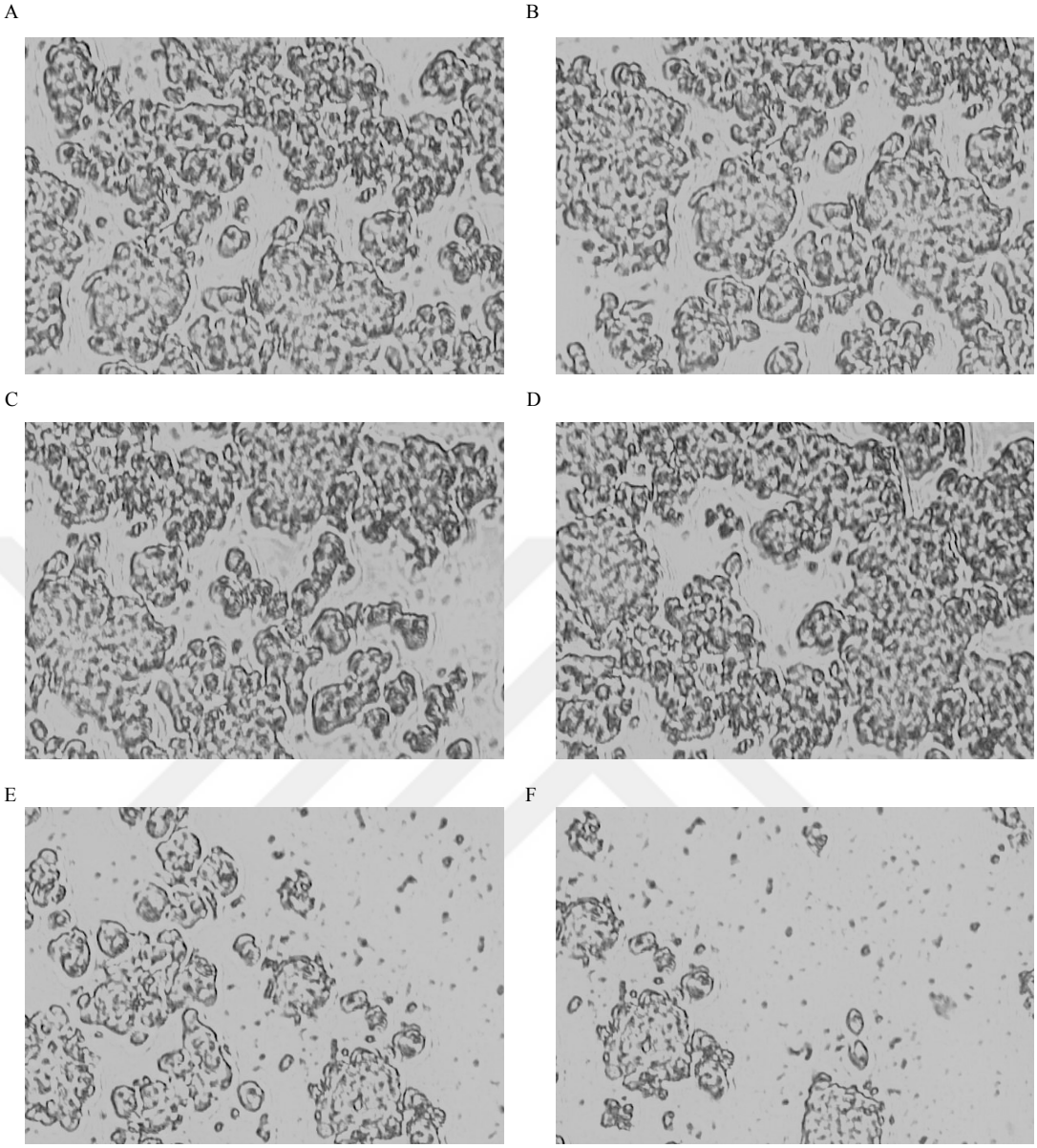
Şekil 74. HT-29F2 hücreleri sırasıyla 0.1 µg/ml (A), 0.5 µg/ml (B), 1 µg/ml (C), 5 µg/ml (D)ve 10 µg/ml 5FU dozları ile 72 saat muamele edildikten sonraki morfolojileri (40X).



Şekil 75. HT-29F3 hücreleri sırasıyla 0.1 µg/ml (A), 0.5 µg/ml (B), 1 µg/ml (C), 5 µg/ml (D)ve 10 µg/ml 5FU dozları ile 72 saat muamele edildikten sonraki morfolojileri (40X).



Şekil 76. HT-29F4 hücreleri 2. hafta görüntüleri. (A), 0.5 µg/ml (B), 1 µg/ml (C), 5 µg/ml (D)ve 10 µg/ml 5FU dozları ile 72 saat muamele edildikten sonraki morfolojileri (4X).



Şekil 77. HT-29F4 hücreleri sırasıyla 0.1 µg/ml (A), 0.5 µg/ml (B), 1 µg/ml (C), 5 µg/ml (D)ve 10 µg/ml 5FU dozları ile 72 saat muamele edildikten sonraki morfolojileri (40X).

4.3. KKHücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinde EMT

5FU direnci oluşumu ile EMT arasındaki mekanizmayı incelemek için Tablo 9'da belirtilen sekiz farklı EMT belirtecinin ekspresyonu, Huvec, HT-29, HT-29F1, HT-29F2, HT-29F3, HT-29F4 ve HT-29FUR hücrelerinde analiz edildi.

N-kaderin, *Slug*, *Zeb1*, *Twist* ve *Vimentin*'in ekspresyonları HT-29 hücrelerinde HUVEC hücrelerine göre daha yüksek belirlenirken, bu EMT belirteçlerinin

ekspresyonlarında, HT-29FUR hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmadı ($p > 0.05$).

EMT belirteçlerinden *E-kaderin*'in ekspresyonu, Huvec hücrelerine göre HT-29 hücrelerinde daha düşük olduğu belirlendi ($P > 0.05$). *E-kaderin*, HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinin ilk doz aşamasında elde edilen HT-29F1 hücrelerinde HT-29 hücrelerine göre daha düşük bir ekspresyon profili gösterirken, HT-29FUR hücrelerinde *E-kaderin* ekspresyonu HT-29 hücrelerine göre 7.12 kat daha az olduğu belirlendi ($p < 0.001$).

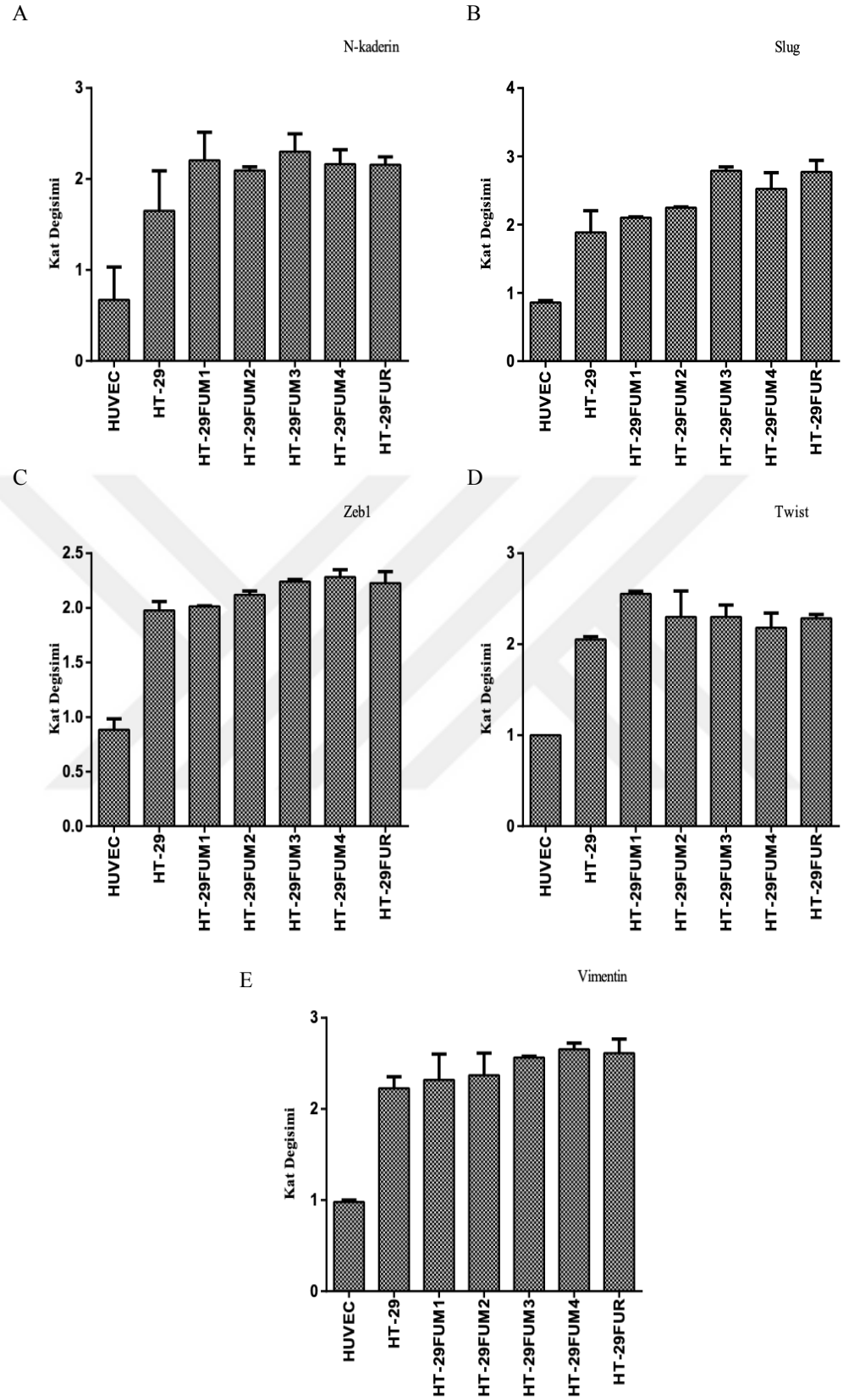
Snail ekspresyonu HUVEC hücrelerine göre HT-29 hücrelerinde daha yüksek olduğu belirlenirken, özellikle HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinin ikinci doz aşamasından sonra elde edilen HT-29F2' hücrelerinde HT-29 hücrelerine göre daha yüksek eksprese edildiği saptanırdı (2.4kat, $p = 0.021$). Ayrıca Snail ekspresyonu HT-29FUR hücrelerinde HT-29 hücrelerine göre 2.7 kat istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p = 0.018$).

MMP-9 ekspresyonu, HUVEC hücrelerine göre HT-29 hücrelerinde yüksek belirlenirken, HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinin son aşamasında elde edilen HT-29FUR hücrelerinde HT-29 hücrelerine göre 3.4 kat istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p = 0.014$, Tablo 40, Şekil 78, Şekil 79).

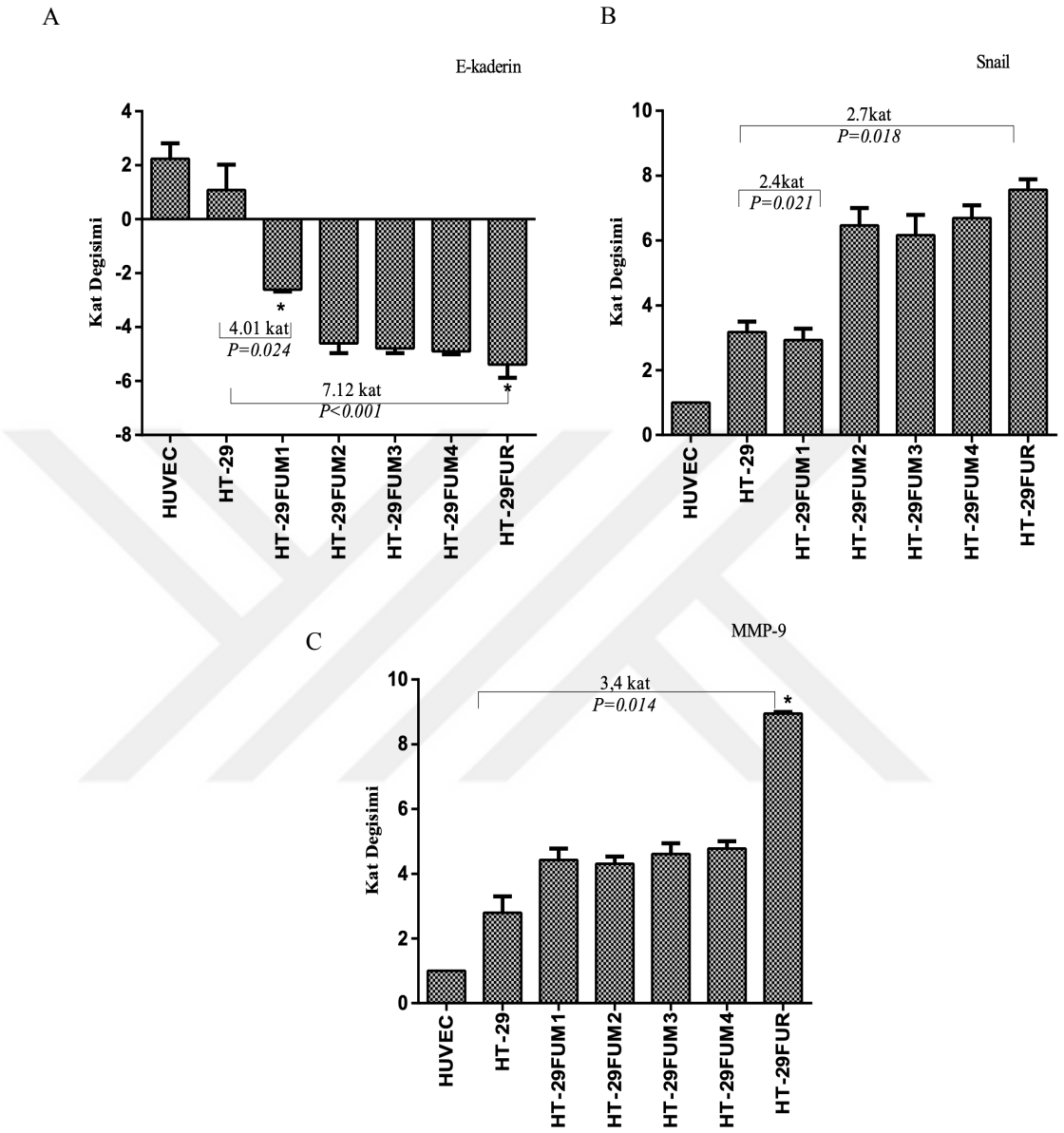
Tablo 40. 5FU direnç kazanımı sırasında HT-29 hücrelerinde EMT belirteçlerinin ekspresyon profilleri

EMT Belirtçeleri	2^(-Avg.(Delta(Ct))							P Değeri
	Huvec	HT-29	HT-29F1	HT-29F2	HT-29F3	HT-29F4	HT-29FUR	HT-29/HT-29FUR
E-kaderin	1.231	0.946	0.235	0.143	0.140	0.138	0.132	0.001
N-kaderin	0.998	3.693	5.077	4.236	5.267	4.754	4.349	0.273
Snail	0.637	1.274	1.095	3.058	2.978	3.176	3.440	0.018
Slug	0.834	1.847	2.039	2.374	3.495	2.567	2.746	0.301
Zeb1	0.625	1.312	1.457	1.764	1.945	2.014	1.834	0.621
Twist	0.273	0.601	0.769	0.621	0.610	0.605	0.608	0.723
Vimentin	0.937	2.155	2.287	2.301	2.412	2.467	2.431	0.356
MMP-9	0.384	0.614	1.049	0.938	1.093	1.204	2.087	0.014

Sonuçlar RT2 profiler PCR array data analysis programından Bağımsız T Testi ile değerlendirildi. * 0.05' ten küçük p değeri kalın ve italik ifade edildi.



Şekil 78. HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinde *N-kaderin* (A), *Slug* (B), *Zeb1* (C), *Twist* (D) ve *Vimentin'in* (E) ekspresyon profilleri.



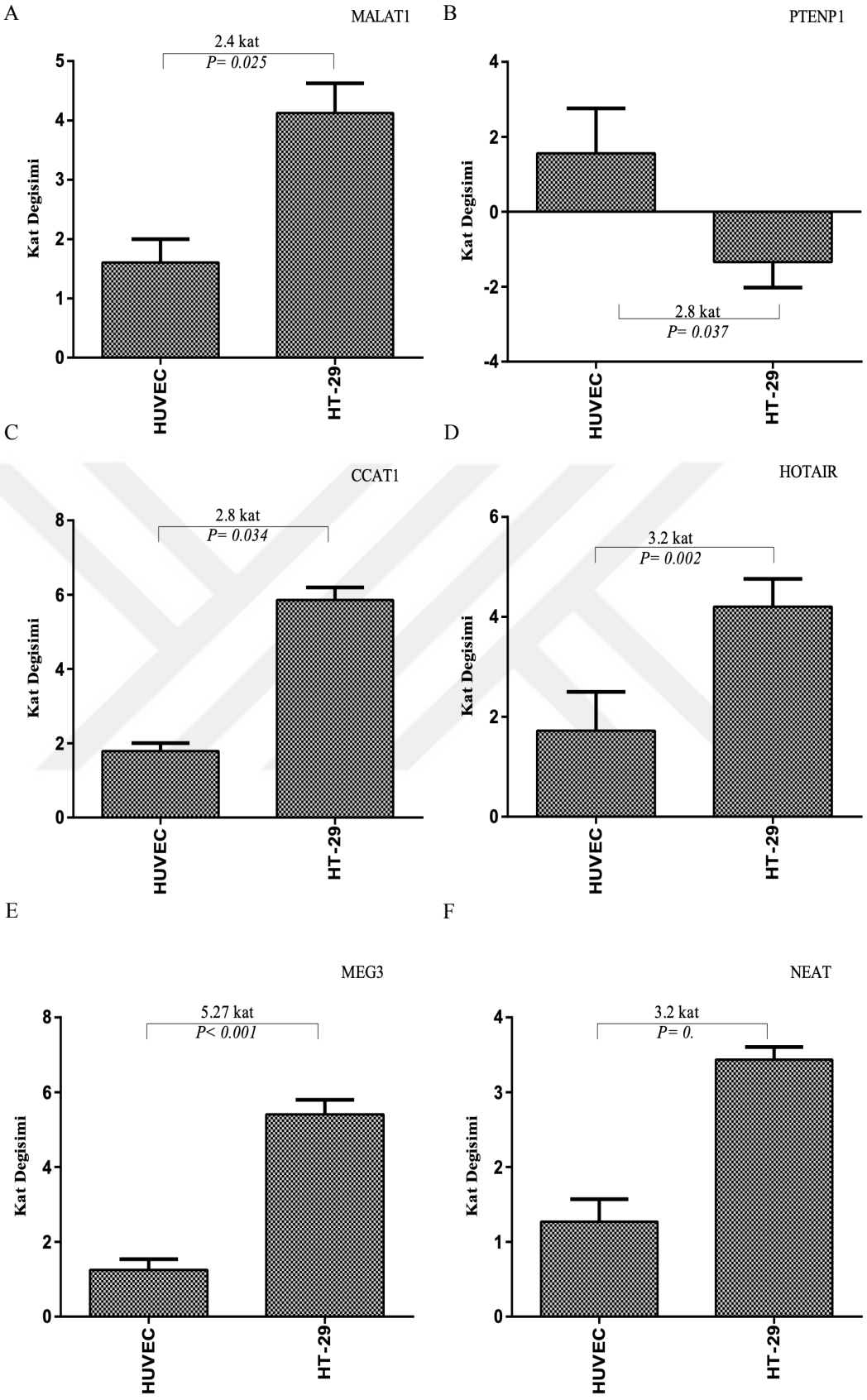
Şekil 79. HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinde *E-kaderin* (A), *Snail* (B) ve *MMP-9'un* (C) ekspresyon profilleri.

4.4. KK Hücrelerinin 5FU Direnci Kazanım Sürecinde LncRNA'ların Ekspresyon Profilleri

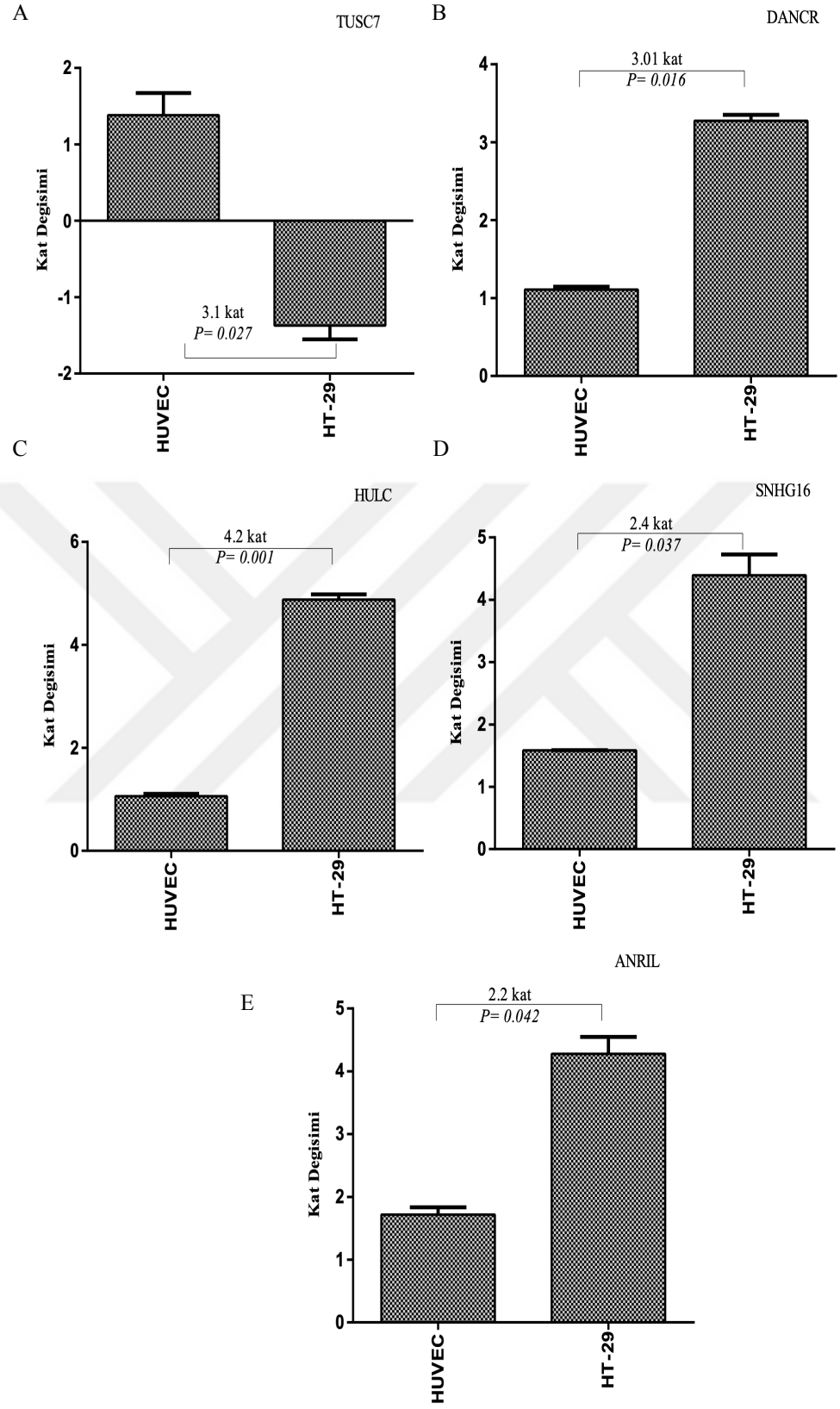
LncRNA ekspresyon profilleri öncelikle kontrol hücre hattına göre HT-29 hücrelerinde analiz edildi. HT-29 hücreleri erken evre kolon tümörü olmamakla birlikte birçok kolon kanser hücre hattına göre daha az invaziv özellik göstermektedir.

