

T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**KOLOREKTAL KANSER TANILI
HASTALARDA lncRNA *SNHG22* / *miR-4492* /
FOXK1 EKSPRESYON SEVİYELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Ziya BULDUK

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Çiğdem YÜCE KAHRAMAN

ERZURUM-2025



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİ ve TEZİ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Adı, Soyadı : Ziya BULDUK	Sınav tarihi: 28 / 05 / 2025
Anabilim Dalı : Tıbbi Genetik	
Tez Danışmanı ve Atanma Tarihi: Doç. Dr. Çiğdem Yüce KAHRAMAN 21 / 03 / 2024	
Tezin Konusu ve Başlığı : Kolorektal Kansere Tanılı Hastalarda lncRNA SNHG22 / miR-4492 / FOXK1 Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi Belirlenme Tarihi : 10 / 07 / 2023	
Tezin Niteliği : <input checked="" type="checkbox"/> Tıpta Uzmanlık Tezi <input checked="" type="checkbox"/> Klinik Çalışmalar () Prospektif () Retrospektif () Kesitsel <input type="checkbox"/> Laboratuvar Çalışmaları () Invitro (Cansız) Çalışmaları () Hayvan Çalışmaları	
Tez Sınavının Nasıl Yapıldığı: <input checked="" type="checkbox"/> Yüz yüze katılım sağlanarak <input type="checkbox"/> Online (Jürinin teşkil edilmesinde kurum dışından belirlenecek olan jüri üyesi, aynı il sınırları içerisinde bulunmadığından, tez sınavı dijital ortamda yapılmıştır.)	

II. KARAR	
Tıpta ve Dış Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin 19. maddesi gereğince yapılan tez savunma sınavının tamamlanması sonucunda adı geçen tezinin, jüri üyelerince "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak; <input checked="" type="checkbox"/> Kabulüne	
1. Tez Sınavı <input type="checkbox"/> Reddine (Eksikliklerin tamamlanması ve gerekli düzeltmelerin yapılması için uzmanlık öğrencisine, TUEY'nin 19. Maddesinin 6. fıkrası gereğince altı aylık ek bir süre verilmesine)	
2. Tez Sınavı <input type="checkbox"/> Reddine (TUEY'nin 19. Maddesinin 7. fıkrası gereğince, uzmanlık öğrencisinin uzmanlık öğrenciliği ile ilişkisinin kesilmesine)	
<input checked="" type="checkbox"/> Oy birliği <input type="checkbox"/> Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

III. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

IV. JÜRİ ÜYELERİ				
	Unvanı Adı Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurum Bilgisi	İmza
Jüri Başkanı	Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR	Tıbbi Genetik	Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Çiğdem Yüce KAHRAMAN	Tıbbi Genetik	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Ömer YAKAR	Tıbbi Genetik	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolorektal Kanser	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Risk Faktörleri	4
2.1.2.1. Değişirilemez Risk Faktörleri.....	4
2.1.2.2. Değişirilebilir Risk Faktörleri.....	6
2.1.3. Moleküler Patogenez	7
2.1.3.1. Genomik İnstabilite Mekanizmaları	8
2.1.3.2. KKK'de Sinyal Yolakları	9
2.1.3.3. KKK'de Epigenetik Değişiklikler	10
2.1.4. Klinik Bulgular.....	12
2.1.5. Tanı ve Tarama.....	12
2.1.6. Evreleme ve Prognoz.....	13
2.1.7. Tedavi Stratejileri.....	14
2.2. Kodlama Yapmayan RNA'lar (ncRNA'lar)	16
2.2.1. Uzun Kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar)	17
2.2.2. MikroRNA'lar (miRNA'lar)	19
2.2.3. Rekabetçi Endojen RNA (ceRNA) Hipotezi	21
2.3. lncRNA <i>SNHG22</i> / <i>miR-4492</i> / <i>FO XK1</i> RNA'ları.....	23
2.3.1. lncRNA <i>SNHG22</i>	23
2.3.2. <i>miR-4492</i>	24
2.3.3. <i>FO XK1</i>	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27

3.1. Çalışma Planı.....	27
3.2. Total RNA İzolasyonu	28
3.3. cDNA Sentezi.....	30
3.4. Real-Time PCR (qPCR) Aşaması	32
3.4.1. mRNA, lncRNA ve GAPDH qPCR Çalışması	32
3.4.2. miRNA ve <i>RNU6</i> qPCR Çalışması	34
3.5. Verilerin Analizi.....	36
4. BULGULAR.....	38
4.1. Çalışma Grubunun Özellikleri	38
4.2. Ekspresyon Analizi Bulguları	40
4.3. Ekspresyon Değerlerinin Karşılaştırılması.....	43
4.3.1. lncRNA <i>SNHG22</i> Ekspresyonu.....	45
4.3.2. <i>miR-4492</i> Ekspresyonu.....	47
4.3.3. <i>FOXK1</i> Ekspresyonu.....	49
4.4. Korelasyon Analizi.....	50
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR	68

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Hybrid-R™ kitinin içeriği (100 reaksiyonluk)	28
Tablo 2. A.B.T.™ miR cDNA Synthesis Kitinin içeriği (200 reaksiyonluk)	30
Tablo 3. Üç ayrı reverse transkriptaz reaksiyonu için karışım bileşenleri ve miktarları	31
Tablo 4. RT reaksiyonu için PCR-thermal cycler cihazının program ayarları.....	32
Tablo 5. lncRNA, mRNA ve <i>GAPDH</i> primer dizileri (5' → 3')	33
Tablo 6. mRNA, lncRNA ve <i>GAPDH</i> için qPCR reaksiyon karışımı bileşenleri ve volümleri.....	33
Tablo 7. Real-Time PCR (qPCR) Döngü Basamakları (lncRNA, mRNA ve <i>GAPDH</i> için)	34
Tablo 8. miRNA ve <i>RNU6</i> primer dizileri (5' → 3')	34
Tablo 9. miRNA ve <i>RNU6</i> için qPCR reaksiyon karışımı bileşenleri ve volümleri .	35
Tablo 10. Real-Time PCR (qPCR) döngü basamakları (miRNA ve <i>RNU6</i> için)	35
Tablo 11. Çalışmaya alınan hastaların demografik, klinik ve patolojik verileri	38
Tablo 12. Tümörlü (T) dokulardan elde edilen Ct değerleri	41
Tablo 13. Komşu sağlıklı (S) dokulardan elde edilen Ct değerleri	42
Tablo 14. lncRNA <i>SNHG22</i> , <i>miR-4492</i> ve <i>FOXK1</i> RNA'larının ortalama ΔCt ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri	44
Tablo 15. lncRNA <i>SNHG22</i> ekspresyonunun hastaların klinik parametreleri ile ilişkisi.....	45
Tablo 16. <i>miR-4492</i> ekspresyonunun hastaların klinik parametreleri ile ilişkisi	47
Tablo 17. <i>FOXK1</i> ekspresyonunun hastaların klinik parametreleri ile ilişkisi	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. GLOBOCAN 2022 verilerini gösteren pasta grafikleri.....	3
Şekil 2. KRK risk faktörleri	4
Şekil 3. Herediter KRK yatkınlık sendromları ve ilgili genler.	5
Şekil 4. KRK progresyonu.....	8
Şekil 5. KRK’de rol oynayan çeşitli sinyal yolları	10
Şekil 6. RNA’ların sınıflandırılması.....	16
Şekil 7. lncRNA’ların fonksiyonel mekanizmaları.....	18
Şekil 8. miRNA biyogenezi ve fonksiyonel etkileri	20
Şekil 9. ceRNA hipotezi	22
Şekil 10. SNHG, snoRNA ve lncSNHG arasındaki ilişki	23
Şekil 11. <i>miR-4492</i> ’nin ilişkili olduğu bazı kanserler ve ceRNA ağları.....	25
Şekil 12. Kanser süreçlerinde lncRNA-miRNA-mRNA etkileşimleri.	26
Şekil 13. Maestro Nano spektrofotometre cihazı.....	30
Şekil 14. PCR-thermal cycler Labcycler Basic (SensoQuest) cihazı	32
Şekil 15. QIAGEN Rotor-Gene Q Cihazı.....	34
Şekil 16. Bir çalışmaya ait örnek qPCR amplifikasyon eğrileri	40
Şekil 17. KRK’li tümör dokularında ve komşu sağlıklı dokularda lncRNA <i>SNHG22</i> , <i>miR-4492</i> ve <i>FOXK1</i> ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.....	44
Şekil 18. lncRNA <i>SNHG22</i> , <i>miR-4492</i> ve <i>FOXK1</i> arasındaki korelasyon analizleri ve Spearman korelasyon matrisi	51