Erken evre kolon tümörlerinde anlamlılıkları saptanan MALAT1 ekspresyonu HUVEC hücreleri ile karşılaştırıldığında, HT-29 hücrelerinde 2.4, CCAT1 ekspresyonu 2.8, HOTAIR ekspresyonu 3.2 kat yüksek, PTENP1 ekspresyonu ise 2.8 kat istatistiksel olarak düşüş gösterdi ($P< 0.05$). Bununla birlikte HT-29 hücrelerinde HUVEC hücrelerine göre MEG3 ekspresyonunda 5.27 kat, NEAT1 ekspresyonunda 3.2 kat, DANCR ekspresyonunda 3 kat, HULC ekspresyonunda 4.2 kat, SNHG16 ekspresyonunda 2.4 kat istatistiksel olarak anlamlı artış belirlenirken, TUSC7' nin ekspresyonunda 3.1 kat istatistiksel olarak anlamlı azalış tespit edildi ($p< 0.05$).

HUVEC hücreleri ile karşılaştırıldığında HT-29 hücrelerinde istatistikel olarak anlamlı ekspresyon değişimleri belirlenen LncRNA'lar Şekil 80 ve Şekil 81'de ifade edildi.

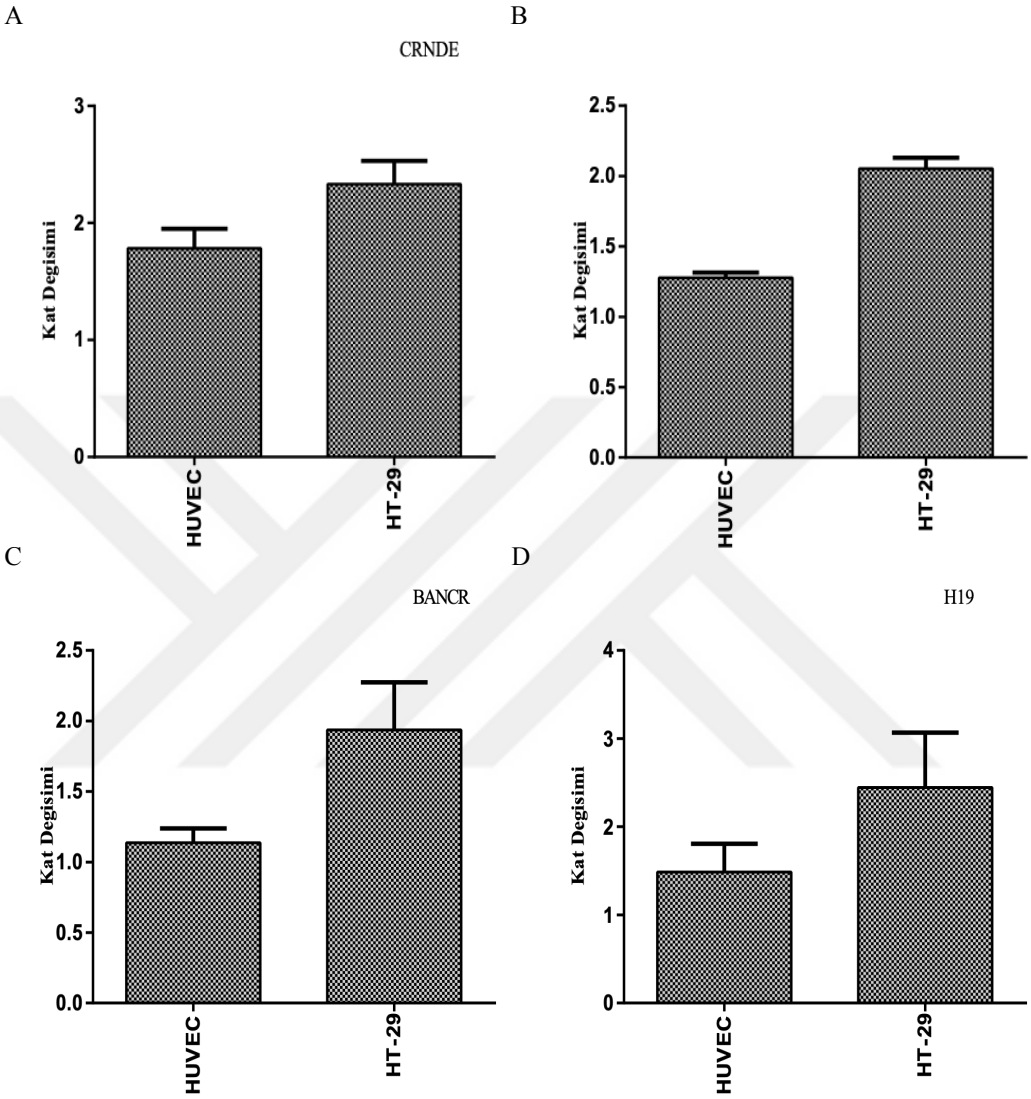


Şekil 80. HUVEC hücreleri ile karşılaştırıldığında HT-29 hücrelerinde MALAT1 (A), PTENP1 (B), CCAT1 (C), HOTAIR (D), MEG3 (E), ve NEAT (F) ekspresyon profilleri.



Şekil 81. HUVEC hücreleri ile karşılaştırıldığında HT-29 hücrelerinde MALAT1 (A), PTENP1 (B), CCAT1 (C), HOTAIR (D), MEG3 (E), ve NEAT (F) ekspresyon profilleri.

HUVEC ile karşılaştırıldığında HT-29 hücrelerinde, CRNDE, BANCR, H19 ve PCAT1 ekspresyon profillerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p > 0.05$, Şekil 82).

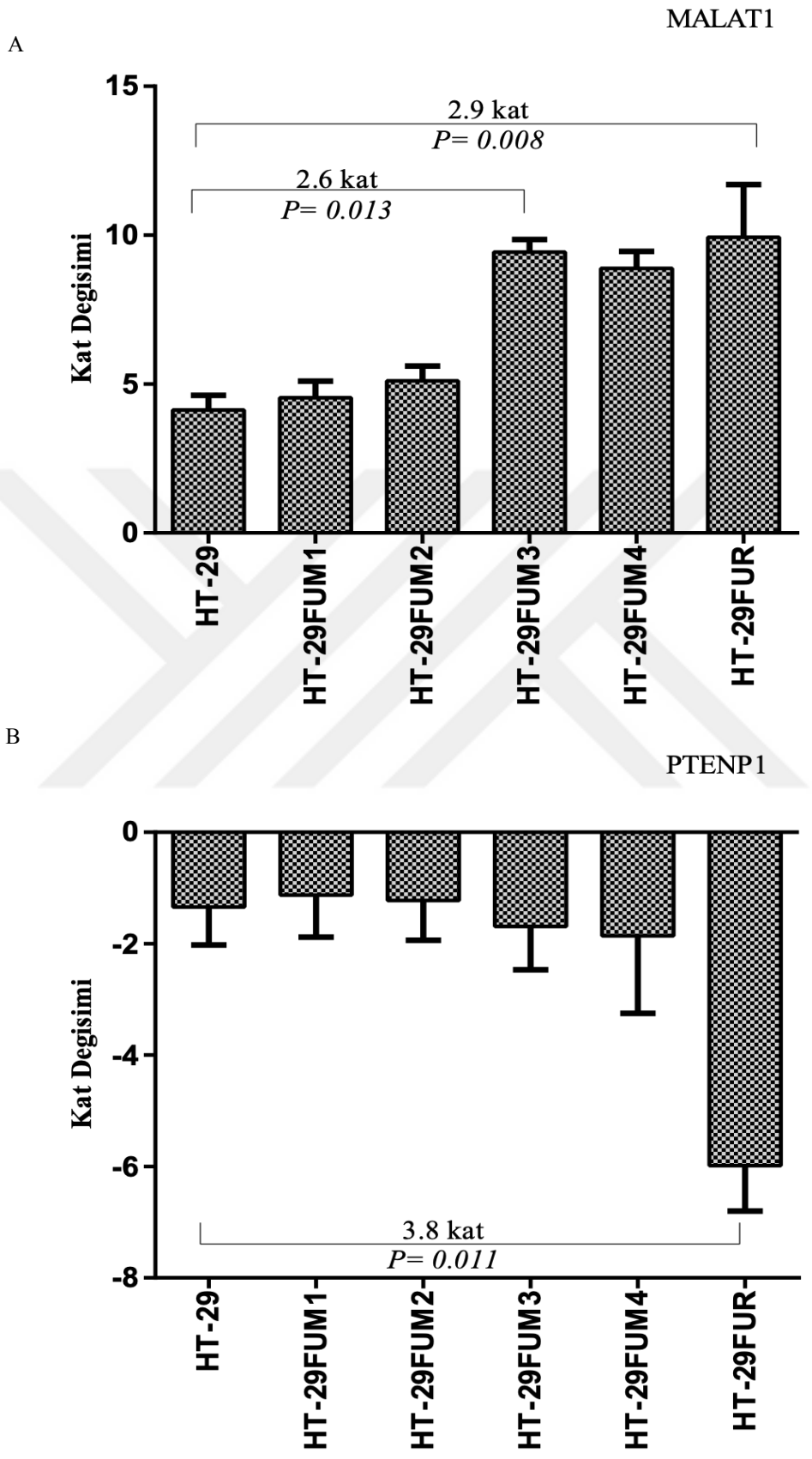


Şekil 82. HUVEC hücreleri ile karşılaştırıldığında HT-29 hücrelerinde CRNDE (A), PTENP1 (B), BANCR (C) ve H19 (D) ekspresyon profilleri.

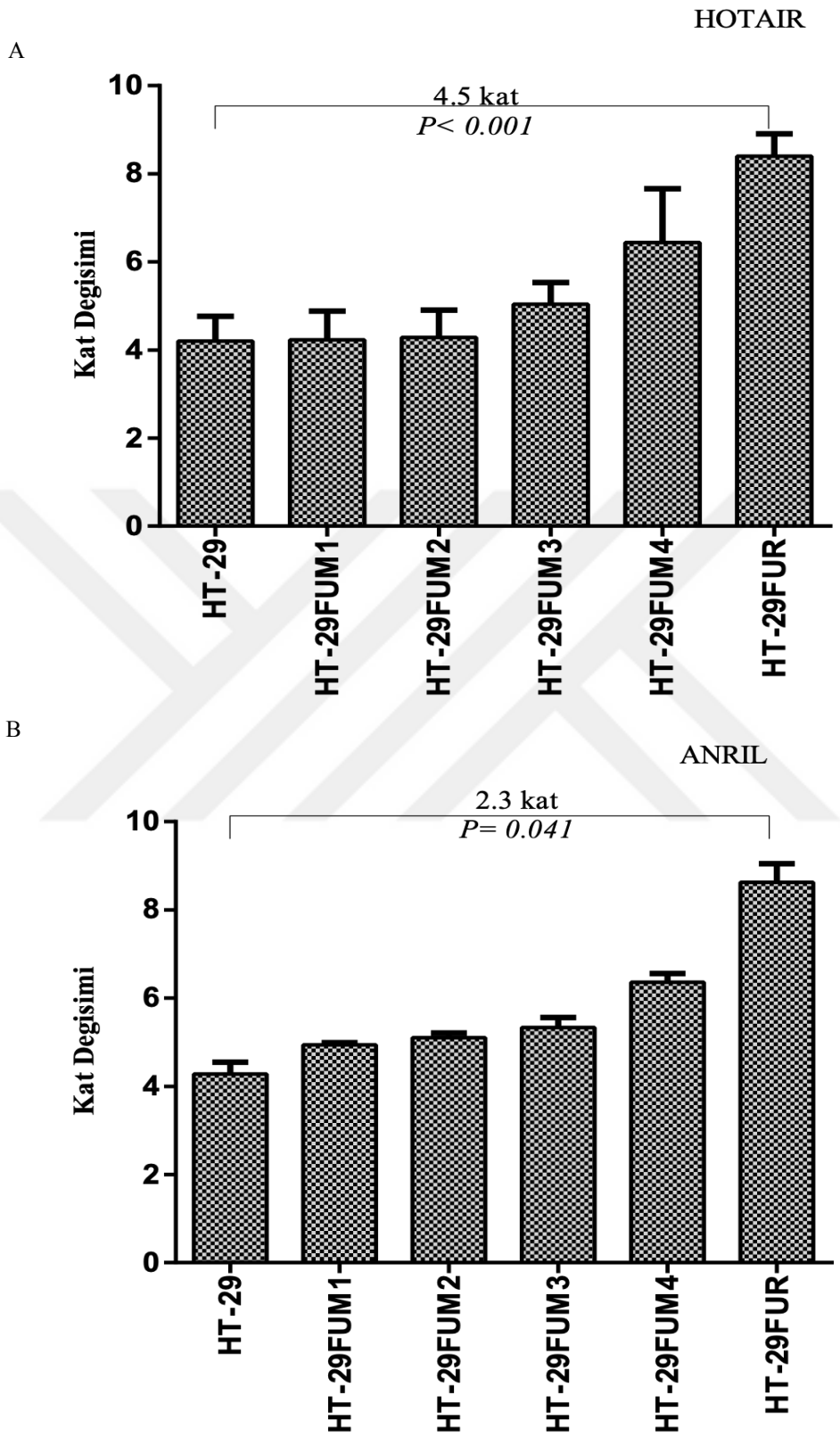
Erken evre kolon tümörlerinde nüsk oluşumu ile ilişkilendirilen LncRNA'lardan MALAT1 ve PTENP1' in 5FU direnci oluşumu süreçlerindeki ekspresyon profilleri analiz edildiğinde MALAT1 ekspresyonunun HT-29 hücrelerine göre HT-29F3 hücrelerinde 2.6 kat, HT-29FUR hücrelerinde ise 2.9 kat istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği belirlendi. Tümör baskılayıcı bir LncRNA olan PTENP1 ekspresyonunun ise HT-29 hücreleri ile karşılaştırıldığında 5FU direnç modelinin son dozunda elde edilen HT-29FUR hücrelerinde 3.8 kat istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü belirlendi.

Ayrıca, literatürde 5FU direnç oluşum sürecinde LncRNA'ların ekspresyon değişimleri tam olarak bilinmediğinde, HT-29 hücrelerinde ekspresyon profilleri belirlenen LncRNA'ların HT-29FUR sürecindeki olası rollerini tanımlamak için her bir LncRNA'nın ekspresyonu HT-29F1, HT-29F2, HT-29F3, HT29F4 ve HT-29FUR hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinde analiz edildi. HT-29 hücreleri ile karşılaştırıldığında HT-29FUR hücrelerinde HOTAIR 4.5 kat, ANRIL ise 2.3 kat istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p< 0.05$). CCAT1' in, CRNDE'nin, SNGH16'nın, TUSC7'nin ve H19'un ekspresyonlarında, 5FU direnç oluşum sürecinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmedi ($p> 0.05$).

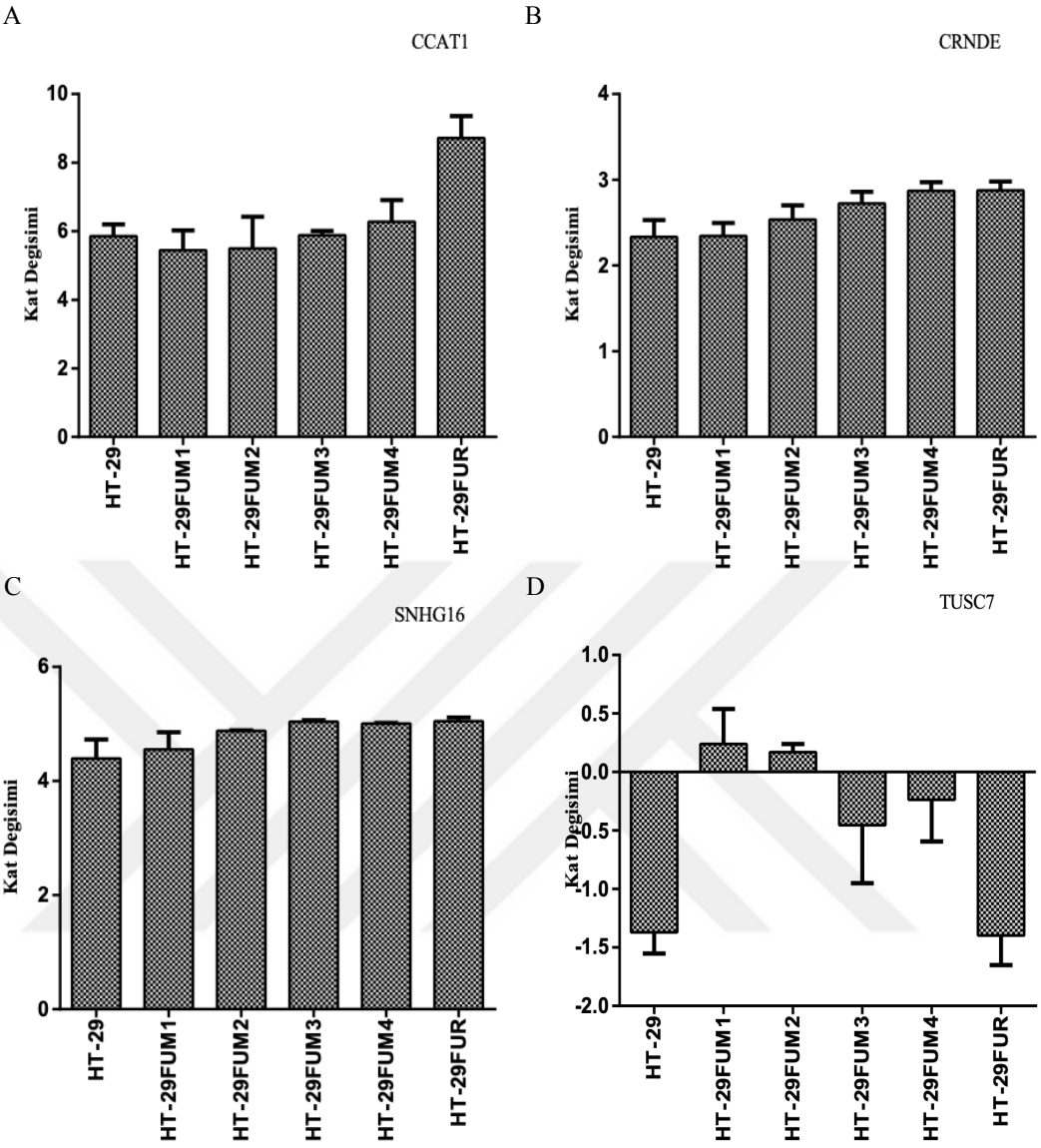
5FU direnci kazanım sürecinde HT-29 hücrelerinde LncRNA'ların ekspresyon profilleri Şekil 83-Şekil 87'de verildi.



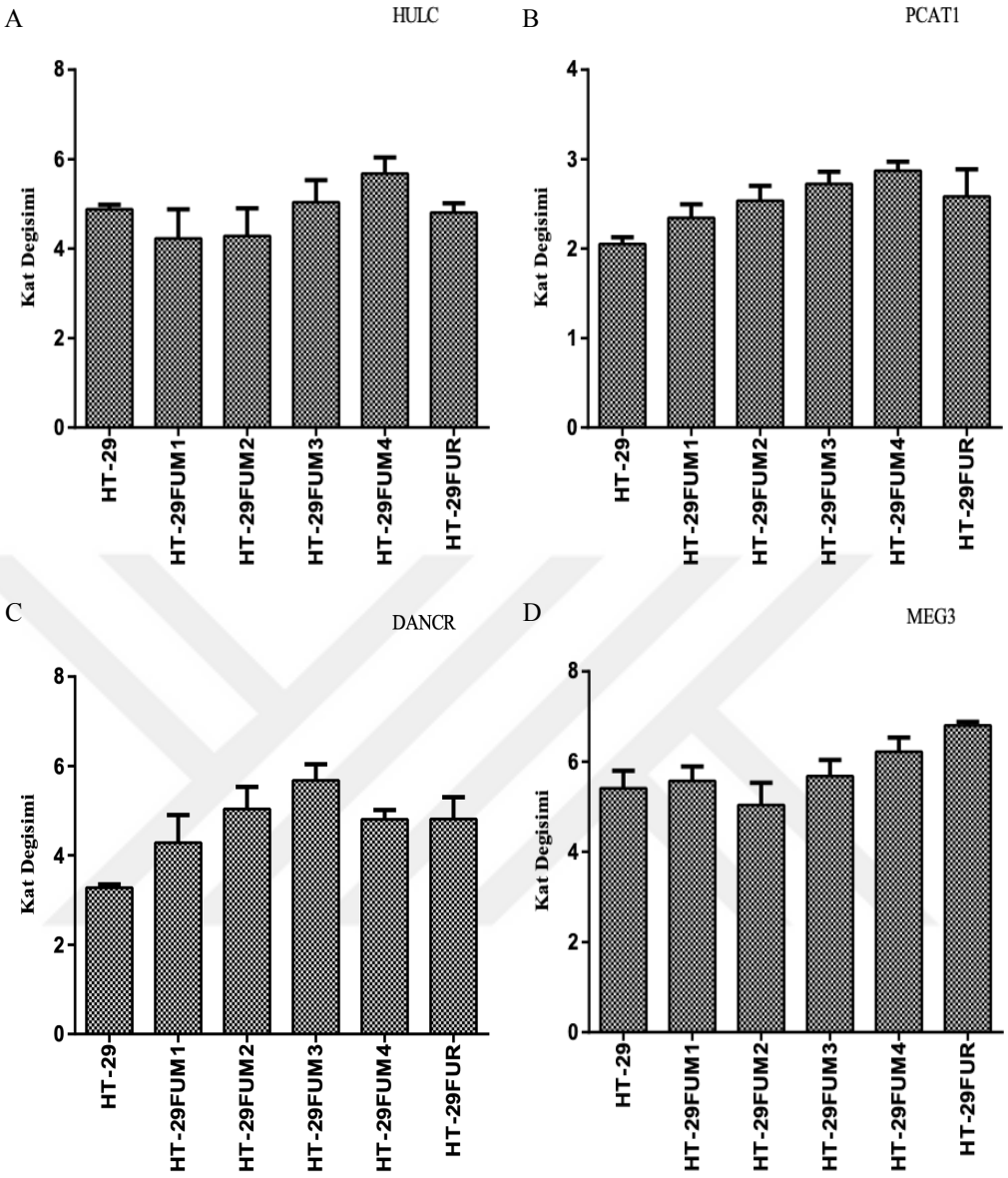
Şekil 83. HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinde MALAT1 (A) ve PTENP1'in (B) ekspresyon profilleri.



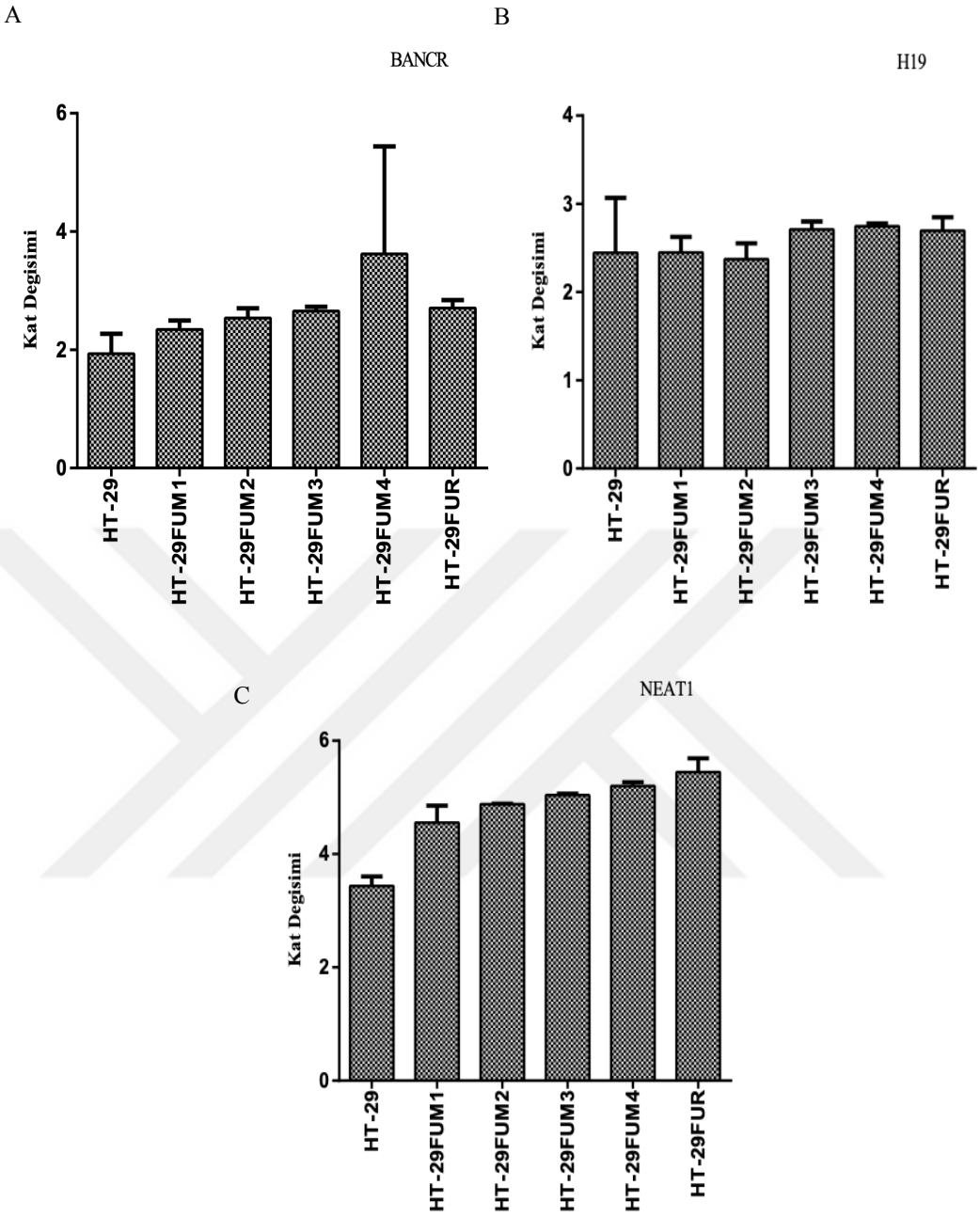
Şekil 84.. HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinde HOTAIR (A) ve ANRIL'in (B) ekspresyon profilleri.



Şekil 85. HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinde CCAT1 (A), CRNDE (B), SNHG16 (C) ve TUSC7'nin (D) ekspresyon profilleri.



Şekil 86. HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinde HULC (A), PCAT1 (B), DANCR (C) ve MEG3'ün (D) ekspresyon profilleri.

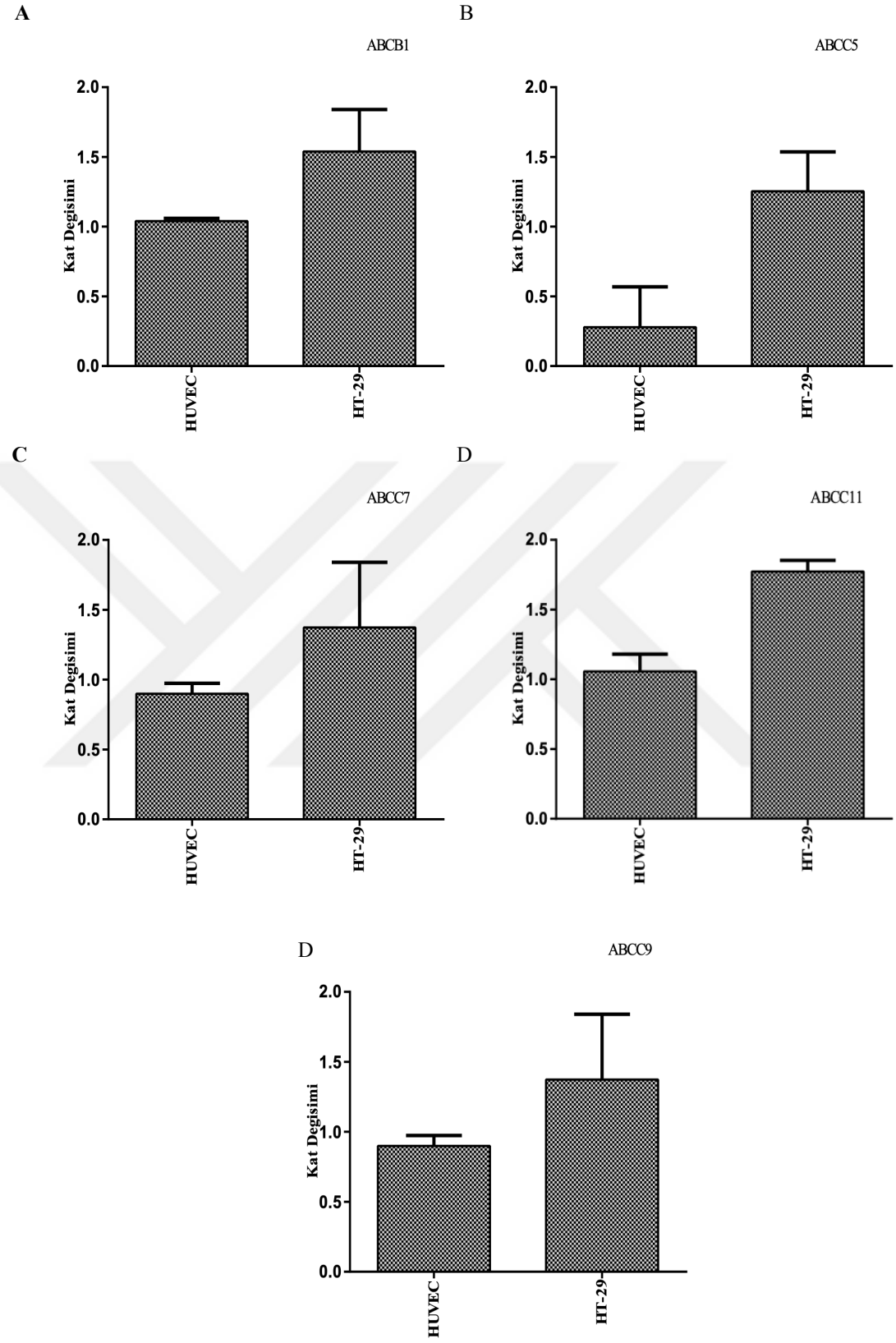


Şekil 87. HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinde DANCR (A), H19 (B) ve DANCR (C) ve NEAT1'in (D) ekspresyon profilleri.

4.5. KK hücrelerinin 5FU Direnci Kazanım Sürecinde MDR Mekanizması

HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanımı sürecinde MDR mekanizmasının olası rolünün araştırılması için MDR belirteçlerinin ekspresyon profilleri analiz edildi. HUVEC hücreleri ile karşılaştırıldığında, HT29 hücrelerinde *ABCB1*, *ABCC5*,

ABCC7, *ABCC9* ve *ABCC11*' in ekspresyon profillerinde anlamlı bir değişim belirlenmedi ($p>0.05$, Şekil 88).

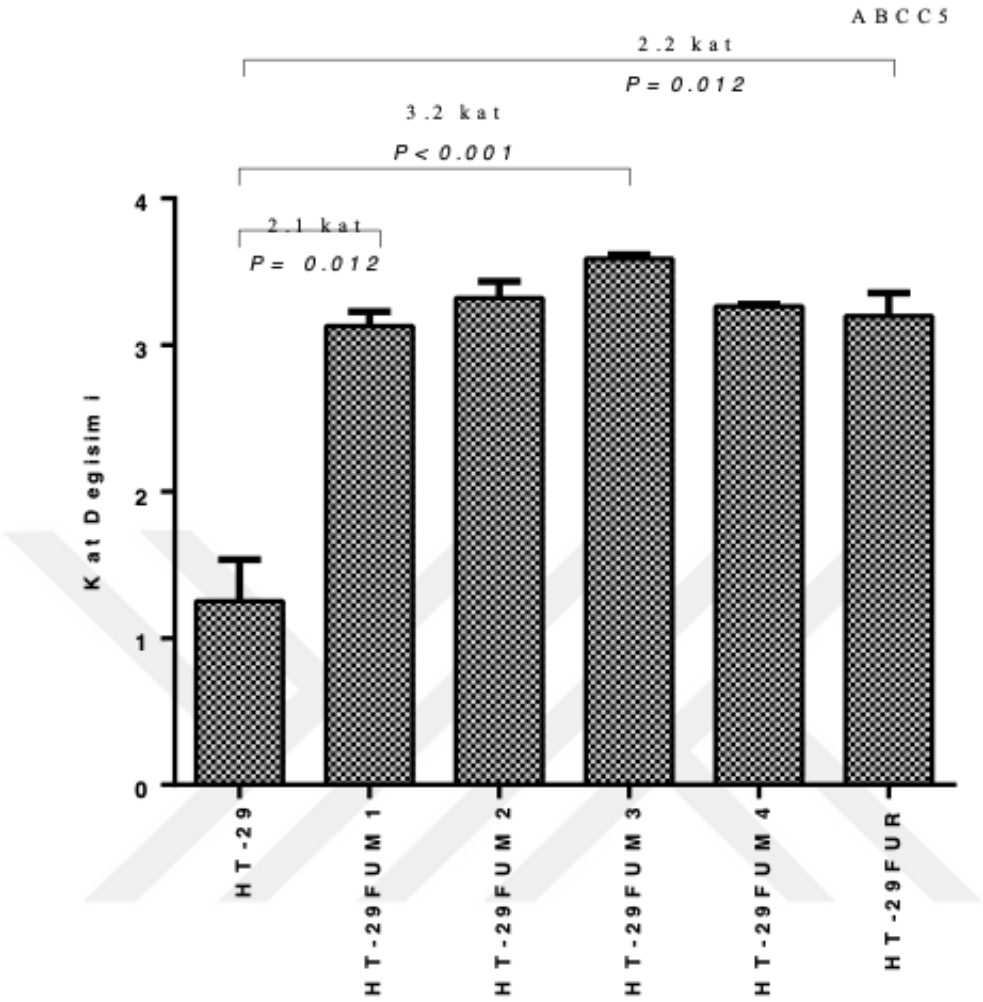


Şekil 88. HT-29 hücrelerinde *ABCB1*'in (A), *ABCC5*'in (B), *ABCC7*'nin (C), *ABCC11*'in (D) ve *ABCC9*'un (E) ekspresyon profilleri.

HT-29 hücrelerinin 5FU kazanım sürecinde *ABCB1*, *ABCC5*, *ABCC7*, *ABCC9* ve *ABCC11*' in ekspresyon profilleri incelendiğinde *ABCC5* ekspresyonunun 5FU muamelesi ile hücrelerde artmaya başladığı belirlendi. *ABCC5* ekspresyonu HT-29 hücreleri ile karşılaştırıldığında, HT-29F3 hücrelerinde en yükseğe ulaşırken, HT-29FUR hücrelerinde 2.2 kat istatistiksel olarak anlamlı arttığı belirlendi (p=0.012, Şekil 89). ABC transporterlarının 5FU kazanım sürecinde HT-29 hücrelerindeki ekspresyon profilleri Tablo 41'de verildi.

Tablo 41. 5FU direnç kazanımı sırasında HT-29 hücrelerinde EMT belirteçlerinin ekspresyon profilleri

mRNA	2^(-Avg.(Delta(Ct))							P Değeri
	Huvec	HT-29	HT-29F1	HT-29F2	HT-29F3	HT-29F4	HT-29FUR	HT-29/HT-29FUR
ABCB1	1.256	1.895	1.985	1.984	1.975	1.745	1.874	0.256
ABCC5	1.059	1.859	3.025	3.124	3.541	3.089	3.045	0.012
ABCC7	1.785	2.012	2.192	2.178	2.148	2.145	2.178	0.098
ABCC9	1.089	1.485	1.745	1.796	1.856	1.879	1.896	0.078
ABCC11	1.145	1.589	1.785	1.854	1.874	1.985	1.978	0.125



Şekil 89. 5FU direnci kazanım sürecinde HT-29 hücrelerinde artan *ABCC5* ekspresyonu

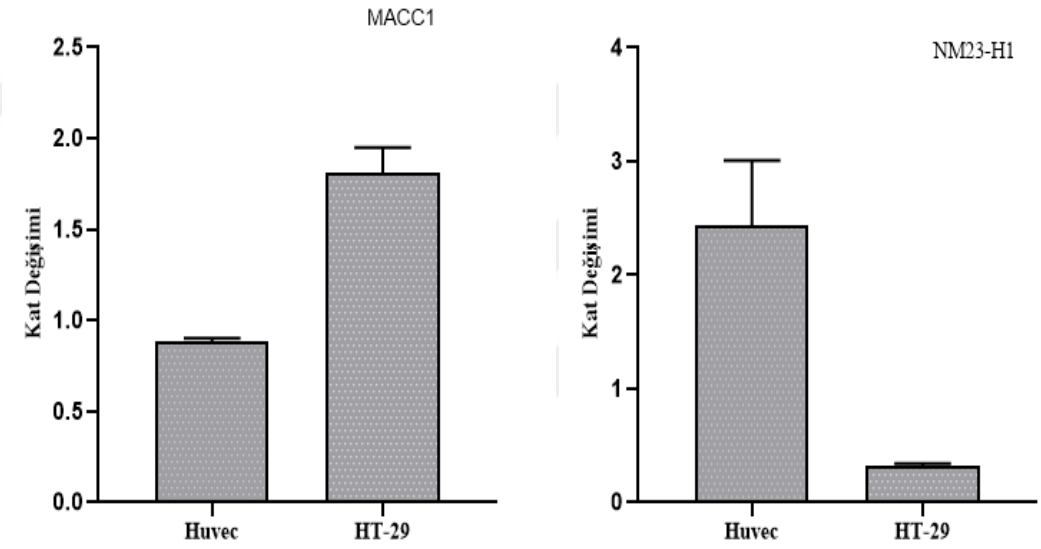
4.6. KK hücrelerinin 5FU Direnci Kazanım Sürecinde Hücrelerin Metastatik Özelliklerinin Gösterilmesi

Çalışmalar kolon kanserinde meydana gelen sistemik nüks ile temel kemoterapi ilacına karşı oluşan direnç arasında bir ilişki olabileceğini savunmaktadır. Bu durumu kanıtlamak için HT-29 hücrelerinde geliştirilen ilaç direnç modelinde her bir doz artışından önce elde edilen hücrelerde metastaz ile ilişkili genlerden *MACC1* ve *NM-23H1'*in ekspresyon analizleri incelendi. Ayrıca hücre agresifliğini belirlemek için hücrelerin migrasyon ve invazyon yetenekleri analiz edildi.

4.6.1. KK Hücrelerinin 5FU'ya Karşı Kazanım Sürecinde Hücrelerde MACC1 Ve NM23-H1 ' inEkspresyon Profilleri

Erken evre kolon tümörlerinde nüks gelişimi ile ilişkili bulunan *MACC1* ve *NM23-H1* mRNA' larının ekspresyonları ilk olarak HT-29 hücrelerinde incelendi. Huvec ile karşılaştırıldığında HT-29 hücrelerinde *MACC1* ekspresyonu 1.8 kat artış gösterirken *NM-23H1* ekspresyonu 2.6 kat istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiştir (sırasıyla p= 0.083, p= 0.024, Şekil 90).

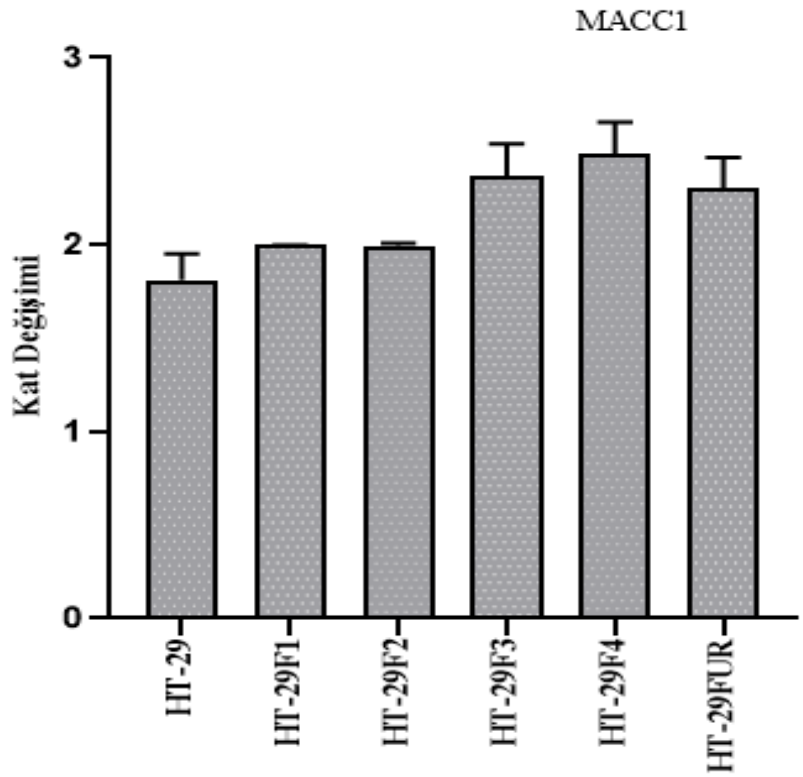
A B



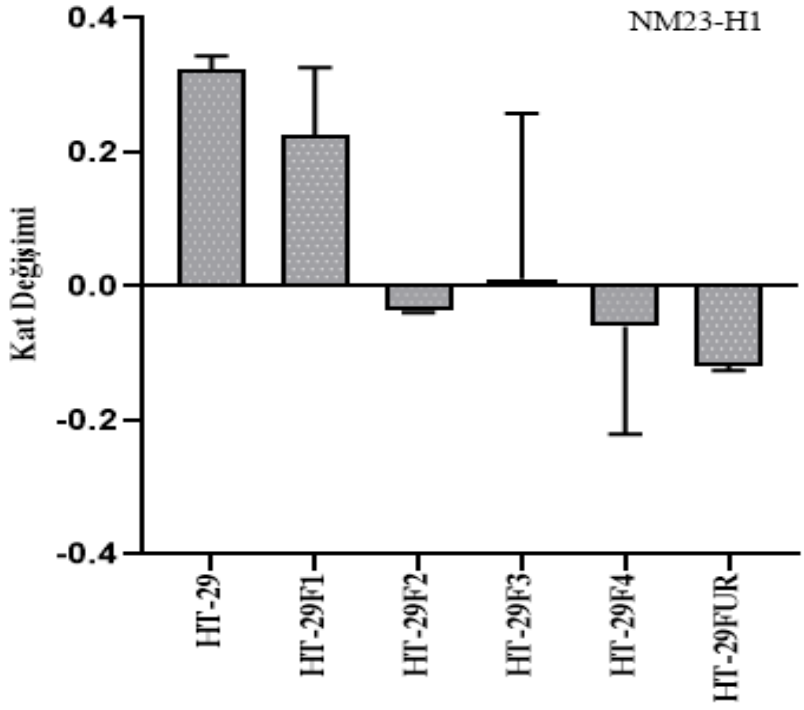
Şekil 90. *MACC1* ve *NM-23H1'in* HT-29 hücrelerindeki ekspresyon profilleri.

MACC1 ve *NM-23H1'* in HT-29 hücrelerinde 5FU direnç kazanımı sırasındaki ekspresyonları incelendiğinde, HT-29FUR oluşum sürecinde bu iki mRNA'nın ekspresyon profilinde istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farklılığı belirlenmedi (p>0.05, Şekil 91, Tablo 42).

A



B



Şekil 91. HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinde *MACC1* (A) ve *NM23-H1'*in(B) ekspresyon profilleri.

Tablo 42. 5FU direnç kazanımı sırasında HT-29 hücrelerinde EMT belirteçlerinin ekspresyon profilleri

mRNA	2^(-Avg.(Delta(Ct))							P Değeri
	Huvec	HT-29	HT-29F1	HT-29F2	HT-29F3	HT-29F4	HT-29FUR	HT-29/HT-29FUR
MACC1	0.734	1.321	1.463	1.436	1.593	1.697	1.498	0.374
NM-23H1	1.283	3.336	2.192	2.767	2.019	2.801	2.912	0.065

Sonuçlar RT2 profiler PCR array data analysis programından Bağımsız T Testi ile değerlendirildi. * 0.05' ten küçük p değeri kalın ve italik ifade edildi.

4.6.2. KK Hücrelerinin 5FU'ya Karşı Kazanım Sürecinde Hücrelerin İnvazyon Özellikleri

İnvazyon, metastaz yapan hücrelerin en belirgin özelliklerinden biridir. 5FU direnç kazanım sürecinde hücrelerin metastatik davranış kazanma durumlarını belirlemek için yapılan yara iyileştirmesi analizinde, HT-29FUR ve HT-29 hücrelerine 10 µg/ml 5FU verildikten sonra yara alanı oluşturularak belli saat aralıkları ile inverted mikroskopta yara alanı incelendi.

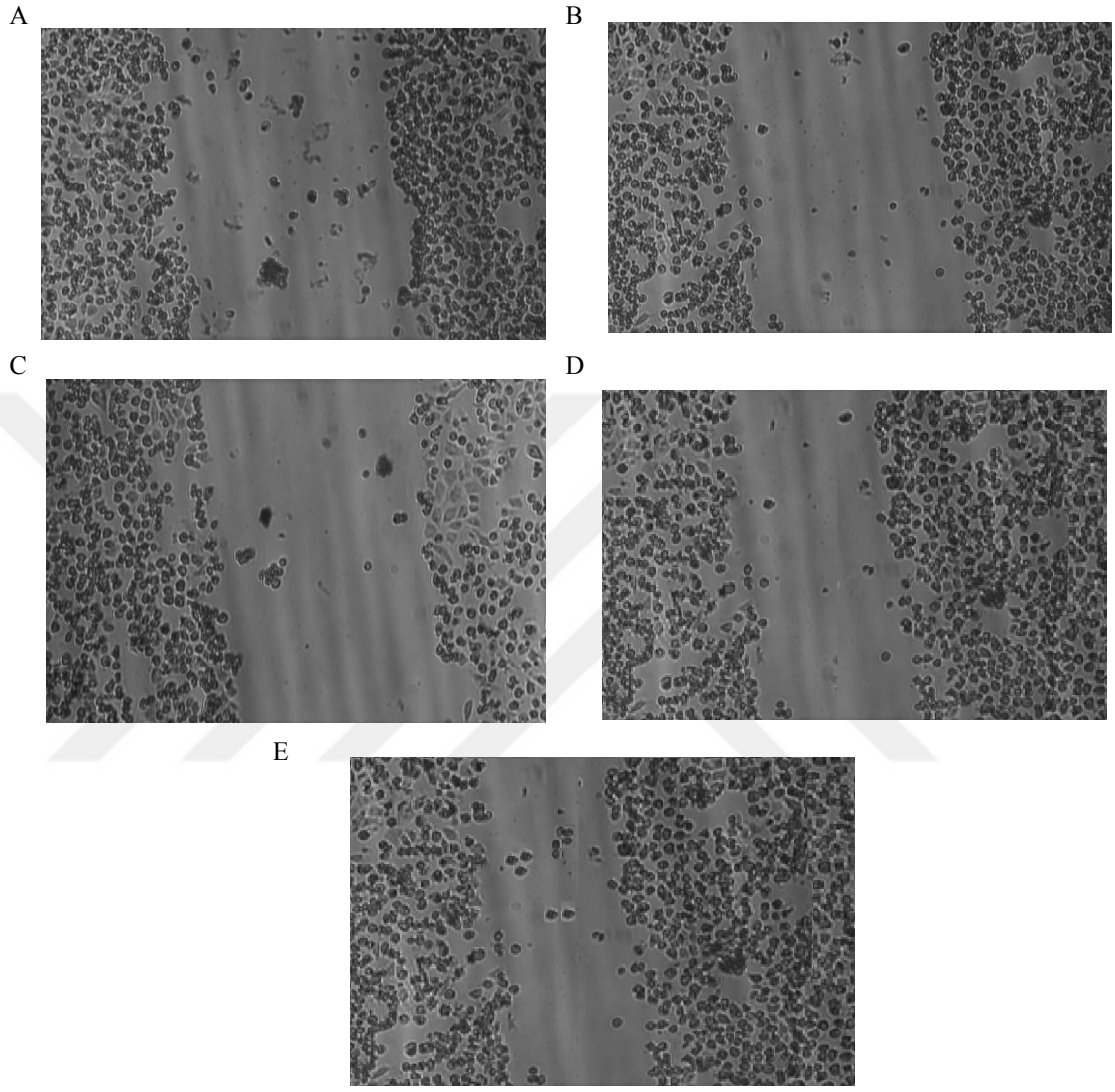
HT-29 hücrelerinin yara alanı 3.41 cm olarak belirlenirken, bu alan 6. saatte 3.09, 12. saatte 3.06, 18. saatte 2.69, 24. saatte ise 2.54 olarak değerlendirildi (Şekil 92).