KISALTMALAR DİZİNİ

cDNA	: Komplementer DNA
ceRNA	: Rekabetçi Endojen RNA
CIMP	: CpG Adası Metilatör Fenotipi
circRNA	: Circular RNA
CIN	: Kromozomal İnstabilite
Ct	: Cycle Threshold (Döngü Eşiği)
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
FAP	: Familyal Adenomatöz Polipozis
FOXP1	: Forkhead Box K1
GİS	: Gastrointestinal Sistem
GLOBOCAN	: Global Cancer Observatory
HNPCC	: Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser
IARC	: International Agency for Research on Cancer
lncRNA	: long non-coding RNA
LOH	: Loss of Heterozygosity
LN	: Lenf Nodu
miRNA	: mikroRNA
MMR	: Mismatch Repair (Yanlış eşleşme onarımı)
MRE	: miRNA Tanıma Elemanı
mRNA	: Messenger RNA
MSI	: Mikrosatellit İnstabilitesi
ncRNA	: non-coding RNA
piRNA	: PIWI-interacting RNA
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
siRNA	: Small Interfering RNA
SNHG22	: Small Nucleolar RNA Host Gene 22
snRNA	: Small Nuclear RNA
snoRNA	: Small Nucleolar RNA
TNM	: Tümör/Nod/Metastaz
UTR	: Untranslated Region

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik ihtisas sürecim boyunca her zaman desteğini ve kıymetli tavsiyelerini esirgemeyen, tecrübesi ve insani değerleriyle bana örnek olan, iyi bir hekim ve araştırmacı olmam yolunda beni sürekli teşvik eden, anabilim dalı başkanımız saygıdeğer Prof. Dr. Abdulgani TATAR hocama;

Çalışmalarımın her aşamasında bilgi, deneyim ve desteğiyle yanımda olan, değerli danışmanım Doç. Dr. Çiğdem YÜCE KAHRAMAN hocama;

Bu çalışmaya hasta dahil edilme sürecindeki katkılarından dolayı Doç. Dr. Esra DİŞÇİ'ye;

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli meslektaşlarım Dr. Ömer YAKAR, Dr. Neslihan CİNKARA, Dr. Kübra ADANUR SAĞLAM, Dr. Büşra SARUHAN ve Dr. Dilara AYDEMİR'e;

Bilgisi, deneyimi ve içten desteğiyle her zaman yanımda olan Tıbbi Genetik camiasının gururu değerli arkadaşım ve meslektaşım Dr. Momen KANJEE'ye;

Laboratuvar çalışmalarında bana destek veren, projeme katkıda bulunan ve özverili çalışmalarıyla büyük destek sağlayan ATAGEN ailesinin tüm çalışanlarına;

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan sevgili annem, babam ve değerli kardeşlerime;

Ve son olarak desteğini her daim hissettiğim sevgili eşim Dr. Fatma Nur BULDUK'a ve biricik oğlum Mert BULDUK'a en içten teşekkürlerimi ve sonsuz minnettarlığımı sunarım.

Dr. Ziya BULDUK

Bu tez çalışması, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) koordinasyon birimi tarafından, TTU-2024-14323 numarasıyla desteklenmiştir.