HT-29 hücrelerinde yara alanı 10 µg/ml 5FU verildikten sonra 0. saate 3.40 cm, 6. saatte 3.91 cm, 12. saatte 3.63 cm, 18. saatte 3.47 cm 24. saatte ise 3.45 cm olarak ölçüldü (Şekil 93). HT-29 hücrelerinde 5FU uygulanması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir migrasyon süreci saptanmadı (Şekil 94).

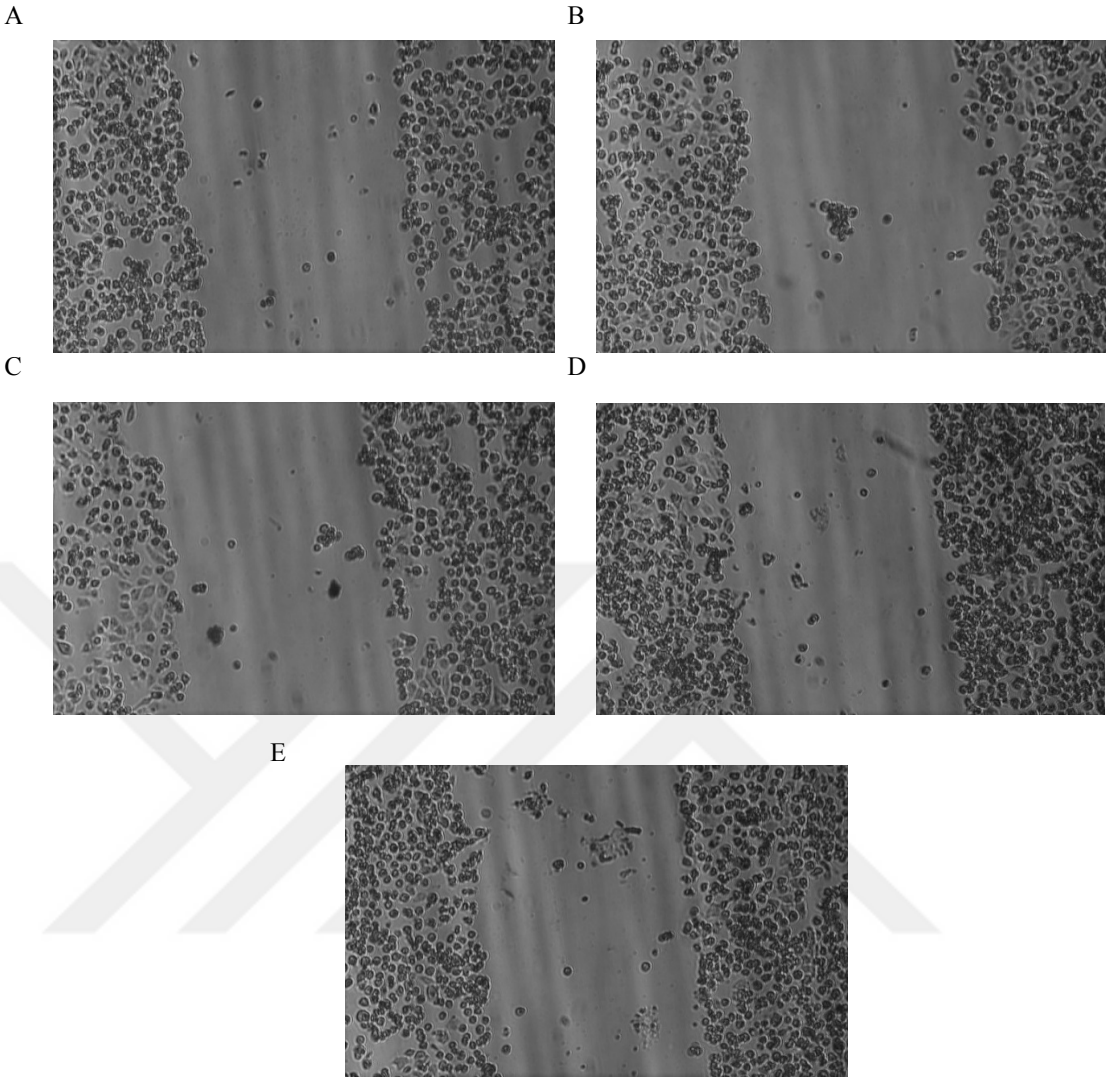
HT-29FUR hücrelerinde yara alanı 3.42 cm olarak değerlendirilirken bu alan 6. saatte 2.48, 12. saatte 2.02, 18. saatte 0.48 olarak ölçülürken 24. saatte tüm yara alanının kapandığı tespit edildi (Şekil 95). HT-29FUR hücrelerine 10 µg/ml 5FU verildikten sonra 0. saatte 3.41 cm, 6. saatte 3.19 cm, 12. saatte 2.48 cm, 18. saatte 2.15 cm olarak belirlenirken, 24. saatte yara alanı 2.04 cm'e geriledi (Şekil 96). HT-29FUR hücrelerinde 18. Saatten itibaren gözlemlenen kapanma istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, HT-29 hücreleri ile karşılaştırıldığında HT-29FUR hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlılık gösteren hücre invazyonu belirlendi (Şekil 97).

HT-29FUR hücrelerinin HT-29 hücrelerine göre daha yüksek invazyon yeteneği saptandı ($p<0.001$, Şekil 98). Her iki hücreye 5FU muamelesi yapıldığında

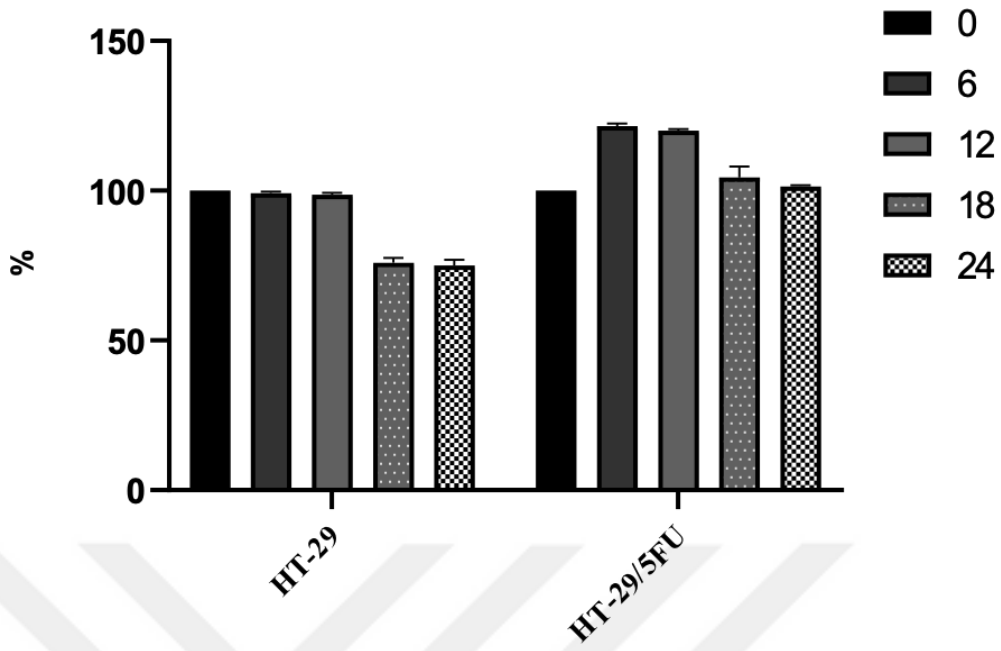
da HT-29FUR hücrelerinin HT-29 hücrelerine oranla daha yüksek invazyon yapma özelliği olduğu belirlendi ($p<0.001$, Şekil 99).



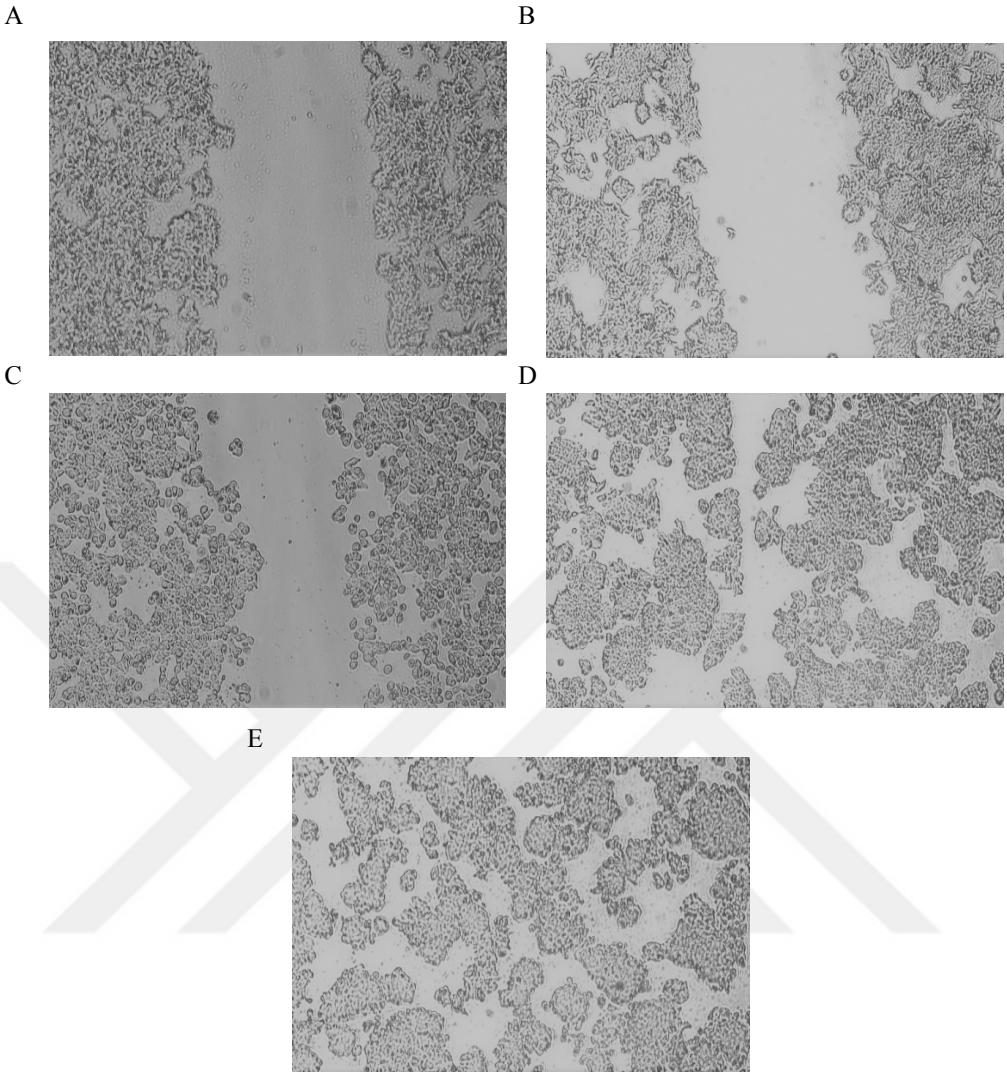
Şekil 92. HT-29 hücrelerinin yara alanının 0. (A), 6. (B), 12. (C), 18. (D) ve 24. (E) saat görüntüleri (20X).



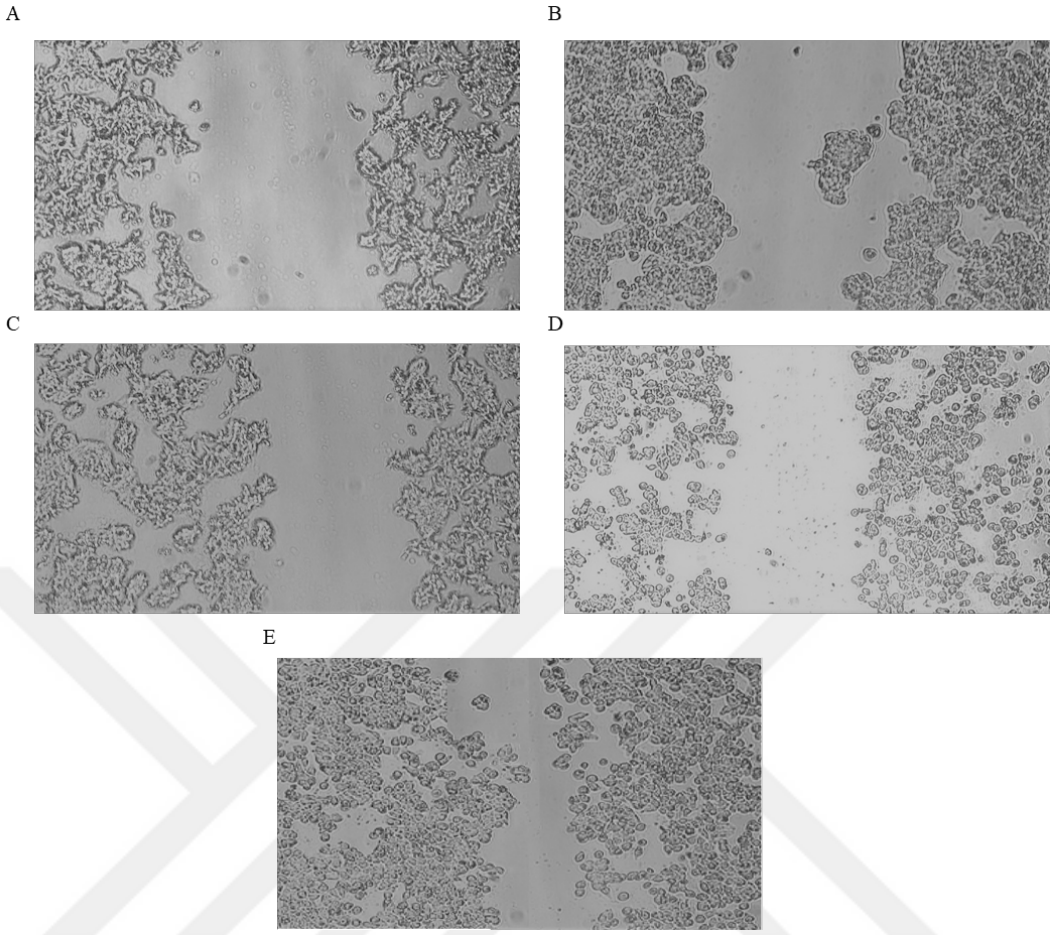
Şekil 93. HT-29 hücrelerinin 10 µg/ml 5FU verildikten sonra oluşturulan yara alanının 0. (A), 6. (B), 12. (C), 18. (D) ve 24. (E) saat görüntüleri (20X).



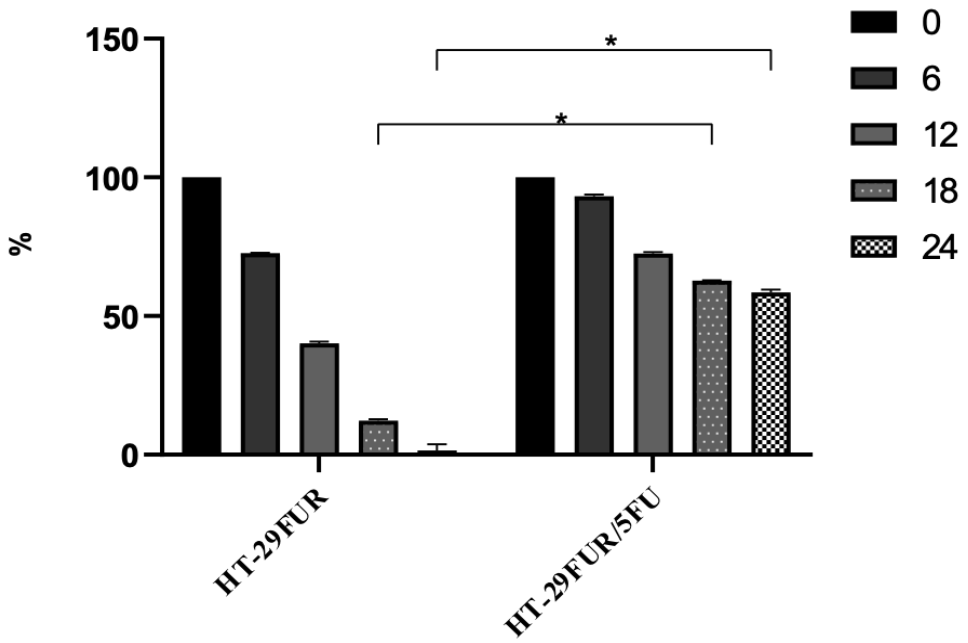
Şekil 94. 5FU muamelesiz ve farklı dozlarda 5FU muameleli HT-29 hücrelerinin migrasyon yetenekleri.



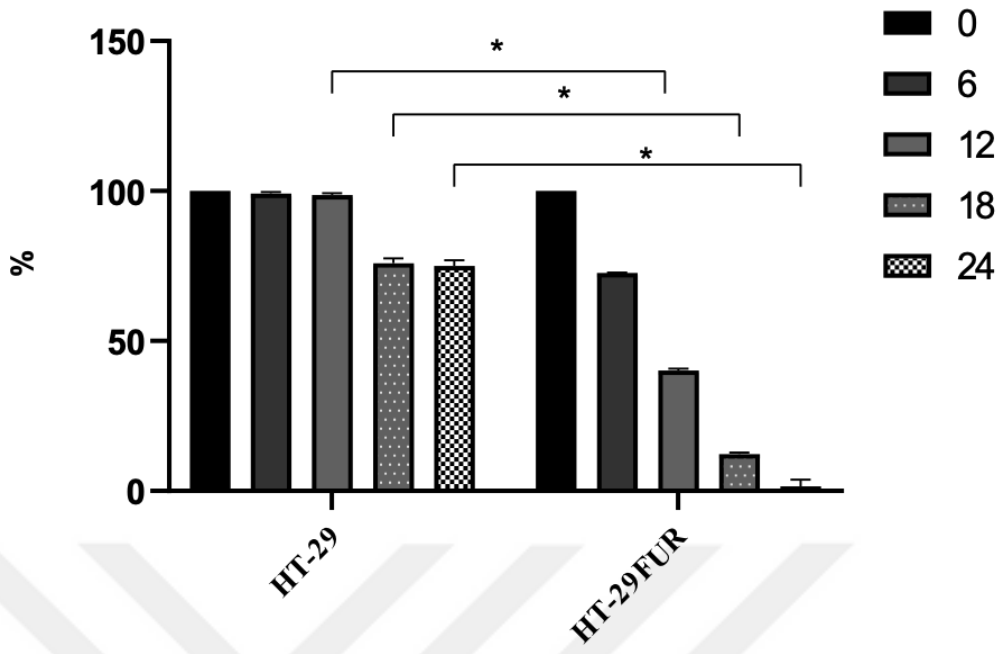
Şekil 95. HT-29FUR hücrelerinin yara alanının 0. (A), 6. (B), 12. (C), 18. (D) ve 24 (E) saat görüntüleri (20X).



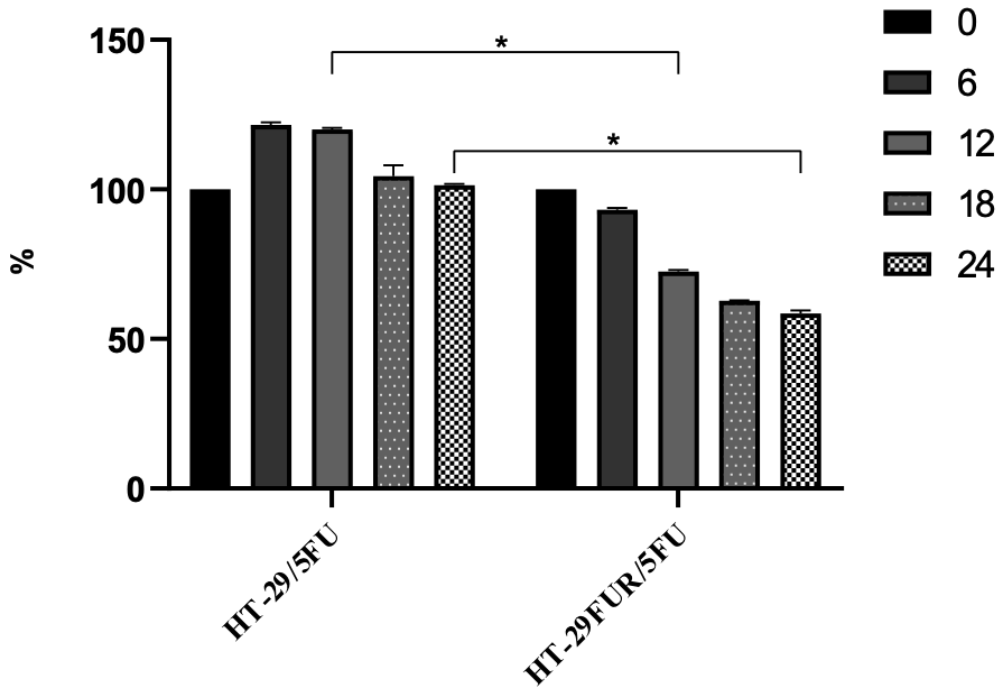
Şekil 96. HT-29FUR hücrelerinin 10 µg/ml 5FU verildikten sonra oluşturulan yara alanının 0. (A), 6. (B), 12. (C), 18. (D) ve 24 (E) saat görüntüleri (20X)



Şekil 97. 5FU muamelesiz ve farklı dozlarda 5FU muameleli HT-29FUR hücrelerinin migrasyon özellikleri (*p<0.001, İki yönlü ANOVA)



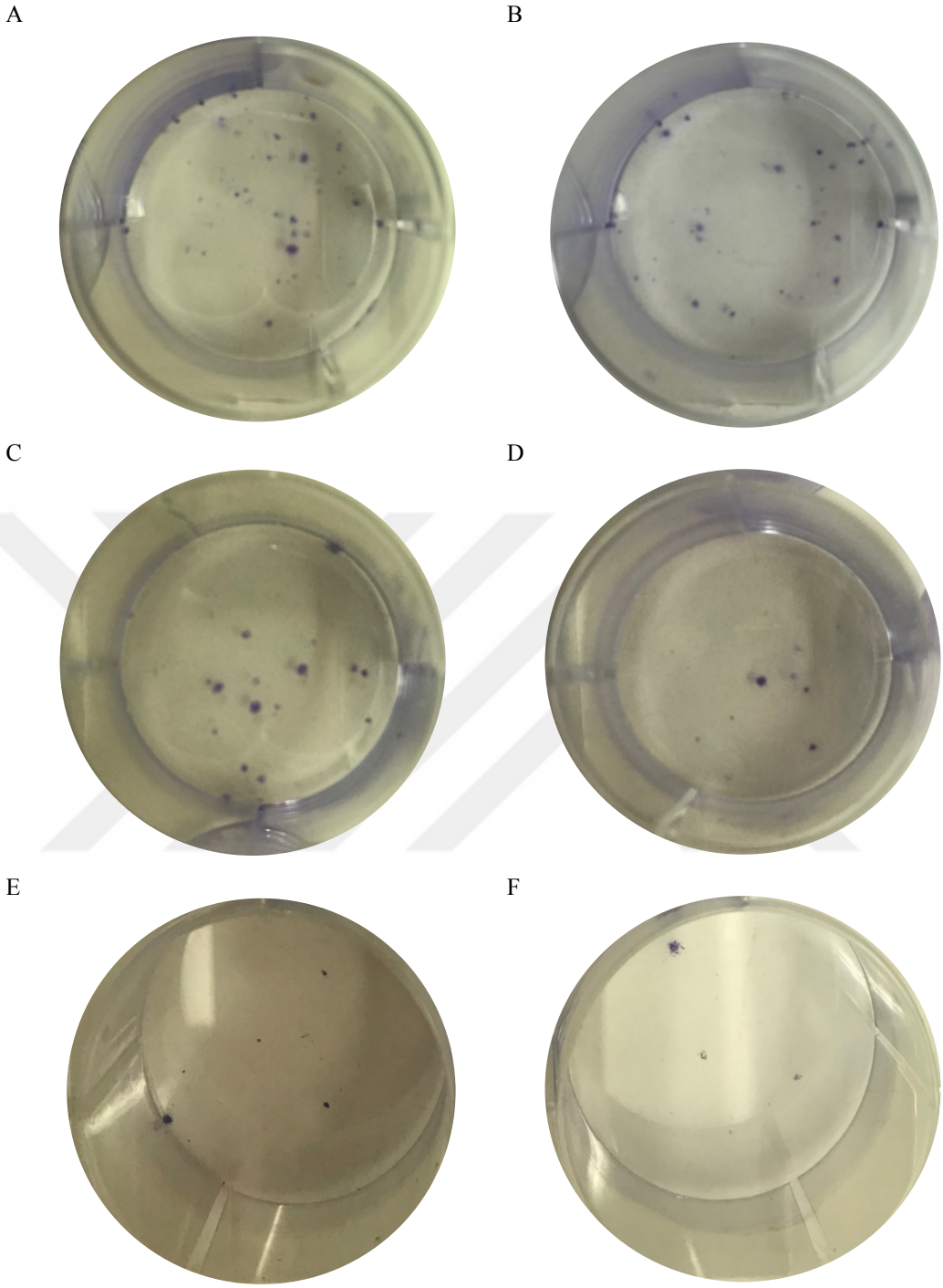
Şekil 98. H29 hücrelerine göre HT-29FUR hücrelerinin daha yüksek migrasyon yeteneği olduğu saptandı (*p<0.001, İki yönlü ANOVA)



Şekil 99. 5FU muameleli HT-29 ve HT-29FUR hücrelerinin migrasyon yetenekleri (*p<0.001, İki yönlü ANOVA).

4.6.3. KK Hücrelerinin 5FU'ya Karşı Kazanım Sürecinde Hücrelerin Koloni Oluşturma Yetenekleri

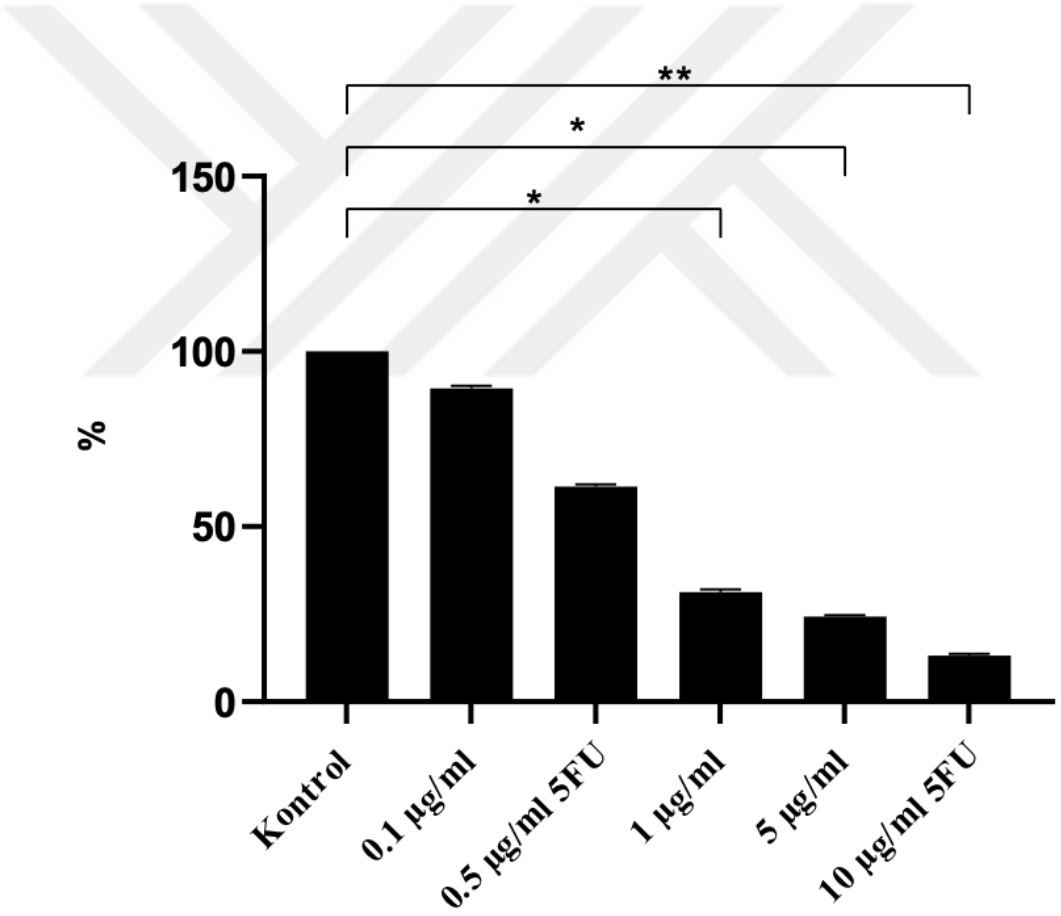
Hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri hücre agresifliğini gösteren bir diğer özelliktir. 5FU direnci kazanım sürecinde HT-29 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerini incelemek için öncelikle HT-29 hücreleri analiz edildi. HT-29 hücrelerinin ortalama koloni sayısı 29 olarak tespit edildi. 0.1 µg/ml 5FU muamelesinden sonra koloni sayısının 26'ya, 0.5 µg/ml 5FU muamelesinden sonra 18'e, 1 µg/ml 5FU' dan sonra 9'a, 5 µg/ml 5FU'dan sonra 7'ye, 10 µg/ml 5FU'dan sonra ise 4'e düştüğü tespit edildi. HT-29 hücrelerinde 0.5 µg/ml 5FU muamelesi ve sonraki dozlardan sonra azalan koloni sayısı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.001$, Şekil 100, Tablo 43, Şekil 101).



Şekil 100. 5FU muamelesiz HT-29 (A) hücrelerine göre 0.1 µg/ml (B), 0.5 µg/ml (C), 1 µg/ml (D), 5 µg/ml (E), 10 µg/ml (F) 5FU muamelesinden sonra HT-29 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği

Tablo 43. HT-29 hücrelerinin farklı dozlarda uygulanan 5FU muameleleri sonrası oluşturdukları koloni sayıları, kolonilerin kaplama verimlilikleri ve kolonilerin oluşum oranları.

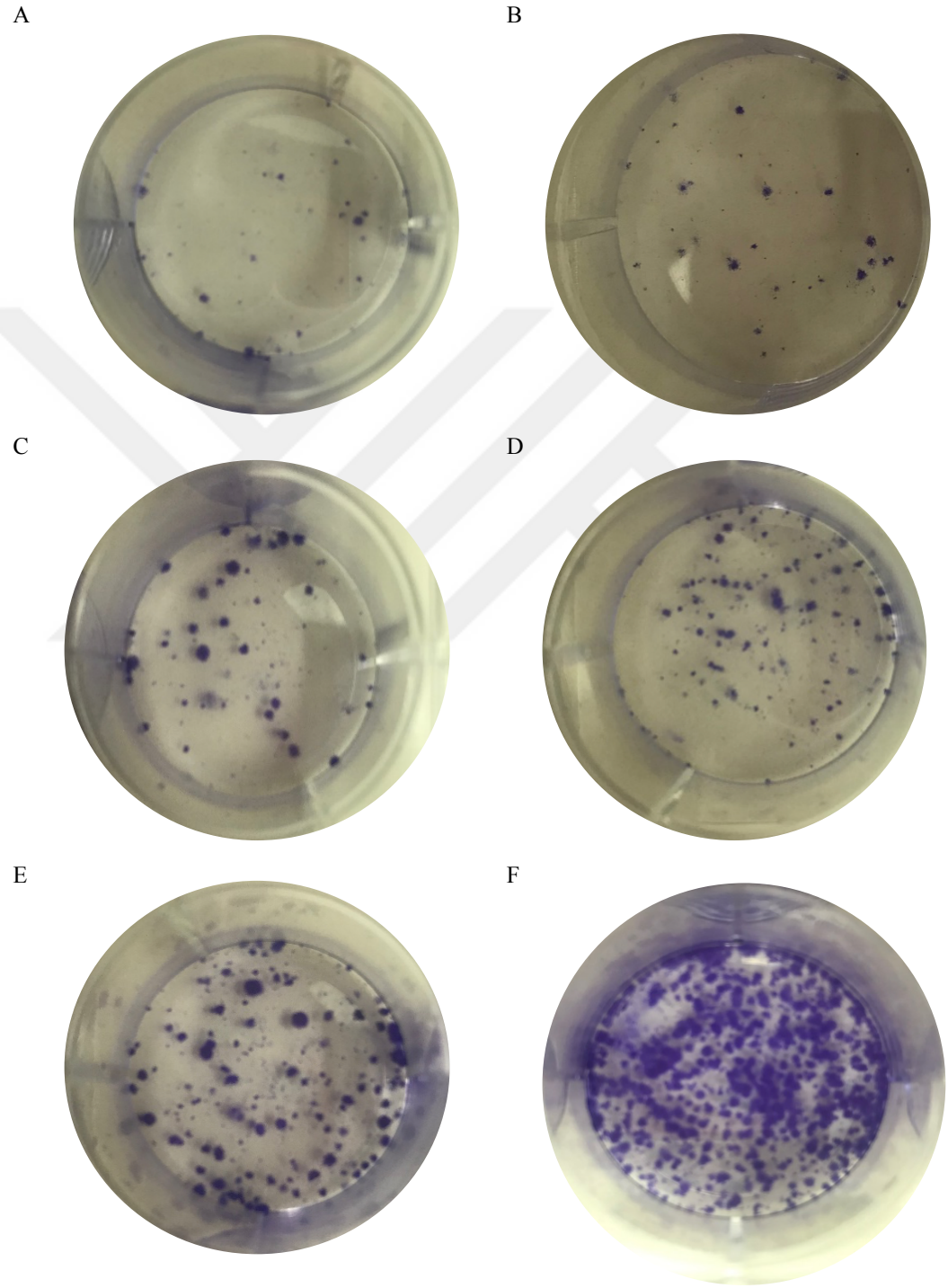
Dozlar	Ortalama Koloni Sayısı	Kaplama Verimliliği (%)	Koloni Oluşum Oranı(%)
Kontrol	29	29.2	100
0.1 µg/ml	26	26.1	89.6
0.5 µg/ml	18	18.2	62.1
1 µg/ml	9	9.1	31.0
5 µg/ml	7	7.3	24.1
10 µg/ml	4	4.0	13.7



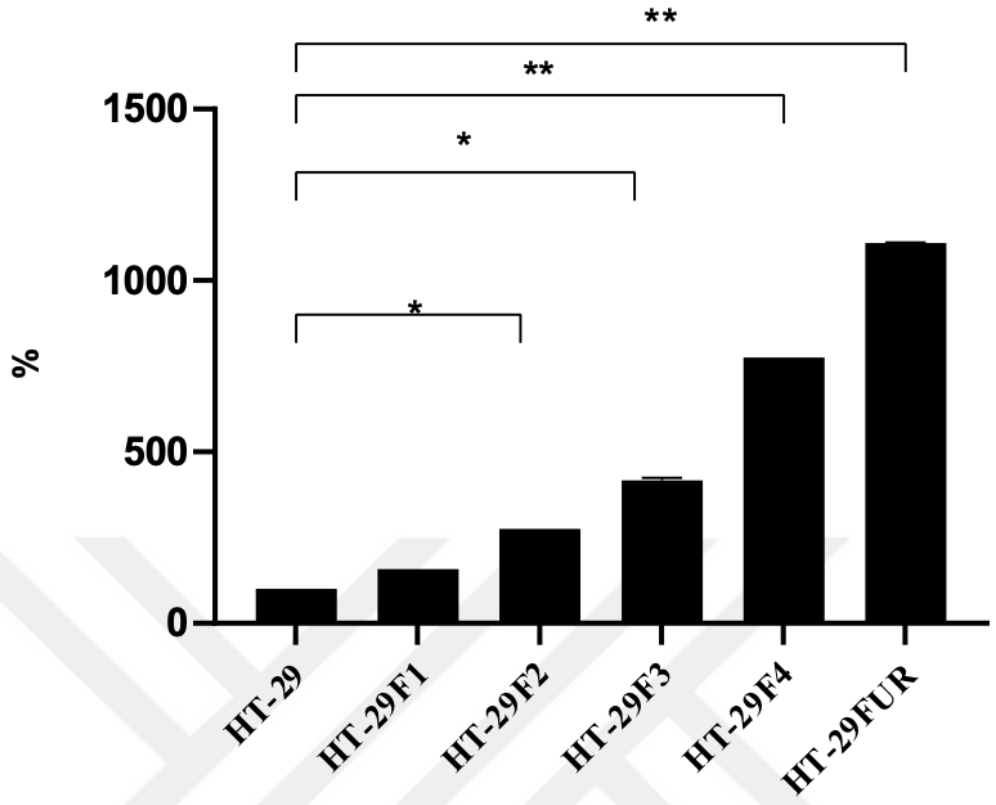
Şekil 101. HT-29 hücrelerine uygulanan farklı dozlarda 5FU muamelesinden sonra hücrelerin azalan koloni oluşturma yetenekleri (*p<0.05, **p<0.001, Bağımsız t-test).

HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanım sürecinde her bir doz artışından sonra elde edilen HT-29F1, HT-29F2, HT-29F3, HT-29F4 hücrelerinin ortalama koloni

sayıları sırasıyla, 46, 80, 120, 235 olarak belirlendi. 5FU' ya dirençli HT-29FUR hücrelerinde ise ortalama koloni sayısının 322 olduğu tespit edildi. HT-29 hücrelerine oranla HT-29FUR hücrelerinde koloni sayısının %1110 istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edildi (Şekil 102, Tablo 44, Şekil 103).



Şekil 102. HT-29 (A), HT-29F1 (B), HT-29F2 (C), HT-29F3 (D), HT-29F4 (E) ve HT-29FUR (F) hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri

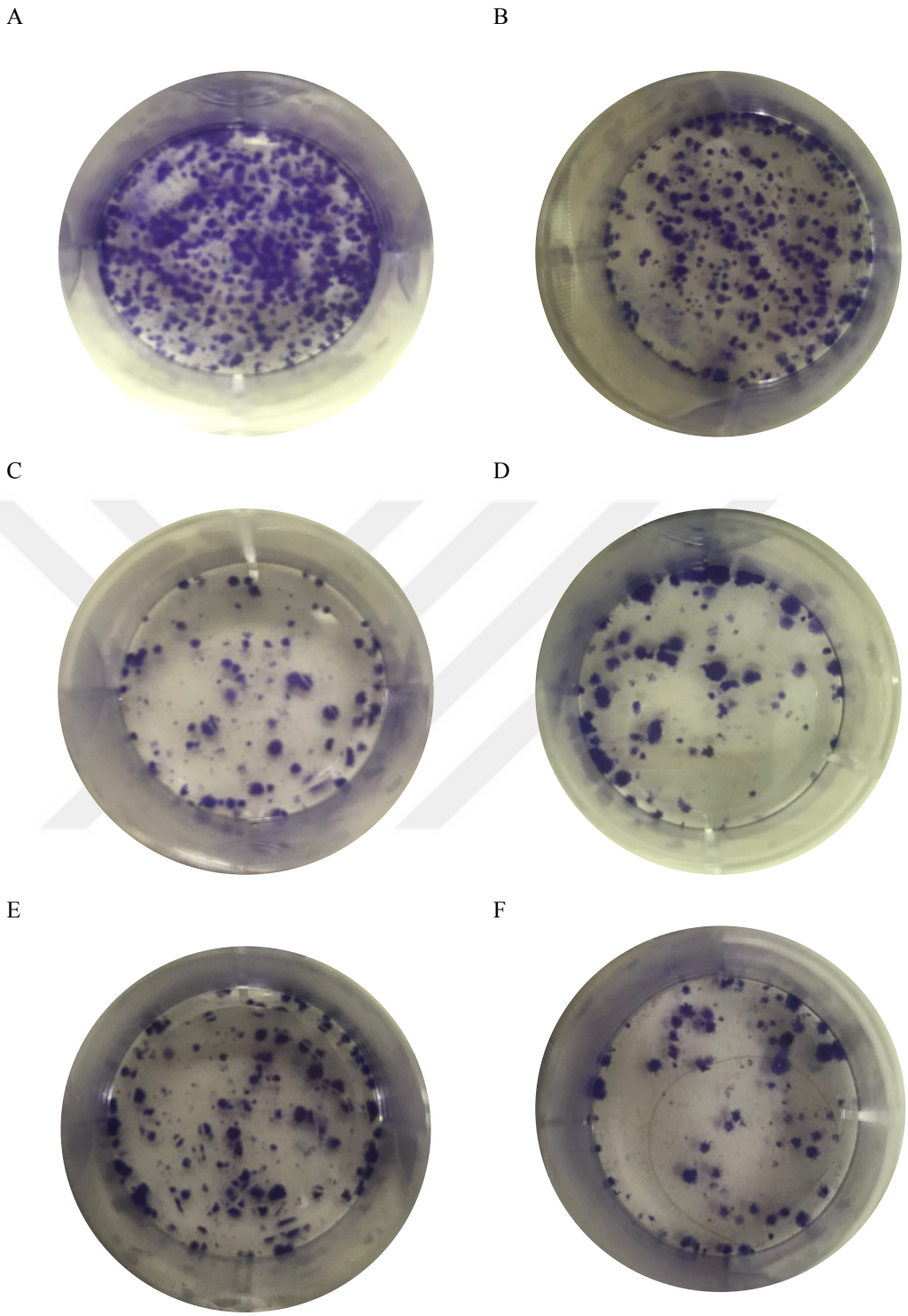


Şekil 103. HT-29 hücrelerinin 5FU direnci kazanımı sırasında artan koloni oluşturma yetenekleri (*p<0.05, **p<0.001, Bağımsız t-test).

Tablo 44. 5FU direnci kazanım sürecinde HT-29 hücrelerinin oluşturdukları koloni sayıları, kolonilerin kaplama verimlilikleri ve kolonilerin oluşum oranları.

Grup	Ortalama Koloni Sayısı	Kaplama Verimliliği (%)	Koloni Oluşum Oranı(%)
HT-29	29	29.2	100
HT-29F1	46	46.3	158.6
HT-29F2	80	80.4	275.8
HT-29F3	120	120.2	413.8
HT-29F4	225	225.1	775.9
HT-29FUR	322	322.0	1.110,30

HT-29FUR hücrelerinin ortalama koloni sayısı 322 olarak tespit edildi. 0.1 µg/ml 5FU muamelesinden sonra koloni sayısının 285'e, 0.5 µg/ml 5FU muamelesinden sonra 178'e, 1 µg/ml 5FU' dan sonra 152'ye, 5 µg/ml 5FU'dan sonra 164'de, 10 µg/ml 5FU'dan sonra ise 112'ye düştüğü tespit edildi. HT-29FUR hücrelerinde 0.5 µg/ml 5FU muamelesi ve sonraki dozlardan sonra azalan koloni sayısı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.001$, Şekil 104, Tablo 45).



Şekil 104. HT-29FUR hücrelerine uygulanan farklı dozlarda 5FU muamelesinden sonra hücrelerin azalan koloni oluşturma yetenekleri (*p<0.05, **p<0.001, Bağımsız t-test).

Tablo 45.. HT-29 hücrelerinin farklı dozlarda uygulanan 5FU muameleleri sonrası oluşturdukları koloni sayıları, kolonilerin lkaplama verimlilikleri ve kolonilerin oluşum oranları.

Grup	Ortalama Koloni Sayısı	Kaplama Verimliliği (%)	Koloni Oluşum Oranı(%)
Kontrol	322	332.0	100
0.1 µg/ml	285	285.2	88.5
0.5 µg/ml 5FU	178	178.1	55.2
1 µg/ml	152	152.3	47.2
5 µg/ml	164	164.0	50.9
10 µg/ml 5FU	112	112.4	34.7

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

KK, Dünya genelinde en yaygın görülen tümörler arasında üçüncü, kansere bağlı ölümler arasında ise ikinci sırada yer almaktadır. Tanı anında veya tedavi sonrasında meydana gelen uzak organ metastazı bu kanserlerdeki başlıca mortalite sebebidir (Sun ve ark., 2017). KK'da tedavi protokolleri, histopatolojik yöntemler ile belirlenen tümör tutulumu, lenf nodu metastazı ve uzak organ metastazına göre şekillendirilen TNM evreleme sistemine göre oluşturulmaktadır (Ouakrim ve ark., 2015). Bu evreleme sistemine göre lenf nodu metastazı ve/veya uzak organ metastazı bulunmayan kolon adenokarsinomları erken evre olarak tanımlanmakta ve bu hastalara sadece küratif cerrahi rezeksiyon uygulanmaktadır. Metastatik lenf bezi tutulumu veya uzak organ metastazı olan kolon adenokarsinomlar ise ileri evre olarak tanımlanmakta ve bu tümörlerde rezeksiyon sonrası 5FU-bazlı adjuvant kemoterapi ve/veya radyoterapi verilmektedir. Ancak müsinöz komponent, taşlı yüzük hücreli karsinom tanısı, perinöral, vasküler ve/veya lenfatik invazyon pozitifliği erken evre tümörlerde kötü prognostik faktörler olarak değerlendirilmekte ve bu grup yüksek risk olarak tanımlanmaktadır. Kötü prognoza sahip olacağı düşünülen bu tümörlere de adjuvant tedavi uygulanmaktadır (Marks ve ark., 2018). KK'ların yaklaşık %30-40'ı tanı anında ileri evre, %60-70'i ise erken evre tümöre sahiptir. Ancak kötü prognostik faktörleri bulunmayan erken evre kolon tümörlerinin yaklaşık %15'inde küratif rezeksiyon yetersiz kalarak ilk 5 yıllık takip süreçlerinde sistemik nüks olarak tanımlanan uzak organ metastazı görülebilmektedir. Bu vakalarda genel sağ kalımın 36 aydan kısa olduğu belirtilmektedir (Yang ve ark., 2018). Bu nedenle tanı anında erken evre tümörü olan bu hastalarda ileride oluşabilecek uzak organ metastazının öngörülmesi tedavi protokollerinin daha etkili hale getirilebilmesi için gereklidir.