ÖZET

Kolorektal Kanser Tanılı Hastalarda lncRNA *SNHG22* / *miR-4492* / *FOXK1* Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Giriş-Amaç: Kolorektal kanserler (KRK), dünya genelinde en sık görülen üçüncü kanser türü olup, kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Son yıllarda, kodlamayan RNA'ların (ncRNA) kanser biyolojisindeki rolleri giderek daha fazla ilgi görmektedir. KRK patogenezinde yer alan ncRNA'lar hem prognoz belirteci hem de potansiyel tedavi hedefleri olarak önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada, KRK'li hastalardan elde edilen tümör ve komşu sağlıklı doku örneklerinde lncRNA *SNHG22*, *miR-4492* ve *FOXK1*'in ekspresyon düzeyleri ile aralarındaki olası etkileşimler değerlendirilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız KRK'de lncRNA *SNHG22*, *miR-4492*, *FOXK1* ekspresyon seviyelerini birlikte değerlendiren ilk çalışma olacaktır.

Gereç-Yöntem: Genel Cerrahi kliniğine KRK tanısı ile başvuran 50 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Ameliyat sırasında bu hastalardan alınan tümörlü ve cerrahi sınırları negatif sağlıklı komşu doku örneklerinden total RNA izolasyonu yapılmış; elde edilen RNA örnekleri kullanılarak kantitatif real-time PCR (qPCR) yöntemiyle hedef genlerin ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir.

Bulgular: KRK dokularında lncRNA *SNHG22* ekspresyon düzeylerinin anlamlı düzeyde azaldığı ($p = 0,0021$), *miR-4492* ekspresyonunun arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p = 0,1236$) ve *FOXK1* ekspresyon düzeylerinin azaldığı ($p = 0,1038$) tespit edilmiştir. Tümör dokularında lncRNA *SNHG22* ve *FOXK1* ekspresyon düzeyleri, histopatolojik alt tipler açısından anlamlı farklılık göstermiştir (sırasıyla $p = 0,029$ ve $p = 0,030$). Ayrıca, lncRNA *SNHG22* ile *FOXK1* arasında güçlü bir pozitif korelasyon saptanmıştır ($p = 4,70 \times 10^{-10}$, $r = 0,747$). Buna karşın, lncRNA *SNHG22* ile *miR-4492* arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p = 0,973$, $r = -0,005$). *miR-4492* ile *FOXK1* arasında ise orta düzeyde pozitif bir korelasyon gözlemlenmiştir ($p = 0,0017$, $r = 0,432$).

Sonuç: Bu çalışma lncRNA *SNHG22*, *miR-4492* ve *FOXK1*'in KRK ile ilişkili moleküler mekanizmalardaki potansiyel rollerine dair yeni ve önemli bulgular ortaya koymuştur. Elde edilen veriler, bu moleküllerin KRK patogenezinde önemli düzenleyici işlevlere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu ilişkilerin moleküler düzeyde daha ayrıntılı biçimde ortaya konulması ve bulguların doğrulanması amacıyla ileri düzey, fonksiyonel ve geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır. Gelecekte yapılacak kapsamlı araştırmalar, bu moleküler yolların daha iyi anlaşılmasını sağlayarak lncRNA *SNHG22*, *miR-4492* ve *FOXK1*'in tanı, prognoz ve tedavi açısından klinik kullanım potansiyelini ortaya koyabilir.

Anahtar Kelimeler: *FOXK1*, Gen Ekspresyonu, Kolorektal Kanser, lncRNA *SNHG22*, *miR-4492*.

ABSTRACT

Evaluation of lncRNA SNHG22 / miR-4492 / FOXK1 Expression Levels in Patients Diagnosed with Colorectal Cancer

Introduction-Aim: Colorectal cancers (CRCs) are the third most commonly diagnosed cancer type worldwide and the second leading cause of cancer-related deaths. In recent years, the roles of non-coding RNAs (ncRNAs) in cancer biology have gained increasing attention. ncRNAs involved in CRC pathogenesis are considered to be important both as prognostic markers and as potential therapeutic targets. In this study, the expression levels of lncRNA *SNHG22*, *miR-4492*, and *FOXK1*, as well as their possible interactions, were evaluated in tumor and adjacent normal tissue samples obtained from CRC patients. To the best of our knowledge, this is the first study to jointly evaluate the expression levels of the lncRNA *SNHG22*, *miR-4492*, and *FOXK1* in colorectal cancer.

Materials-Methods: Fifty patients diagnosed with CRC who presented to the General Surgery clinic were included in the study. Tumor and adjacent healthy tissue samples with negative surgical margins were obtained during surgery. Total RNA isolation was performed on these samples, and the expression levels of target genes were analyzed using quantitative real-time PCR (qPCR).