Kolon adenokarsinomlarında, MSI, tümörün sol kolon lokalisazyonu, invazyon pozitifliği, migrasyon ve invazyonda görev alan mRNA'lardaki ekspresyon düzensizlikleri birçok çalışma ile kötü prognozla ilişkilendirilen parametrelerdir. Özellikle mRNA ve protein düzeyinde yapılan çalışmalarda EMT mekanizması sistemik nüks oluşumu ile ilişkilendirilmektedir.

Anabilim Dalı'mızda 100 erken evre KK ile gerçekleştirilen çalışmada metastaz ile ilişkili olarak yüksek *MACC1*, düşük *NM23-H1* ekspresyonunun takip süresi içerisinde nüks gelişimi açısından anlamlı olduğu belirlendi. Mevcut çalışmada,

son dönemde metastaz oluşumunun kanıtı olarak değerlendirilen TB'nin bu tümörlerde %68 oranında pozitif olduğu ve TB varlığının metastaz ile ilişkili olduğu belirlendi (Ozturk ve ark., 2018). Ancak elde edilen bulgular parametrelerin az olması nedeniyle sınırlı kalmaktadır.

Mevcut tez çalışmasında bir önceki çalışma grubu revize edilerek ve sayısı arttırılarak *MACC1*, *NM23-H1* ve TB ile beraber, kanser gelişiminde önemi belirlenen LncRNA'lar, metastatik kanserlerin oluşumda temel mekanizma olabileceği belirtilen EMT süreci, sporadik kökenli erken evre KK'larda rolü net bilinmeyen MSI durumu, tümörün demografik ve histopatolojik özellikleri ile birlikte incelenerek, erken evre KK'ların nüksünde etkili olan mekanizmaların aydınlatılması ve nüks potansiyelinin tanı anında saptanmasında kullanılabilecek belirteçlerin tanımlanması amaçlandı. Bu süreçte, değerlendirilen tüm parametrelerin birbirleri ile olan ilişkileri de incelendi. Bununla birlikte nüks oluşumunda anlamlılığı belirlenen parametreler, 5FU direnci geliştirilmiş KK hücrelerinde de incelenerek, nüks potansiyeli saptanabilecek erken evre kolon tümörlerinde standart adjuvan tedavi için uygunlukları araştırıldı.

Erken evre KRK ile ilgili literatürde yer alan çalışmaların çoğunda rektum kanserleri değerlendirilmiştir (Whang ve ark., 2015; Sesendge ve ark., 2017; Qi ve ark., 2018).

Mevcut çalışmada, ilk olarak evre I/II kolon tümörlerinde demografik ve klinopatolojik özelliklerin nüks üzerindeki etkileri değerlendirildi. Yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, T evrelemesi ile nüks oluşumu arasında istatistiki bir anlamlılıkları saptanmadı. Literatürde KK'larda sağ kalımın tümör lokalizasyonuna göre değişiklik gösterdiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır. Merkel ve ark.'larının 305 evre II KRK vakasında gerçekleştirdikleri çalışmada sol tümör lokalisazyonunun, invazyon derinliğinin, ekstramural venöz invazyon durumunun uzak metastazların görülme sıklığı üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermişlerdir. Mevcut tez çalışmasında tümör lokalizasyonu ile kötü prognoz arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmedi (p=0.061). Bu konudaki çalışmalar karşılaştırıldığında Merkel ve ark.'ların (2017) değerlendirdikleri hasta grubunda müsinöz komponentli ve taşlı yüzük hücreli karsinomları ve invazyon pozitif tümörlerin de çalışmaya dahil edildiği görülmektedir. Kötü prognostik faktör taşımayan erken evre KK'larda tümörün lokalizasyonunun, ve T evresinin nüks üzerine anlamlılığını inceleyen farklı araştırmacılara ait bir çalışma bulunmamaktadır. Bir önceki çalışmamıza benzer

şekilde bu çalışmada da tümör lokalizasyonu ve T evresi erken evre KK'larda nüks ile ilişkili bulunmamıştır.

KK'ların prognozunda önemli olduğu düşünülen parametrelerden bir diğeri MSI durumudur. KRK ve KK çalışmalarının birçoğunda MSI-H tümörlerin MSS tümörlere göre dahi iyi bir prognoza sahip olduğu vurgulanmaktadır. Bu durumun MSI-H tümör grubunun 5FU tabanlı kemoterapilere daha iyi cevap vermelerinden kaynakladığı belirtilmektedir (Chang ve ark., 2018). Adjuvan tedavi verilmeyen erken evre KK'larda yapılan çalışmalarda da MSI-H tümörlerinin daha uzun bir sağ kalıma sahip oldukları vurgulanmaktadır. Ancak erken evre KK'ların takip süresinde geliştirdikleri nüks ile MSI durumunu karşılaştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut tez çalışmasında değerlendirilen 126 tümörün 9'u MSI-L, 12'si MSI-H, 105'i ise MSS olarak değerlendirilmiş olup, nüks eden tümörlerde MSI durumunun bir anlamlılığı belirlenmemiştir.

Literatürde TB'nin evre II KK'larda kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bir önceki çalışmamızda da olduğu gibi mevcut tez projesinde revize edilen hasta grubunda TB, nüks oluşumu ile anlamlı bulunmuştur (p=0.048). Ayrıca bir önceki çalışmamıza benzer şekilde, TB varlığı ile birlikte, yüksek *MACC1* ve düşük *NM23-H1* ekspresyonu mevcut tez çalışmasında da nüks ile ilişkili bulundu (sırasıyla; p=0.034, p=0.044). TB varlığı, *MACC1*'in yüksek, *NM23-H1*'in düşük ekspresyonlarının hastalıksız sağ kalım üzerine etkileri her biri için araştırıldığında üç belirtecin her birinin kısa hastalıksız sağ kalım ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi saptandı (sırasıyla; p=0.001, p=0.010, p=0.009).

Artan kanıtlar EMT'nin KK'larda sistemik ve lokal nüksünde önemli rol oynadığını gösterdiğinden, mevcut çalışmada erken evre KK'larda EMT belirteçlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi. EMT süreci, *E-kaderinin* aşağı ve *N-kaderinin* yukarı regülasyonu ile karakterizedir. Ayrıca, bu mekanizmanın etkinliği, Snail, Slug, Zeb1, MMP-9 ve Vimentin gibi birçok transkripsiyon faktör ve protein aracılığı ile takip edilmekledir. Mevcut tez çalışmasında değerlendirilen tümörlerde, normal kolon dokusu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük *E-kaderin*, yüksek *Snail* ve *MMP-9* ekspresyonları belirlenmiştir (sırasıyla; p=0.001, p=0.004, p=0.046). Çalışmada EMT belirteçlerinin birbirleri ile korelasyonu da incelenmiş olup, değerlendirilen tümörlerde aktif bir EMT süreci olduğu

belirlenmiştir. Tez çalışmasında değerlendirilen 126 tümör, nüks durumlarına göre iki gruba ayrıldıklarında, EMT sürecindeki bu aktivitenin takip süresi içerisinde nüks geliştiren 26 tümör dokudaki yüksek ifadesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Literatürde erken evre KK'larda EMT sürecini inceleyen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. EMT aktivitesi, erken evre KK'larda yaş, cinsiyet ve MSI durumu ile istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık göstermezken, EMT pozitifliği, T3 tümörlerinde T1 ve T2 tümörlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. EMT sürecinin TB varlığı ile ilişkisi incelendiğinde TB pozitif tümörlerin %89'unda EMT'nin aktif olduğu belirmiş ve bu ilişki istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.001). TB pozitifliği, düşük *E-kaderin*, yüksek *N-kaderin*, *Snail* ekspresyonları ile istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (sırasıyla; p=0.032, p=0.043, p=0.002). Bununla birlikte düşük *E-kaderin* ekspresyonu kısa hastalıksız sağ kalım ile istatistiksel olarak anlamlılığı belirlenmiştir (p=0.033).

Güncel çalışmalarda, son dönemde tanımlanan LncRNA'ların tümörgenezde önemli rol oynadıklarını gösterilmektedir (Kim ve ark., 2018; Kalluri ve ark., 2018). Bu RNA moleküllerinin, kanserin oluşumundan başlayarak farklılaşma, metastaz yapma ve ilaç direnci geliştirmeye kadar birçok önemli biyolojik süreci düzenledikleri bilinmektedir. Günümüzde KRK gelişiminde birçok LncRNA'nın etkili olduğu belirtilmiştir (Ji ve ark., 2017)). Ayrıca LncRNA'ların KRK'larda metastatik mekanizmayı doğrudan düzenledikleri kanıtlanmıştır. Bununla birlikte bu moleküllerin erken evre KK'larda nüks potansiyelini belirlemede kullanılabilirlikleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Jeon ve ark., 2016; Hay ve ark., 2017). Mevcut tez çalışmasında erken evre KK'larda, birçok tümörde metastaz ile ilişkilendirilen LncRNA'ların ekspresyon profilleri incelenmiş olup, bu tümörlerde, normal kolon dokusuna göre, CRNDE, ANRIL, SNGH16, TUSC7, HULC, PCAT1, DANCR, MEG3, NEAT1, BANCR ve H19'un ekspresyon seviyelerinde istatistiki olarak anlamlı bir değişim bulunmazken, yüksek MALAT1, CCAT1, HOTAIR ve düşük PTENP1 ekspresyonları anlamlı bulunmuştur (sırasıyla; p=0.033, p=0.039, p=0.041, p=0.004).

CCAT1'in yüksek ekspresyonu ilk olarak KRK'larda tanımlanmış bir LncRNA'dır. KRK'ların gelişim modeli olan adeno-karsinoma sekansının ilk basamaklarında görev aldığı bilinmektedir (Baker ve ark., 2017). Ozawa ve ark. (2017) evre II/III KRK'larda yüksek CCAT1 ekspresyonun nüks ile ilişkili olarak

belirlemişlerdir. Mevcut tez çalışmasında CCAT1 nüks gelişimi gözlenen erken evre KK'larda istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farklılığı göstermemiştir. Yüksek CCAT1 ekspresyonu herhangi bir demografik, patolojik ve klinik parametre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Mevcut çalışmada yüksek CCAT1 ekspresyonu MACC1, NM-23H1 ekspresyonları ve TB varlığı ile ilişkilendirilmemiş olup EMT belirteçlerinden sadece yüksek MMP-9 ekspresyonu ile arasında istatistiksel bir anlamlılık belirlenmiştir (MMP9 için, p=0.001). Elde edilen veriler sonucunda CCAT1'in KK'lerin oluşum sürecinde görev aldığı ancak nüks gelişimi belirlenen erken evre KK'ların metastatik sürecinde bir katkıda bulunmadığı belirlenmiştir.

Çalışmalar, HOTAIR'in KRK'larında yer aldığı birçok gastrointestinal tümörlerde yüksek oranda eksprese edildiğini belirtmektedir (Dimg ve ark., 2015; Friedl ve ark., 2016). Luo ve ark. (2016) T3 evresini, lenf nodu metastaz varlığını ve yüksek HOTAIR ekspresyonunun KK için bağımsız birer risk faktörler olarak tanımlamıştır. Tadengelo ve ark. 82 KK'yı, lokalizasyonlarına göre ayırarak HOTAIR ekspresyon durumunu incelemişler, sağ kolon tümörlerinde, sol kolona göre HOTAIR'i istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Ancak değerlendirilen grupta ileri evre kolon tümörlerde yer almaktadır. Mevcut tez çalışmasında, yüksek HOTAIR ekspresyonu ile tümör lokalizasyonu da dahil herhangi bir demografik, patolojik ve klinik parametre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Mevcut çalışmada ayrıca yüksek HOTAIR ekspresyonu *MACC1*, *NM23-H1* ekspresyonları ve TB varlığı ile de ilişkilendirilmemiştir. Yüksek HOTAIR ekspresyonu *Snail*, *Slug* ve *MMP-9*'u ekspresyonlarını artırarak EMT sürecine katkıda bulunduğu öngörülmüştür (sırasıyla, p=0.003, p=0.015, p=0.032). Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda yüksek HOTAIR ekspresyonunun EMT sürecine katkı sağladığı ancak bu durumun bizim çalışmamızda, erken evre KK'larda nükse yol açacak kadar anlamlı bir seviyede olmadığı görülmüştür.

MALAT1, KRK dahil olmak üzere birçok kanser dokusunda yüksek ekspresyon profiline sahiptir. MALAT1 evreII/III kolon tümörlerinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Whang ve ark., 2016). Zheng ve ark.'nın (2016) 146 KRK tümöründe gerçekleştirmiş oldukları çalışmada, yüksek MALAT1 kadınlara göre erkeklerde istatiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Erken evre KK'larda

MALAT1 ekspresyon durumu ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut tez çalışmasında MALAT1 erken evre KK'ların % 57.6'sında yüksek eksprese olduğu görülmektedir. Yüksek MALAT1 ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu ve T evelemesi arasında bir bağlantı saptanmamıştır. Yüksek MALAT1 ekspresyonu, takip süresi içerisinde nüks gelişimi gözlenen KK'larda, nüks gelişimi belirlenmeyen KK'lara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.016). Bununla birlikte TB belirlenen 48 tümörün 42'sinde (%87.5) yüksek MALAT1 ekspresyonu belirlenmiştir. Ayrıca MALAT1'in aşırı ekspresyonu, yüksek *MACC1*, düşük *NM23-H1* ekspresyonları ile istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (sırasıyla; p= 0.001, p=0.012). MALAT1'in yüksek ekspresyonunun, düşük *E-kaderin*, yüksek *Vimentin*, *Snail* ve *Slug* ekspresyonları ile istatistiksel olarak anlamlı olarak ilişkili olduğu belirlenmiştir (sırasıyla; p=0.001, p=.0.008, p=0.001, p=0.024). Bazı çalışmalar MALAT1'in kanser hücresi göçünü ve istilasını düzenlediğini ve EMT ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Literatürde MALAT1'in ZEB1, ZEB2 ve Slug'ı etkileyerek *E-kaderin* kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca KK'larda MALAT1'in *Snail* ekspresyonunu arttırarak EMT mekanizmasını desteklediği belirtilmektedir. Yüksek MALAT1 ekspresyonu kısa hastalıksız sağ kalım ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermektedir (p=0.001). Elde edilen sonuçlar, yüksek MALAT1 ekspresyonunun erken evre KK'larda *MACC1*, *NM23-H1* ile birlikte EMT mekanizmasını tetikleyerek metastaz sürecinde rol oynadığını göstermektedir. Yüksek MALAT1 ekspresyonunun, TB varlığı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermesi bu bulguları desteklemektedir (p=0.001).

Tümör baskılayıcı bir LncRNA olan PTENP1, PTEN'nin miRNA'lar tarafından degradasyonunu önleyerek birçok sinyal yolağının kontrolünü sağlamaktadır. Bu LncRNA'nın düşük ekspresyonu akut lösemide, renal hücreli karsinomada, melenomada, meme kanserlerinde ve hepatoselüler karsinomada gösterilmiş olup KK'lardaki ekspresyon profili ve klinik önemi bilinmemektedir. Mevcut tez çalışmasında PTENP1 ekspresyonu erken evre KK'larda normal kolon dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş gösterdiği belirendi (p=0.004). Düşük PTENP1 ekspresyonu yaş, tümör lokalizasyonu ve T evresi ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermemekle birlikte nüks gelişimi belirlenen erken evre KK'larda, nüks gelişimi gözlenmeyen KK'lara göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük

ekspresyon gösterdiği belirlendi (sırasıyla; p=0.339, p=0.541, p<0.001). Düşük PTENP1 ekspresyonu, TB varlığı ve yüksek *MACC1* ekspresyonu ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterdi (sırasıyla; p=0.007, p=0.015). Düşük PTENP1 ekspresyonun, yüksek *E-kaderin*, düşük *N-kaderin* ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlendi (sırasıyla; p=0.032, p=0.037). Düşük PTENP1 ekspresyonu kısa hastalıksız sağ kalım ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterdiği belirlendi (p<0.001). Literatürde PTENP1 ekspresyonunun EMT sürecindeki rolünü gösteren bir çalışma bulunmamakla birlikte mevcut tez çalışmasında bu LncRNA'nın, EMT'yi ve metastazı baskılama yönünde etki gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmamızda değerlendirilen parametreler ile birlikte ele alınarak, MSI durumunun, TB'nin, tümör lokalizasyonunun, *MACC1*, *NM23-H1*, CCAT1, HOTAIR MALAT1 ve PTENP1 ekspresyonlarının ve EMT belirteçlerinin hastalıksız sağ kalım üzerine etkileri beraber değerlendirildiğinde, MALAT ve *MACC1*'in yüksek, PTENP1 ve *NM23-H1*'in düşük ekspresyonları ile TB varlığının birbirlerinden bağımsız olarak erken evre KK tümörlerinde nüks potansiyelinin belirlenmesinde kullanılabilecek güçlü birer belirteç olabilecekleri belirlenmiştir.

Mevcut tez çalışmalarında gerçekleştirilen hasta-tabanlı değerlendirme sonucunda, erken evre KK tümörlerinde nüks potansiyelinin belirlenmesinde faydalı olabilecek parametreler belirlenmiştir. Bu parametrelerden yararlanılarak erken evre KK'lara adjuvan tedavi uygulanmasının önerilmesi planlanmaktadır. Ancak spesifik biyolojik özelliklere sahip bu tümörlerin standart adjuvan tedaviye verecekleri yanıt bilinmemektedir. Bu tümörler sahip oldukları heterojen moleküler özelliklerinden dolayı tedaviye dirençli olma ihtimalleri bulunmaktadır. Bu nedenle mevcut tezin ikinci kısmında KK hücre hattı olan HT-29 hücrelerinde 5FU direnç modeli geliştirilerek anlamlılığı belirlenen parametrelerin dirençli hücrelerdeki durumları incelendi.

Literatürde 5FU direnci farklı şekillerde oluşturulabilmekte olup en yaygın olarak artan doz modeli kullanılmaktadır. Shimzimu ve ark., (2016) HT-29'unda içerisinde bulunduğu 9 farklı KK hücre hattında 5FU modeli oluştururken, 5FU'nun kanser hücrelerinde sitotoksik etkisini gösterdiği dozu belirlemek için 0.3 μM-1 μM doz aralığı seçmişler, 72 saat sonunda hücrelerin %50'sinin (IC50) 72 saat sonunda

öldüğünü belirlemişlerdir. IC50 dozunun %50'sini başlangıç dozu seçerek hücrelere sürekli aynı dozu uygulamışlar (sabit doz modeli) ve 9 ay sonunda HT-29/FU ismini verdikleri 5FU dirençli HT-29 hücreleri elde etmişlerdir. Akasaka ve ark., (2017) HT-29 hücrelerine 0.125 µg/ml-6 µg/ml arasında artan dozlarda 5FU vererek 1 yılın sonunda 5FUR ismini verdikleri 5FU dirençli HT-29 hücreleri elde etmişlerdir. Li ve ark., 5FU ya karşı dirençli HT-29 5FU-R hücrelerini oluşturmak için HT-29 hücrelerini, 0.2 µg/ml başlayarak, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml 10 µg/ml ve 20 µg/ml şeklinde artan 5FU dozları ile muamele etmişler, 6 ay sonunda hedefledikleri hücreleri oluşturabilmişlerdir. Mevcut tez çalışmasında 2. pasaj HT-29 hücrelerinde önce 5FU'nun sitotoksik etkisini gösterdiği saat ve doz araştırıldı. Hücrelerin %50'sini öldüren doz 1.5 µg/ml ve 72 saat olarak belirlendi. Literatürde 5FU'nun HT-29 hücrelerindeki IC50 değeri farklılık gösterse de etki saati birçoğunda 72 olarak belirlenmiştir. Mevcut çalışmada elde edilen değerler literatürün büyük bir kısmıyla uyumludur. Çalışmalar arasındaki bu doz farkı, hücrelerin pasaj numarası, kullanılan 5FU'nun saflığı ve sitotoksisite testlerinin çeşitliliği ile açıklanmaktadır. Mevcut çalışmada 5FU'nun HT-29 hücrelerinde etkili olduğu saat ve doz bulunduktan sonra Li ve ark.'larının (2016) modelinden faydalanarak Şekil 26'da belirtildiği gibi artan doz modeli oluşturuldu ve bu model ile 6 ayın sonunda 10 µg/ml 5FU dozunu tolere edebilen HT-29FUR hücreleri elde edildi. HT-29FUR hücrelerinin 5FU direncini kanıtlamak için hücre proliferasyon, ve apoptoztoz testleri yapıldı. Literatürdeki çalışmalarda tüm karşılaştırmalar ilaca dirençli hücre ve dirençsiz hücre arasındaki yapılmaktadır (Li ve ark., 2016; Whang ve ark., 2018). Mevcut test çalışmasında ise analizlerin bir çoğu direnç oluşum modelindeki ara basamaklarda da (HT-29F1, HT-29F2, HT-29F3, HT-29F4, HT-29FUR) gösterilmiştir. 5FU ile muamele edilmeyen HT-29 kontrol olarak değerlendirildiğinde, IC50 dozu olarak belirlenen 1.5 µg/ml 5FU dozdaki canlılık HT-29F1-HT-29FUR hücrelerinde arttığı, en yüksek doz olarak belirlenen 10 µg/ml 5FU muamelesinin ise HT-29FUR hücrelerindeki hücre canlılığının, HT-29 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği belirlendi. Oluşturulan direncin gösterilmesinde kullanılan bir diğer yöntem her bir dozdaki apoptozun belirlenmesine dayanmaktadır. Bu analiz yüksek hücre sayısı ile kurulan bir deney prosedürüne sahip olduğundan sadece HT-29FUR ve HT-29 hücreleri arasında gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için hücre canlılığını, nekrozu, erken

ve geç apoptozu gösteren Annexin V testi kullanılmıştır. HT-29 hücrelerinde artan 5FU dozu verildikçe hücre canlılığının azaldığı, erken ve geç apoptozun 10 μg/ml 5FU muamelesinden sonra, 5FU ile muamele edilmeyen HT-29 hücrelerine oranla, istatistiksel olarak arttıkları belirlenmiştir. Bu veri, ilaç direnci olmayan HT-29 hücrelerinde 5FU'nun hücreleri apoptoza teşvik ederek hücre canlılığını azalttığını göstermektedir. HT-29 hücrelerinde elde edilen bu sonuç, literatürde yapılan çalışmalarda ve 5FU'nun KK hücresi üzerine açıklanan etki mekanizması ile paralellik göstermektedir. HT-r9FUR hücrelerinde artan 5FU dozu arttıkça canlılığın azaldığı ama canlılık oranının %80'nin altına inmeyecek, nekrozun, erken ve geç apoptozun arttığı tespit edildi. Ancak 5FU dozu verilmeyen HT-29FUR hücrelerine göre canlılık oranındaki artış, hücre ölüm yollarındaki azalış 5FU dozları uygulanan HT-29FUR hücrelerinde herhangi bir istatiksel anlamlılığa neden olmamıştır. HT-29 ve HT-29FUR hücreleri karşılaştırıldığında, 3. dozdan itibaren HT-29FUR hücrelerinde hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı şekilde artarken, erken ve geç apoptoz istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p=0.023$). Bu bulgular sonucunda HT-29FUR hücrelerinin en yüksek 5FU dozu olarak değerlendirilin 10 μg/ml'a karşı dirençli hale geldiklerin, kanıtlanmaktadır. Bununla birlikte 5FU direnç kazanım sürecinde hücre morfolojileri de inverted mikroskopta incelenmiştir. HT-29 hücreleri artan 5FU dozlarına maruz bırakıldığında mikroskoptaki büyütme alanını kaplayan hücrelerde, özellikle son dozda, önemli ölçüde azalma görülmektedir. HT-29F1 hücrelerinin HT-29 hücrelerine göre daha büyük bir morfolojiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Özellikle HT-29F3 hücreleri ve sonrasında hücre sınırlarının inverted mikroskopta tamamen görünemez hale geldikleri tespit edilmiştir. HT-29F4 hücreleri ise çok farklı bir davranış sergiledikleri belirlenmiştir. Bu hücrelerin 4X'lik büyütme ile incelenmesinde, koloniler halinde bir araya geldikleri, kolonin ortasının ise en yoğun hücre grubunu barındırdığı tespit edilmiştir. HT-29F4'ün ilerleyen haftalarında kolonilerin ortalarındaki bu hücre yoğunluklarının kolonilerden ayrılarak hücre kabı içerisinde yeni bir alanda diğer kolonilere göre daha hızlı bir şekilde çoğaldıkları belirlenmiştir. HT-29FUR hücrelerinde ise koloni oluşumları tamamen ortadan kalkmış olup hücreler HT-29 ve tüm ara süreçteki hücre gruplarına oranla çok daha hızlı şekilde çoğaldıkları gözlemlenmiştir.