Results: In CRC tissues, the expression levels of lncRNA *SNHG22* were significantly decreased ($p = 0.0021$), while the expression of *miR-4492* was increased but not statistically significant ($p = 0.1236$), and the expression levels of *FOXK1* were reduced ($p = 0.1038$). In tumor tissues, the expression levels of lncRNA *SNHG22* and *FOXK1* differed significantly among histopathological subtypes ($p = 0.029$ and $p = 0.030$, respectively). Furthermore, a strong positive correlation was observed between lncRNA *SNHG22* and *FOXK1* ($p = 4.70 \times 10^{-10}$, $r = 0.747$). In contrast, no statistically significant relationship was found between lncRNA *SNHG22* and *miR-4492* ($p = 0.973$, $r = -0.005$). A moderate positive correlation was observed between *miR-4492* and *FOXK1* ($p = 0.0017$, $r = 0.432$).

Conclusion: This study presents novel and significant findings regarding the potential roles of lncRNA *SNHG22*, *miR-4492*, and *FOXK1* in the molecular mechanisms associated with CRC. The data suggest that these molecules may have important regulatory functions in CRC pathogenesis. However, further detailed investigation at the molecular level and validation of these findings are required through advanced, functional, and large-scale studies. Comprehensive future research may enhance the understanding of these molecular pathways and reveal the potential roles of lncRNA *SNHG22*, *miR-4492*, and *FOXK1* as diagnostic, prognostic, or therapeutic targets in clinical practice.

Keywords: Colorectal Cancer, *FOXK1*, Gene Expression, lncRNA *SNHG22*, *miR-4492*.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser (KRK), 2022 Küresel Kanser Gözlemevi (Global Cancer Observatory – GLOBOCAN) verilerine göre dünya genelinde her iki cinsiyette de en sık görülen üçüncü kanser türüdür ve kanserden ölümlerin ikinci en sık sebebidir (1,2). Erken tanı ve tedavi KRK ölümlerinin azalmasını sağlamaktadır. Bununla beraber çoğu vakanın geç tanı aldığı bilinmektedir. KRK'nin moleküler mekanizmalarının tanımlanması bu sorunun çözümü için anahtar bir rol üstlenebilir.

Yakın zamana kadar normal gelişim ve hastalıklardaki rolleri bilinmeyen kodlamayan RNA'lar (non-coding RNA; ncRNA), insan genomunun büyük çoğunluğunu oluşturan, protein sentezine katılmayan ancak gen ekspresyonu ve çeşitli hücrel süreçlerde önemli rolleri olan RNA molekülleridir. ncRNA'ların kanser oluşumunda ve ilerlemesinde önemli roller oynadığı bilinmektedir ve ncRNA-kanser ilişkisi son yıllarda popüler bir araştırma konusu haline gelmiştir. Uzun kodlamayan RNA (long non-coding RNA; lncRNA) ve mikroRNA (miRNA) tümörögenizde önemli rolleri olan ncRNA molekülleridir.

Genellikle 200 nükleotitten daha uzun olan lncRNA'ların anormal profili kanser başlangıcı, progresyonu ve metastazı gibi kanser süreçlerinde yer almaktadır. lncRNA'lar karsinogenez süreçlerinde onkojenik veya tümör baskılayıcı olarak rol alabilmektedirler ve kanser hücrelerinde artmış veya azalmış ifade düzeyleriyle ilişkilidirler. lncRNA'lar, mikroRNA'lar (miRNA'lar) ve messenger RNA'lar (mRNA'lar) ile etkileşime girerek tümörögenizde rol alırlar. KRK ile ilişkili olabilecek lncRNA'lardan biri olan lncRNA *SNHG22*; over kanseri, gastrik kanser, özefagus karsinomu, hepatoselüler karsinom, meme kanseri, renal hücreli karsinom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve kolorektal kanserde araştırılmıştır (3–13).

Küçük ncRNA molekülleri olan miRNA'ların ifadesindeki düzensizlikler de çeşitli tümörögenez süreçlerinde rol almaktadır. KRK ile ilişkili olabilecek miRNA'lardan biri olan *miR-4492* kanser çalışmalarında yeterince araştırılmamıştır. Literatürde over kanseri, meme kanseri, mesane kanseri, glioblastoma multiforme,

akciğer kanseri, melanoma, osteosarkom ve KRK gibi bazı kanserlerdeki rolü değerlendirilmiştir (14–21).

Forkhead box (FOX) proteinleri, geniş bir biyolojik süreç yelpazesini kontrol eden evrimsel olarak korunmuş bir transkripsiyon faktörleri ailesidir (22,23). Bu ailenin önemli bir üyesi olan *FOXK1*'in birçok malign dokuda up-regüle olduğu, tümör proliferasyonu ve metastazını indüklediği bilinmektedir (23,24). Özefagus kanseri, over kanseri, gastrik kanser, KRK, meme kanseri ve prostat kanseri dahil çeşitli kanser türlerinde onkojenik rolleri olduğu gösterilmiştir.

Özetle, kodlamayan RNA'lar ve lncRNA - miRNA - mRNA ilişkileri kanserin moleküler düzeyde patogenezinin anlaşılmasının yanı sıra hedefe yönelik tedaviler ve prognoz tayini için çok büyük önem arz etmektedir. Bu moleküler biyobelirteçlerin tam fonksiyonlarının anlaşılması ve kanser tedavisindeki potansiyel kullanımının belirlenmesi için daha fazla araştırmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmadaki amacımız, KRK ve komşu sağlıklı doku örnekleri arasındaki lncRNA *SNHG22/miR-4492/FOXK1* ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması ve birbirleriyle olan ilişkilerini araştırmaktır. Literatürde, lncRNA *SNHG22/miR-4492* ilişkisi osteosarkomda ve *miR-4492/FOXK1* ilişkisi KRK'de ayrı ayrı olarak değerlendirilmiş olmakla birlikte, bildiğimiz kadarıyla çalışmamız lncRNA *SNHG22/miR-4492/FOXK1* ekseninin birlikte çalışıldığı ilk çalışma olacaktır. lncRNA'lar, miRNA'lar ve protein kodlayan genler kanserde biyolojik belirteç olarak kullanılabilir ve hedefe yönelik tedavilerin potansiyel hedefleri olabilirler. Çalışmamızın ileride bu alanda yapılacak çalışmalara da ışık tutacağı öngörülmektedir.

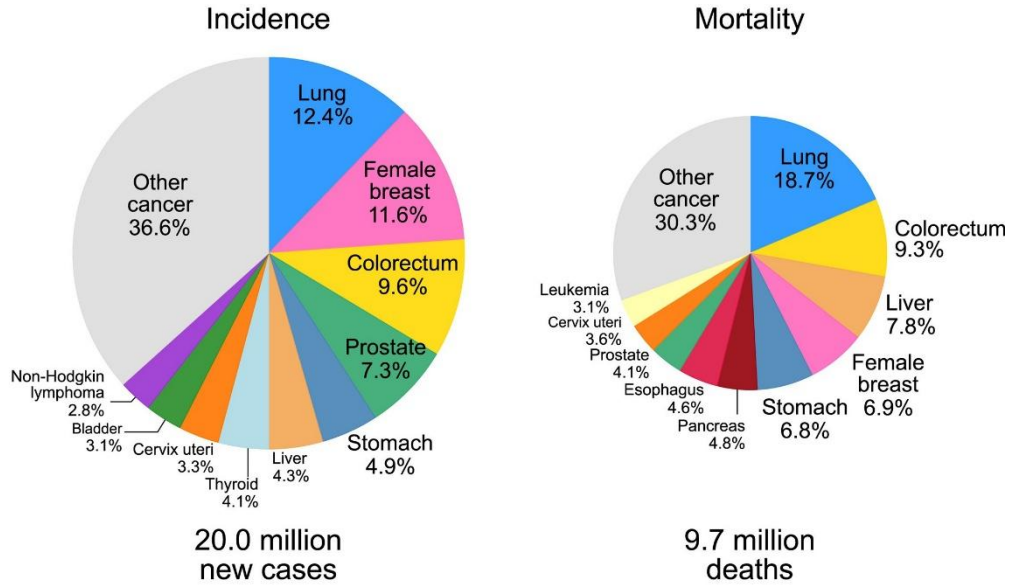
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