Mevcut tez çalışmasında HT-29FUR hücrelerinin elde edildiği çeşitli testler ile onaylandıktan sonra, EMT süreci, metastaz ile ilişkili genlerin ve LncRNA'ların ekspresyon profilleri 5FU direnç kazanımı sürecinde takip edildi. Bu ekspresyon analizlerinde, ilgili belirteçlerin HT-29 hücrelerindeki ekspresyon profilleri bilinmediği için, normal hücre hattı olan HUVEC kontrol olarak kullanıldı. EMT belirteçlerinde *E-kaderin'in* ekspresyonu HT-29 hücrelerine göre HT-29F1 hücrelerinden başlayarak tüm direnç oluşum süreci boyunca istatistiksel olarak anlamlı derece azaldığı, *Snail* ekspresyonu'nun ise HT-29 hücreleri ile karşılaştırıldığında HT-29F2 hücrelerinden itibaren istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir (sırasıyla; p=0.001, p=0.018). Bununla birlikte *MMP-9* ekspresyonunun HT-29 hücreleri ile karşılaştırıldığında direnç oluşum sürecinin sonunda elde edilen HT-29FUR hücrelerinde istatiksel olarak arttığı görülmektedir (p=0.014). Mevcut tez ile 5FU ilaç direnç kazanım sürecinde, hücrelerde EMT mekanizmasının aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, literatürde de bahsedildiği gibi EMT süreci ile ilaç dirençliliği arasında anlamlı bir ilişkinin olduğunu göstermektedir.

5FU direnç kazanım sürecinde HT-29 hücrelerinde metastaz ile ilişkili genlerden *MACC1* ve *NM23-H1*'in ekspresyon profilleri incelendiğinde, *MACC1* ekspresyonunun HT-29 hücrelerine göre HT-29F3 hücrelerinde arttığı, *NM23-H1* ekspresyonunun ise HT-29F2'den itibaren azalmaya başladığı gözlenirken 5FU direnç oluşumu sürecinde bu iki mRNA'nın ekspresyon profillerinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede bir farklılığa ulaşmadığı belirlendi (sırasıyla; p=0.374, p=0.065). Elde edilen bu veri, *MACC1* ve *NM23-H1* ekspresyon değişimlerinin 5FU direnç gelişimde herhangi bir katkı sağlamağını göstermektedir. Literatürde *NM23-H1*'in ilaç dirençliliği üzerine etkisinin gösterildiği bir çalışma bulunmamakla birlikte, *MACC1* KK'larda 5FU direnci ile ilişkilendirilmektedir (Whang ve ark., 2017).

Mevcut tez kapsamında değerlendirilen LncRNA'ların HT-29 hücrelerindeki ekspresyon profilleri bilinmediği için ilk olarak bu moleküllerin ekspresyon profilleri, HUVEC ile karşılaştırılarak, HT-29 hücrelerindeki ekspresyon seviyeleri belirlendi. CRNDE, PCAT1, BANCR ve H19'un ekspresyonları, HUVEC hücreleri ile karşılaştırıldığında HT-29 hücrelerinde herhangi bir istatistiksel anlamlılık göstermezken, MALAT1, CCAT1, HOTAIR, MEG3, NEAT1, DANCR, HULC, SNHG16 ve ANRIL ekspresyonları, HUVEC hücrelerine göre HT-29 hücrelerinde

istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı, PTENP1'in ve TUSC7'nin ekspresyon değerlerinin ise HT-29 hücrelerinde istatistiksel olarak azaldığı belirlenmiştir. 5FU direnci kazanımı sürecinde HT-29 hücrelerinde LncRNA'ların ekspresyon profilleri incelendiğinde ise CCAT1, CRNDE, SNHG16, TUC7, HULC, PCAT1, DANCR, MEG3, BANCR, H19 ve NEAT1'in ekspresyon profillerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmaz iken, MALAT1 ekspresyonunun HT-29F3 hücrelerinden itibaren istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p=0.013$). Bununla birlikte HOTAIR, ANRIL ve PTENP1 ekspresyonları direnç kazanım sürecindeki hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermezken, HT-29 hücreleri ile karşılaştırıldığında, HT-29FUR hücrelerinde HOTAIR ve ANRIL ekspresyonlarının istatiksel olarak anlamlı şekilde arttığı, PTENP1 ekspresyonun ise istatiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (sırasıyla; $p<0.001$, $p=0.041$, $p=0.011$). Mevcut tez verilerinde farklı olarak literatürde H19 ve CCAT1'in 5FU direncine katkı sağladıklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Wang ve ark., HT-29 hücrelerininde içinde bulunduğu 8 farklı KK hücresinde 5FU direnci kazandırmışlar ve H19 ekspresyonunu incelemişlerdir. Çalışmada H19'un 5FU dirençli HT-29 hücrelerinde bir anlamlılığının olmadığı SW116 ve HCT116 hücrelerindeki 5FU direnci ile ilişkilendirildiği belirtilmektedir. Mevcut tez çalışmasında, çalışmanın hasta-tabanlı kısmında kullanılan erken evre KK'lara en yakın özelliği oluşturabilmek amacı ile HT-29 tercih edilmiştir.. HCT116 hücreleri ise tüm KK hücreleri arasında en agresif tümör özelliği göstermektedir. Literatürdeki CCAT1 çalışması ise HT-29 hücrelerinde yapılmış olup direnç oluşum modelinde son doz 1µg/ml, mevcut çalışmasında ise 10 µg/ml'dır (Qiu ve ark., 2018). İki çalışmanın sonuçları arasındaki farklılığın bu durumdan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Literatürde 5FU direncinde MDR mekanizmasının aktivitesi net bilinmemekle birlikte sınırlı sayıdaki çalışma, *ABCC5*'in 5FU'nun metabolitlerini, henüz aktivitelerini göstermeden hücre dışına attığını göstermektedir (Evans ve ark., 2011). Mevcut tez çalışmasında MDR mekanizmasının 5FU direnci üzerine olası katkısını değerlendirmek amacı ile, MDR belirteçlerinden *ABCB1*, *ABCC5*, *ABCC7*, *ABCC9* ve *ABCC11*'nin ekspresyonları mRNA düzeyinde incelendi. Literatürle uyumlu olarak, değerlendirilen MDR belirteçlerinden sadece *ABCC5*'in ekspresyon seviyesinin, ilaç

direnç modelinin ilk basamağından itibaren istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı tespit edildi (p=0.012).

Günümüzde KK'larda meydana gelen sistemik nüks ve ilaç dirençliliği kötü prognoz olarak tanımlanmaktadır ve bu iki mekanizması arasında bir sinerji olduğu savunulmaktadır (De ve ark., 2017; Chang ve ark., 20019). Mevcut tez projesinde, KK'larda metastaza neden olan EMT'nin 5FU direnci kazanım sürecinde aktif olduğu belirlenmiş ve ilaç dirençliliği ile metastazın birbirlerini destekleyen süreçler olabileceği anlaşılmıştır. Bu verinin fonksiyonel analizler ile desteklenmesi için mevcut tezde, hücrelerin metastatik yetenekleri, hücre invazyon ve koloni oluşturma yeteneklerinin değerlendirilmesi ile 5FU direnci kazanımı sırasında HT-29 hücrelerinin invazyon yapma yetenekleri yara iyileştirmesi analiz ile test edildi. Çalışmada direnç gelişiminin metastaz üzerine etkisinin araştırılması amaçlandığından, kontrol grup olarak HT-29 kullanıldığı ve ilk olarak HT-29 hücrelerinin invazyon yetenekleri belirlendi. HT-29 hücrelerinde yara oluşturularak sonra 24 saat boyunca yara alanı incelendiğinde kapanmanın süre sonunda %74.7 olduğu tespit edildi. Bu durum HT-29 hücrelerinin, literatürde de belirtildiği gibi, az invaziv özelliğe sahip oldukları gözlendi. HT-29 hücrelerinde tekrar yara alanı oluşturularak 10 μg/ml 5FU dozu uygulandığında yara alanının 6. 12. ve 18. saatlerde arttığı, 24. saatte ise kapanmanın 0. saat ile aynı oranda olduğu belirlendi. HT-29FUR hücrelerinin invazyon yeteneklerini belirlemek için bu hücrelerde de yara alanı oluşturularak 24 saate kadar izlendi. HT-29FUR hücrelerinde oluşturulan yara alanının 24 saat tamamen kapandığı tespit edildiğinden, bu hücrelerin HT-29 hücrelerine göre çok daha yüksek invazyon özelliğine sahip oldukları belirlendi. HT-29FUR hücrelerinde tekrar yara alanı oluşturulup 10 μg/ml 5FU dozu uygulandığında, 24 saat sonra yara alanının %59 oranında kapandığı tespit edildi. 5FU dozu verildikten sonra HT-29FUR hücrelerindeki 24 saat sonraki yara alanı kapanma oranı, 5FU verilen HT-29 hücrelerindeki yara alanının kapanma oranına göre %69 oranında daha fazla olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Bu durum 5FU direnci gelişen hücrelerin tedavi yanıtının çok düştüğünü göstermektedir.

5FU direnci kazanımı sırasında HT-29 hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri, koloni oluşum analizi ile değerlendirildi. Bu analiz az sayıda hücre ile yapıldığından dolayı 5FU direnç kazanım sürecindeki tüm HT-29 hücrelerinde test

edilebilmiştir. HT-29 hücrelerine göre HT-29F1'den itibaren hücrelerin koloni sayılarında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanırken, HT-29'un koloni oluşturma ile karşılaştırıldığında HT-29FUR hücrelerinde bu yeteneğin 11 kat arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Mevcut tez çalışmasında, invazyon ve koloni testleri sonucunda, KK hücrelerinde ilaç direnci gelişimi ile metastaz gelişim sürecinin birlikte meydana geldiği gösterilmiştir.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde tezin hasta-tabanlı çalışma kısmında; hastaların tümör dokuları normal dokuları ile karşılaştırıldığında;

1. 2.09 kat ve üzeri yüksek *MACC1* ekspresyonu varlığı
2. 1.8 kat ve üzeri düşük *NM23-H1* ekspresyonu varlığı
3. 2.2 kat ve üzeri yüksek MALAT1 ekspresyonu varlığı
4. 3 kat ve üzeri düşük PTENP1 ekspresyonu varlığı
5. TB varlığı mevcut ise bu hastaların takip süresi içerisinde nüks etme potansiyellerinin olabileceği belirlenmiştir.

Tümör dokusunda bu özelliklerden en az birine sahip hastalara uygulanacak rezeksiyonun yetersiz kalabileceği öngörülmektedir.

Mevcut tezde elde edilen bulguların hasta sayısının ve analiz yöntemleri ile düzenlenmesine ihtiyaç bulunmakla birlikte, birlikte elde edilen bulgulara göre, 1. ve 2. grup tümörlere sahip hastalara cerrahi rezeksiyon sonrası adjuvan tedavi planlaması önerilebilmektedir. Bununla birlikte, mevcut tezin in-vitro çalışma kısmında elde edilen verilerden yüksek dirençli hücrelerde MALAT1 ekspresyonunun yüksek, PTENP1 ekspresyonunun ise düşük olduğu belirlendiğinden 3. ve 4. grupta yer alan tümörlerde 5FU'ya karşı kazanılmış ilaç direnci olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple mevcut tezde, kötü prognostik faktörlere sahip olmayan erken evre KK hastalarında, tümör dokuda yüksek MALAT1 ve/veya düşük PTENP1 ekspresyonu belirlenen hastaların nüks gelişiminin önlenmesi amacıyla kullanılabilecek yeni tedavi moleküllerinin geliştirilmesine ihtiyaç olduğu savunulmaktadır.

TB pozitif tümörlerdeki ilaç direncinin öngörülebilmesi için, adjuvan tedavi verilen tümör gruplarındaki TB varlığı ile hastaların progresyonlarının inceleneceği retrospektif çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Mevcut tez çalışması ile,

- Kötü prognostik faktörleri bulunmayan erken evre KK'larda gelişen nüks oranı ilk kez ortaya konmuştur.
- Kötü prognostik faktörleri bulunmayan erken evre KK'larda EMT mekanizması, MSI durumu, metastaz ile ilişkili genlerin ve LncRNA'ların ekspresyon profilleri ilk kez değerlendirilmiştir.

5FU direnci oluşum sürecindeki her bir basamakta elde edilen hücrelerdeki EMT mekanizması, metastaz ile ilişkili genlerin ve LncRNA'ların ekspresyon profilleri ilk kez belirlenmiştir.

Mevcut tez çalışmasından elde edilen bulguların erken evre KK'larda prognozu öngörmede ve hastalarda nüks gelişimini önlemede yeni ilaç moleküllerinin geliştirilmesinde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Aasland D, Götzinger L, Hauck L et al (2019) 5FU Induces Senescence and Repression of DNA Repair Pathways in Colorectal Cells via Activation of ATR-CHK1, p21, and NF-κB. Cancer Res 1;79(1):99-113.

Abal M, Planaguma J, Gil-Moreno A et al (2006) Molecular pathology of colon cancer: transcriptional signature in endometrioid tumors. Histol Histopathol 21:197–204.

Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS (2010) WNT signaling in colorectala: lessons learned from bench to bedside. Neuro Oncol 12:882–889.

Akveli K, Zadeh G, Mansouri S et al (2015) Colorectal cancer: pathology, molecular mechanisms and markers. Acta Neuropathol 129(6):829-48.

Alel´u-Paz R, Ashour N, Gonz´alez-Corpas A et al (2012) DNAMethylation, HistoneModifications, and Signal Transduction Pathways: A Close Relationship in Colorectal Pathophysiology Hindawi Publishing Corporation Journal of Signal Transduction Volume 2012: 956958.

Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA et al (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. Annu Rev Pharmacol Toxicol 39: 361–98: 361–98.

Arora RS, Altson RD, Eden TO et al (2009) Age-incidence patterns of primary colon tumors in England. Neuro Oncol 11(4):403–13.

Arvanitis D, Malliri A, Antoniou D et al (1991) Ras p21 expression in brain tumors: elevated expression colorectal cancer. In Vivo 5:317–321

Baker DJ, Childs BG, Durik M et al (2016) Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. Nature 530, 184–189.

Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T et al (2011) Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. Nature 479, 232–236.

Bartoli R, Fernandez-Banares F, Navarro E et al (2000) Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats:modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E (2) synthesis. Gut 46: 191–199.

Batista PJ, Chang HY (2013) Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. Cell 152:1298-307.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR et al (2001) Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. Hum Mol Genet 10:687–692.

Bielak-Zmijewska A, Grabowska W, Ciolko A et al (2019) The Role of Curcumin in the Modulation of Ageing. Int J Mol Sci 12;20(5).

Borah A, Raveendran S, Rochani A et al (2015) Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. Oncogenesis 4(11), e177.

Brabletz S, Bajdak K, Meidhof S et al (2011) The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. EMBO J 30: 770–782.

Bredel M (2011) Anticancer drug resistance in primary human CRC tumors. Brain Res. Rev 35, 161–204.

Brown JM, Attardi LD (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response. Nat. Rev. Cancer 5, 231–237.

Burgess R, Jenkins R, Zhang Z (2008) Epigenetic changes in colon tumors. Cancer biology & therapy 7(9), 1326-1334.

Cai B, Song XQ, Cai JP et al (2014) HOTAIR: A cancer-related long non-coding RNA. Neoplasma 61: 379-391.

Cancer Genome Atlas Research Network, 231 Collaborators (2008) Comprehensive genomic characterization defines human colon cancer genes and core pathways. Nature 455:1061– 1068.

Chaicharoenaudomrung N, Kunhorm P, Promjantuek W et al (2019) Fabrication of 3D calcium-alginate scaffolds for human glioblastoma modeling and anticancer drug response evaluation. J Cell Physiol doi: 10.1002/jcp.28608.

Chakrabarti I, Cockburn M, Cozen W et al (2005) A population-based description of CRC in Los Angeles County, 1974–1999. Cancer 104:2798–06.

Chen JR, Yao Y, Xu HZ et al (2016) MMR Mutations as Prognostic Markers in Patients With CRC Medicine (Baltimore) 95:e2583.

Chen L, Tweddle DA (2012) p53, SKP2, and DKK3 as MYCN Target Genes and Their Potential Therapeutic Significance. Front Oncol 2:173.

Chen Y, Du H, Bao L et al (2018) LncRNA PVT1 promotes ovarian cancer progression by silencing miR-214. Cancer Biol Med 15: 238-250.

Chi D, Zhang W, Jia Y et al (2019) Spalt-Like Transcription Factor 1 (SALL1) Gene Expression Inhibits Cell Proliferation and Cell Migration of Human Glioma Cells

Through the Wnt/β-Catenin Signaling Pathway. Med Sci Monit Basic Res 1;25:128-138.

Cohen A, Holmen S, Colman H (2013) APC and KRAS Mutations in Gliomas. Curr NeurolNeurosci Rep 13(5): 345.

Connelly JM, Malkin MG (2007) Environmental risk factors for CRC. Curr Neurol Neurosci Rep 7(3):208-14.

Cragg GM, Newman DJ (2006) Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. J Ethnopharmacol 22;100(1-2):72-9.

Crespo I, Vital A.L, Gonzalez-Tablas M et al (2015) Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme Am. J Pathol 185:1820-1833.

Dačević M, Isaković , Podolski-Renić A et al (2013) Purine nucleoside analog--sulfinosine modulates diverse mechanisms of cancer progression in multi-drug resistant cancer cell lines. PLoS One 8(1):e54044.

Dang L, Jin S, Su SM (2010) IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. Trends Mol Med 16:387–397.

De la Iglesia N, Konopka G, Puram SV et al (2008) Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. Genes Dev 22:449–462.

De Magalhaes JP, Passos JF (2018) Stress, cell senescence and organismal ageing. Mech. AgeingDev 170, 2–9.

Deorah S, Lynch CF, Sibenaller ZA et al (2006) Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001. Neurosurg Focus 20(4):E1.

Ding C, Yang Z, Lv Z et al (2015) Long non-coding RNA PVT1 is associated with tumor progression and predicts recurrence in hepatocellular carcinoma patients. Oncol Lett 9:955–963.

Discher DE, Janmey P, Wang Y (2005) Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. Science 310: 1139–1143.

Dobes M, Khurana VG, Shadbol TB et al (2011) Increasing incidence of glioblastoma and meningioma, and decreasing incidence of Schwanoma (2000–2008); Findings of a multicentric Australian study. Surg Neurol In 2:176.

Ducrest AL, Szutorisz H, Lingner J et al (2002) Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. Oncogene 21:541–552.

Duesberg P, Mandrioli D, Mccormack A et al (2011) Is carcinogenesis a form of speciation? cell cycle 10: 2100-2114.

Dziurzynski K, Chang SM, Heimberger AB et al (2012) Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. Neuro Oncol 14: 246–255.

Evans SM, Judy KD, Dunphy I et al (2004) Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. Clin Cancer Res 10:8177–8184.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J et al (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc 1(5):2315-9.

Friedl P, Gilmour D et al (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol 10:445-57.

Friedl P, Wolf K (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. J Cell Biol 188:11-9.

Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM et al (1999) Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. Am J Pathol 155:387–394.

Fujisawa T, Rubin B, Suzuki A (2012) Cysteamine suppresses invasion, metastasis and prolongs survival by inhibiting matrix metalloproteinases in a mouse model of human pancreatic cancer. PLoS One 7:e34437.

Gausia SK, Markou M, Voulgaris S et al (2009) Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in northwest Greece and study of potential predisposing factors, 2005–2007. Neuroepidemiology 33(2):89–95.

Gertler R, Rosenberg R, Stricker D et al (2004) Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol 22:1807– 1814.

Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D (2014) Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. Nat Rev Cancer 14:430–439.

Goligorsky MS, Hirschi K (2016) Stress Induced Premature Senescence of Endothelial and Endothelial Progenitor Cells. Adv. Pharmacol 77, 281–306.

Greenburg G, Hay ED (1982) Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express charac-teristics of migrating mesenchymal cells. J Cell Biol 95(1):333–339.

Gros P, Croop J, Housman D (1986) Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. Cell 47: 371–380.

Gu H, Feng J, Wang H et al (2016) Celastrus orbiculatus extract inhibits the migration and invasion of human glioblastoma cells in vitro. BMC Complement Altern Med 6;16(1):387.

Hamburger A, Salmon SE (1997) Primary bioassay of human tumor stem cells. Science 197: 461-3.

Hamdi HK, Castellon R (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor, Biochem Biophys Res Commun 2;334(3):769-78.

Han J, Talorete TP, Yamada P et al (2009) Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells, Cytotechnology 59(1):45-53.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A et al (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. Nature387:296–299.

Hauser MA, Aboobakar IF, Liu Y et al (2015) Genetic variants and cellular stressors associated with exfoliation syndrome modulate promoter activity of a lncRNA within the LOXL1 locus. Hum. Mol. Genet 24, 6552–6563.

Hay ED (1968) Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick em-bryo. In: Fleischmajer R, Billingham RE, Eds. Epithelial-Mesenchymal Interactions. Williamsand Wilkins Baltimore p. 31–55.

Henson JW, Schnitker BL, Correa KM et al (1994) The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. Ann Neurol 36:714–721.

Hesari A, Rezaei M, Rezaei M et al (2018) Effect of curcumin on glioblastoma cells. J Cell Physiol 234(7):10281-10288.

Huang EC, McEntee MF, WhelaN J (2012) Zyflamend, a combination of herbal extracts, attenuates tumor growth in murine xenograft models of prostate cancer Nutr. Cancer 64 pp. 749-760.

Hurley JB, Simon MI, Teplow DB et al (1984) Homologies between signal transducing G proteins and ras gene products. Science 226:860–862.

Huse JT, Holland EC (2010) Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. Nat Rev Cancer 10:319–331.

Hutchinson L, Kirk R (2011) High drug attrition rates—where are we going wrong? Nat Rev Clin Oncol 8(4):189–190.

Ilina O, Friedl P (2009) Mechanisms of collective cell migration at a glance. J Cell Sci 122:3203-8.

Interphone StudyGroup (2010) Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. Int J Epidemiol 39: 675–694.

Iser IC, Pereira MB, Lenz G et al (2017) The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation. Med Res Rev 37(2):271-313.

Iyer MK, Niknafs YS, Malik R et al (2015) The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. Nat. Genet 47, 199–208.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI (1997) Osteogenicdifferentiation of purified, culture-expanded human mesenchymalstem cells in vitro. J Cell Biochem 64(2):295–312.

Jeon HY, Kim JK, Ham SW et al (2016) Irradiation induces glioblastoma cell senescence and senescence-associated secretory phenotype. Tumour Biol 37, 5857–5867.

Jeon HY, Park CG, Ham SW et al (2017) BRM270, a Compound from Natural Plant Extracts, Inhibits Glioblastoma Stem Cell Properties and Glioblastoma Recurrence. J Med Food 20(9):838-845.

Ji P, Diederichs S, Wang W et al (2003) MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. Oncogene 22: 8031-8041.

Jia P, Cai H, Liu X et al (2016) Long non-coding RNA H19 regulates glioma angiogenesis and the biological behavior of glioma-associated endothelial cells by inhibiting microRNA-29a. Cancer Lett 381: 359-369.

Jiang G, Jiang AJ, Xin Y et al (2014) Progression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and temozolomide resistance in cancer research. Molecular biology reports 41(10), 6659-6665.

Jiang X, Yan Y, Hu M et al (2016) Increased level of H19 long noncoding RNA promotes invasion, angiogenesis, and stemness of glioblastoma cells. J Neurosurg 124: 129-136.

Jonkman JE, Cathcart JA, Xu F et al (2014) An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. Cell Adh Migr 8(5):440-51.

Kalluri R, Weinberg RA (2009) Te basics of epithelial-mesenchymal transition. J. Clin. Invest 119, 1420–1428.

Kanzawa T, Germano IM, Kondo Y et al (2003) Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. Br J Cancer 922–929.

Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W et al (2018) 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. Arch Med Sci 14(4): 910–919.

Ke J, Yao YL, Zheng J et al (2015) Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits malignant biological behaviors of human glioma cells via modulation of miR-326. Oncotarget 8;6(26):21934-49.

Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P et al (2012) APC mutation nCRC defines clinically and biologically distinct. Acta Neuropathol 124(3):439–47.

Kim YZ (2014) Altered Histone Modifications in Gliomas Brain Tumor Res Treat 2(1):7-21.

Kleihues P, Cavenee WK (2000) Pathology and genetics of tumours of the nervous systems, World Health Organization Classification of Tumours, IARC Press, Lyon 10-19.

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW et al (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. J. Neuropathol. Exp. Neurol 61, 215–225.

Kleihues P, Peter C. Burger et al (1993) The New WHO Classification of Brain Tumours Brain Pathology 3: 255268.

Kondo Y, Katsushima K, Ohka F et al (2014) Epigenetic dysregulation in glioma Cancer Sci 105(4):364.

Kornberg RD, Lorch Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. Cell 98:285-94.

Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. Nature 387:299–303.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y et al (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. J Cell Sci. 113 (Pt 20):3613-22.

Labuhn M, Jones G, Speel EJM et al (2001) Quantitative real-time PCR does not show selective targeting of p14(ARF) but concomitant inactivation of both p16(INK4A) and p14(ARF) in 105 human primary gliomas. Oncogene 20:1103–1109.

Lasarge CL, Danzer SC (2014) Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation Front Mol Neurosci 14;7:18.

Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE et al (2015) Cancer stem cells in glioblastoma. Genes Dev 29(12): 1203–1217.

Lecomte N, Njardarson JT, Nagorny P et al (2011) Emergence of potent inhibitors of metastasis in lung cancer via syntheses based on migrastatin. Proc Natl Acad Sci U S A 108:15074-8.

Lee CH, Jung KW, Yoo H et al (2010) Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea. J Korean Neurosurg Soc 48(2):145–52.

Lee JM, Dedhar S, Kalluri R et al (2006). The epithelial-mesenchymal transition: New insightsin signaling, development, and disease. J Cell Biol 172(7):973–981.

Li J, Liu H, Ramachandran S et al (2010) Grape seed proanthocyanidins ameliorate Doxorubicin-induced cardiotoxicity. Am J Chin Med 38(3):569-84.

Li M, Zhang Y, Liu Z et al (2007) Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression. Proc Natl Acad Sci USA 104:18636–18641.

Li T, Mo X, Fu L et al (2016) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer. Oncotarget 23;7(8):8601-12.

Li W, Wei W, Zhu S et al (2009) Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. Cell Stem Cell 4(1):16–9.

Lin AB, McNeely SC, Beckmann RP (2017) Achieving Precision Death with Cell-Cycle Inhibitors that Target DNA Replication and Repair. Clin. Cancer Res 23, 3232–3240.

Liu C, Sage JC, Miller MR (2011) 5FU resistance in CRC. Cell 146(2):209–221.

Liu L, Yang J, Zhu X et al (2016) Long noncoding RNA H19 competitively binds miR-17-5p to regulate YES1 expression in thyroid cancer. FEBS J 283: 2326-2339.

Lopes LC, Oliveira SCB, Oliveira-Brett AM (2013) Temozolomide chemical degradation to 5-aminoimidazole-4-carboxamide – electrochemical study, J.Electroanal.Chem 183–189.

Lu C, Shervington A (2008) Chemoresistance in colorectal tumors. Mol. Cell. Biochem 312, 71–80.

Lu J, Getz G, Miska EA et al (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 435:834–838.

Lu L, Zhang C, Zhu G, et al (2011) Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. Breast Cancer Res BCR 13:R56.

Ma KX, Wang HJ, Li XR et al (2015) Long noncoding RNA MALAT1 associates with the malignant status and poor prognosis in glioma. Tumour Biol 36: 3355-3359.

Maciaczyk D, Picard D, Zhao L et al (2017) CBF1 is clinically prognostic and serves as a target to block cellular invasion and chemoresistance of EMT-like colorn cells. Br J Cancer 27;117(1):102-112.

Maleszewska M, Kaminska B (2013) Is Colorectal an Epigenetic Malignancy? Cancers 2013, 5, 1120-1139.

Mao H, Lebrun DG, Yang J (2012) Deregulated signaling pathways in colorectal: molecular mechanisms and therapeutic targets. Cancer Invest 30(1):48-56.

Mikula-Pietrasik J, Stryczynski L, Uruski P et al (2018) Pro cancerogenic activity of senescent cells: A case of the peritoneal mesothelium. Ageing Res. Rev 43, 1–9.

Mischel PS, Cloughesy TF (2003) Targeted molecular therapy of GBM. Brain Pathol 13:52–61.

Mohammadi A, Mansoori B, Goldar S et al (2015) Effects of Urtica dioica dichloromethane extract on cell apoptosis and related gene expression in human breast cancer cell line (MDA-MB-468) Cell. Mol. biol. (Noisy-le-Grand, France) 62 pp. 62-67.

Molenaar RJ, Maciejewski JP, Wilmink JW et al (2018) Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. Oncogene 37(15):1949-1960.

Molinari F, Frattini M (2013) Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. Front Oncol 3: 326.

Nagaishi M, Nakata S, Ono Y et al (2017) Tumoral and stromal expression of Slug, ZEB1, and ZEB2 in brain metastasis. J Clin Neurosc 46:124-128.

Nagane M, Huang HJ, Cavenee WK (1999) Causes of drug resistance and novel therapeutic opportunities for the treatment of glioblastoma. Drug Resist Updat 2:30-37.

Nagoshi H, Taki T, Hanamura I et al (2012) Frequent PVT1 rearrangement and novel chimeric genes PVT1-NBEA and PVT1-WWOX occur in multiple myeloma with 8q24 abnormality. Cancer Res 72: 4954-4962.

Naylor RM, Baker DJ, Van Deursen JM (2013) Senescent cells: A novel therapeutic target for aging and age-related diseases. Clin. Pharmacol. Ther 93, 105–116.

Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA et al (2016) EMT: 2016. Cell 166: 21–45.

Ohgaki H, Kim YH, Steinbach JP (2010) Nervous system tumors associated with familial tumor syndromes. Curr Opin Neurol 23: 583–591.

Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. Acta Neuropathol 109, 93-108.

Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma The American Journal of Pathology, Vol. 170, No.5 American Society for Investigative Pathology Am J Pathol 170(5):1445-53.

Olmez I, Shen W, McDonald H et al (2015) Dedifferentiation of patient- derived glioblastoma multiforme cell lines results in a cancer stem cell-like state with mitogen-independent growth. J Cell Mol Med 19:1262–72.

Ostrom QT, Gittleman H, Farah P et al (2013) CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. Neuro Oncol 15(Suppl):2ii–56.

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P et al (2014) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011. Neuro Oncol 16 (Suppl 4): iv1–iv63.

Paget JA, Restall IJ, Daneshmand M et al (2012) Repression of cancer cell senescence by PKCiota. Oncogene 31, 3584–3596

Pawlowska E, Szczepanska J, Szatkowska M et al (2018) An Interplay between Senescence, Apoptosis and Autophagy in Glioblastoma Multiforme-Role in Pathogenesis and Therapeutic Perspective. Int J Mol Sci 17;19(3).

Petersen OW, Ronnovjessen L, Howlett AR (1992) Interactionwith basement-membrane serves to rapidly distinguish growth anddifferentiation pattern of normal and malignant human breast epithe-lial cells. Proc Natl Acad Sci USA 89(19):9064–9068.

Pouliot N PH, Burrows A (2000) Investigating Metastasis Using In Vitro Platforms. Madame Curie Bioscience Database. Austin (TX): Landes Bioscience, 2000.

Puck TT, Markus PI (1956) Action of X-rays on mammalian cells. J. Exp. Med 103, 653–666.

Puli S, Jain A, Lai JCK et al (2010) Effect of combination treatment of rapamycin and isoflavones on mtor pathway in human glioblastoma (U87) cells Neurochemical Research vol. 35, no. 7, pp. 986–993.

Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O et al (2002) Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. Oncogene 21:8404–8413.

Rajan P, McKay RD (1998) Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. J Neurosci 18:3620–3629.

Rakheja D, Medeiros LJ, Bevan S et al (2013) The emerging role of D-2-hydroxyglutarate as an oncometabolite in hematolymphoid and central nervous. Frontiers in oncology 3, 169.

Ramalho MJ, Andrade S, Coelho MÁN et al (2019) Biophysical interaction of temozolomide and its active metabolite with biomembrane models: The relevance of drug-membrane interaction for Glioblastoma Multiforme therapy. Eur J Pharm Biopharm 136:156-163.

Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS et al (1995) Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. Oncogene 10:2243–2246

Raveh E, Matouk IJ, Gilon M et al (2015) The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis-a proposed unifying theory. Mol Cancer 14: 184.

Reardon D, Herndon J, Peters K et al (2012) Bevacizumab continuation beyond initial bevacizumab progression among recurrent glioblastoma patients. Br J Cancer 107(9):1481–7.

Régina A, Demeule M, Laplante A et al (2001) Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier. Cancer Metastasis Rev 20(1-2):13-25.

Riedel M, Struve N, Müller-Goebel J et al (2016) Sorafenib inhibits cell growth but fails to enhance radio- and chemosensitivity of glioblastoma cell lines. Oncotarget 20;7(38):61988-61995.

Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P et al (2010) Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. Acta Neuropathol 120(5):567–584.

Rincheval V, Renaud F, Lemaire C et al (2002) Bcl-2can promote p53-dependent senescence versus apoptosis without affecting the G1/S transition. Biochem. Biophys. Res. Commun 298, 282–288.

Rorth P (2009) Collective cell migration. Annu Rev Cell Dev Biol 25:407-29.

Ryan D, Robards K (1998) Phenolic compounds in olives. Analyst 123:31–44.

Ryu CH, Yoon WS, Park, KY et al (2012) Valproic Acid Downregulates the Expression of MGMT and Sensitizes Temozolomide-Resistant Glioma Cells. J Biomed Biotechnol 2012:987495.

Scheel C, Weinberg RA (2012) Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. Semin Cancer Biol 22: 396–403.

Schmitt AM, Chang HY (2016) Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. Cancer Cell 29, 452–463.

Schmitt R (2017) Senotherapy: Growing old and staying young? Pflugers Arch 469, 1051–1059.

Schneider M, Ströbele S, Nonnenmacher L et al (2016) A paired comparison between glioblastoma "stem cells" and differentiated cells. Int J Cancer 138(7):1709–18.

Schreck KC, Grossman SA (2018) Role of Temozolomide in the Treatment of Cancers Involving the Central Nervous System. Oncology (Williston Park) 15;32(11):555-60, 569.

Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu X-Y et al (2012) Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. Nature 482:226–31.

Sciuscio D, Hegi ME (2013) Epigenetics and GI Cancer. Emerging Concepts in Neuro-Oncology pp 21-40.

Scott CB, Scarantino C, Urtasun R et al (1998) Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90–06, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys 40: 51–55.

Shi Y, Lan F, Matson C et al (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell 119:941–53.

Shinojima N, Tada K, Shiraishi S et al (2003) Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. Cancer Res 63:6962–6970.

Silber JR, Bobola MS, Blank A et al (2012) O 6-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer 1826(1), 71-82.

Simpson JR, Horton J, Scott C et al (1993) Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys 26: 239–244.

Simpson KJ, Selfors LM, Bui J et al (2008) Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. Nat Cell Biol 10:1027-38.

Singh-Gupta V, Joiner MC, Runyan L et al (2011) Soy isoflavones augment radiation effect by inhibiting APE1/ref-1 DNA repair activity in non-small cell lung cancer Journal of Thoracic Oncology vol. 6, no. 4, pp. 688–698.

Solomon DA, Kim JS, Jean W (2008) Conspirators in a capital crime: co-deletion of p18INK4c and p16INK4a/p14ARF/p15INK4b in glioblastoma multiforme. Cancer Res 68:8657–8660.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 352: 987-996.

Sturm D, Witt H, Hovestadt V et al (2012) Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. Cancer Cell 22(4):425–37.

Su YK, Bamodu OA, Tzeng YM et al (2019) Ovatodiolide inhibits the oncogenicity and cancer stem cell-like phenotype of glioblastoma cells, as well as potentiate the anticancer effect of temozolomide. Phytomedicine 19;61:152840.

Tabera J, Guinda A, Ruiz-Rodriguez A et al (2004) Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves, J Agric Food Chem 52(15):4774–4779.

Takagaki Y, Yamagishi H, Matsuoka R (2012) Factors involved in signal transduction during vertebrate myogenesis. Int Rev Cell Mol Biol 296:187-272.

Tamimi AF, Juweid M (2017) Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. Codon Publications pp 144-153.

Thakkar J, Dolecek TA, Horbinski C et al (2014) Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 23(10):1985-96.

Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer 2(6):442–454.

Thomas SM, DeMarco M, D'Arcangelo G et al (1992) Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. Cell 68:1031–1040.

Tibbitt MW, Anseth KS (2009) Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. Biotechnol Bioeng 1;103(4):655-63.

Till JE, McCulloch EA (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow. Radiat. Res 14, 213–222.

Tivnan A, Zakaria Z, O'Leary C et al (2015) Inhibition of multidrug resistance protein 1 (MRP1) improves chemotherapy drug response in primary and recurrent glioblastoma multiforme. Front Neurosci 16;9:218.

Tortosa A, Ino Y, Odell N et al (2000) Molecular genetics of radiographically defined de novo CRC. Neuropathol Appl Neurobiol 26:544–552.

Vassallo I, Zinn P, Lai M et al (2016) WIF1 re-expression in glioblastoma inhibits migration through attenuation of non-canonical WNT signaling by downregulating the lncRNA MALAT1. Oncogene 7;35(1):12-21.

Vedula SR, Ravasio A, Lim CT et al (2013) Collective cell migration: a mechanistic perspective. Physiology (Bethesda) 28:370-9.

Vengoji R, Macha MA, Batra SK et al (2018) Natural products: a hope for colorectal patients. Oncotarget 24;9(31):22194-22219.

Vigneswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG (2015) Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification Ann Transl Med 3(7):95.

Virant-Klun I, Ståhlberg A, Kubista M et al (2016) MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells, and Stem Cells to Cancer in Humans. Stem Cells Int 3984937.

Virk-Baker MK, Nagy TR, Barnes S (2010) Role of phytoestrogens in cancer therapy Planta Medica, vol. 76, no. 11, pp. 1132–1142.

Vitorino P, Meyer T (2008) Modular control of endothelial sheet migration. Genes Dev 22:3268-81.

Wan B, Wu HY, Lv DJ et al (2018) Downregulation of lncRNA PVT1 expression inhibits proliferation and migration by regulating p38 expression in prostate cancer. Oncol Lett 16: 5160-5166.

Wang H, Li L, Yin L et al (2018) Silencing LncRNA LOXL1-AS1 attenuates mesenchymal characteristics of colon cancer via NF-κB pathway. Biochem Biophys Res Commun 2;500(2):518-524.

Wang J, Pan Y, Wu J et al (2016) The association between abnormal long Noncoding RNA MALAT-1 expression and cancer lymph node metastasis: A meta-analysis. Biomed Res Int 1823482.

Xiang J, Guo S, Jiang S et al (2016) Silencing of Long Non-coding RNA MALAT1 promotes apotosis of colon cells. J Korean Med Sci 31: 688-694.

Xue X, Yang YA, Zhang A et al (2016) LncRNA HOTAIR enhances ER signaling and confers tamoxifen resistance in breast cancer. Oncogene 35: 2746-55.

Yamada S, Matsuda R, Nishimura F et al (2012) Carnitine-induced senescence in glioblastoma cells. Exp Ther Med 4(1):21-25.

Yan H, Wu A (2018) FOXO1 is crucial in glioblastoma cell tumorigenesis and regulates the expression of SIRT1 to suppress senescence in the brain. Mol. Med. Rep 17, 2535–2542.

Yang A, Wang H, Yang X (2017) Long non-coding RNA PVT1 indicates a poor prognosis of glioma and promotes cell proliferation and invasion via target EZH2. Biosci Rep 15;37(6).

Yang B, Wei ZY, Wang BQ et al (2018) Down-regulation of the long noncoding RNA-HOX transcript antisense intergenic RNA inhibits the occurrence and progression of glioma. J Cell Biochem 119(2):2278-2287.

Yang HW, Xing H, Johnson MDA (2015) Major role for microRNAs in glioblastoma cancer stem-like cells. Arch. Pharm. Res 38, 423–434.

Yarrow JC, Totsukawa G, Charras GT et al (2005) Screening for cell migration inhibitors via automated microscopy reveals a Rho-kinase inhibitor. Chem Biol 12:385-95.

Yu C, Wang Y, Li G et al (2018) LncRNA PVT1 promotes malignant progression in squamous cell carcinoma of the head and neck. J Cancer 9: 3593-3602.

Zeisberg, M, Neilson E (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. J. Clin. Invest 119:1429–1437.

Zhang Z, Wang S, Liu W (2018) EMT-related long non-coding RNA in hepatocellular carcinoma: a study with TCGA database. Biochem. Biophys. Res. Commun 503, 1530–1536.

Zhi YH, Song MM, Wang PL et al (2009) Suppression of matrix metalloproteinase-2 via RNA interference inhibits pancreatic carcinoma cell invasiveness and adhesion. World J Gastroenterol 15:1072–1078.

Zhou X, Ren Y, Zhang J et al (2015) HOTAIR is a therapeutic target in colorectal cancer. Oncotarget 6: 8353-8365.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. Nat Rev Mol Cell Biol 12:21–35.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Deoksiribo Nükleik asit

EGFR*:* Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü

EMT: Epitelyal Mezenkimal Geçiş

FBS: Fetal Bovine Serum

FDA: U.S. Food and Drug Administration, ABD Gıda ve İlaç İdaresi

FU: Fluouraurasil

HDAC: Histon Deasetilaz

HOTAIR: HOX Transkript Antisens RNA

HUVEC: Human Umbilical Vein Endotelial Cells

LncRNA: Uzun Kodlama Yapmayan RNA

LOH: Loss of heterozygosity, Heterozigotluk Kaybı

MALAT1: Metastaz ile İlişkili Akciğer Adenokarsinom Transkript 1

MDM2*:* Mouse Double Minute 2

MDR: Çoklu İlaç Direnci

miRNA: mikroRNA

MMR: Yanlış Eşleşme Onarımı

mTOR: Rapamisin Protein Kompleksi

P-gp: P-glikoprotein

PI3K/AKT: Fosfatidilinositol 3-Kinaz

PTEN*:* Phosphatase ve Tensin

RNA: Ribo Nükleik asit

TP53*:* Tumor Protein P53

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

8. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim başta olmak üzere akademik hayatıma adım attığım ilk dakikadan itibaren, ders döneminde, tez çalışmalarımda ve birçok akademik faliyette desteğini benden asla esirgemeyen, emeğini ve zamanını harcayarak, mesleki bilgi ve becerilerini, sabrı ve azmi öğreten, bilgilerini her daim benimle paylaşan, her zaman hoşgörülü, sabırlı, kibar ve sevgi dolu olan değerli danışmanım Prof. Dr. Berrin TUNCA'ya, bilgi ve deneyimlerini sabır ile aktaran, her konuda hoşgörülü yaklaşan sayın hocalarım Prof. Dr. Ünal EGELİ ve Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER' e,

Doktora tezim boyunca zorlu süreçlerde yanımda olan, bilgi birikimlerini ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan, kendi bölüm asistanları kadar benimle alakadar olan Prof. Dr. Tuncay YILMAZLAR'a, Prof. Dr. Ersin ÖZTÜRK'e,

Doktora tezim boyunca bana her zaman bilgi birikimlerini benimle paylaşan, bilim yapmama olanak sağlayan ve her zaman desteklerini yanımda hissettiğm Prof. Dr. Ömer YERCİ'ye, Prof. Dr. Ekrem KAYA, Prof. Dr. Özkan KANAT'a, Doç. Dr. Pınar TAŞAR'a ve Doç. Dr. Özgen IŞIK'a,

Akademik hayatım boyunca bilgi birikimlerini, tecrübelerini, emeğini ve her zaman desteğini benimle paylaşan, beraber çalışmaktan mutlukluk ve onur duyduğum Doç. Dr. Nesrin UĞRAŞ'a ve Dr. Öğr. Gör. Halit Ziya DÜNDAR'a,

Bilgi birikimlerimi paylaşma imkanı bulduğum, beraber çok güzel akademik faliyetler gerçekleştirebildiğim sevgili ekip arkadaşlarım, Melis MUTLU'ya, Çağla TEKİN'e ve M. Nafi CİVAN'a, bu yolda her zaman birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji A.D asistanlarına, öğrencilerine ve tüm çalışanlarına,

Hayatımın her aşamasında bana hep destek olan ve bugünlere gelmemi sağlayan her konuda yanımda olan, bana pes etmemeyi öğreten ve desteklerini her zaman kalbimde hissettiğim Annem, Babam ve kardeşlerime,

Son olarak, bana hep destek olan ve başarıya ulaşmam için her zaman yanımda bulunan, tezin kısa sürede bitmesi için desteklerini esirgemeyen, akademik hayatta da beraber yürüme fırsatı sunan sevgili eşim Dr. Fuat AKSOY'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Birimi tarafından KUAP(T)-2014/35 ve DDP(T)-2018/4 numaralı araştırma projeleri kapsamında sağlanan maddi destek için teşekkür ederim.

9. ÖZGEÇMİŞ

10 Ağustos 1988 yılında Bursa'da doğdum. İlköğretimimi Atatürk İlköğretim Okulu'nda, Lise öğretimimi Bursa Kız Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2006 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne yerleştim. 2010 yılında mezun olduktan sonra aynı sene Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D'da yüksek lisans eğitimime başladım. 2013 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamlayıp aynı yıl Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D'da doktora eğitimine başladım. 2014 yılında doktoraya devam ettiğim bölümünde Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım ve halen Uludağ Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.D'da eğitimime devam etmekteyim.