2.1.1. Epidemiyoloji

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından oluşturulan GLOBOCAN verilerine göre 2022 yılında yaklaşık 20 milyon yeni kanser vakası ve kansere bağlı 9,7 milyon ölüm gerçekleşmiştir (1,2). Bu verilere göre tüm kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturan KRK her iki cinsiyette de en sık görülen üçüncü kanserdir ve kansere bağlı ölümlerin ikinci en sık sebebidir (1,2). KRK'nin hem insidansı hem de mortalitesi, erkeklerde kadınlara göre fazladır (25). Farklı ülkeler ve bölgeler arasında coğrafi farklılıklar olabilmektedir. Bu farklılık daha sonra tartışılacak olan risk faktörlerinden kaynaklanabilmektedir (1,25). Şekil 1 GLOBOCAN 2022 verilerini göstermektedir.

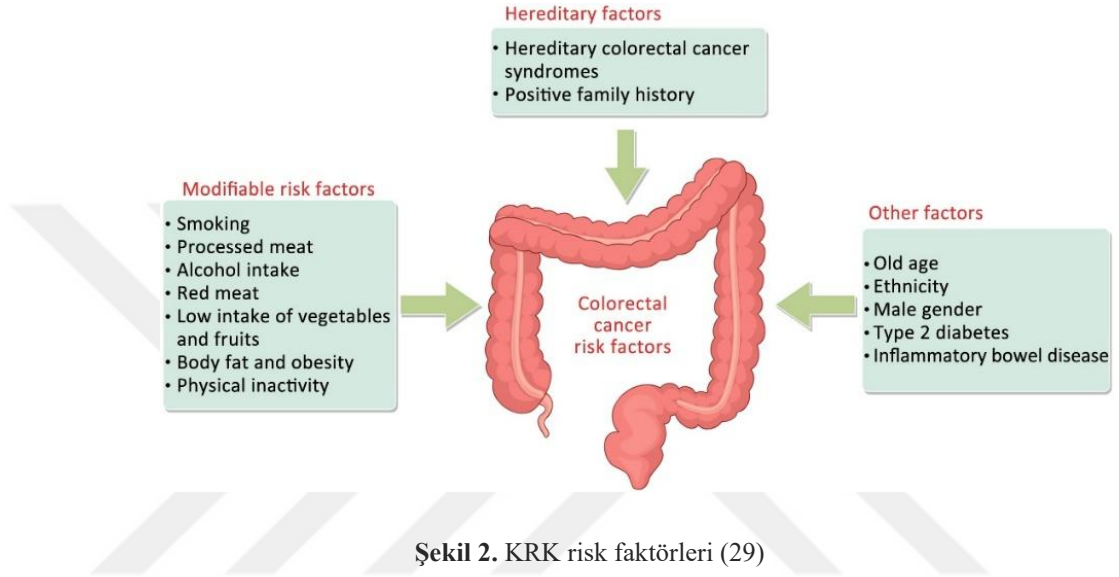
Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün 2018 yılı Türkiye Kanser İstatistiklerine göre ülkemizde de KRK her iki cinsiyette en sık görülen üçüncü kanserdir ve sıklığı erkeklerde daha yüksektir (26).



Şekil 1. GLOBOCAN 2022 verilerini gösteren pasta grafikleri. Grafikler 2022 yılına ait dünya genelindeki kanser insidansını (sağ) ve mortalitesini (sol) göstermektedir. Tüm yaş grupları ve her iki cinsiyet birlikte değerlendirilmiştir (1).

2.1.2. Risk Faktörleri

KRK multifaktöriyel bir hastalık olup kanser gelişiminde kalıtsal faktörler, çevresel faktörler ve yaşam tarzı gibi değişkenler birlikte rol almaktadır. Risk faktörleri değiştirilebilenler ve değiştirilemeyenler olarak ikiye ayrılmaktadır (25,27,28). Şekil 2’de KRK’nin değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri özetlenmiştir.



2.1.2.1. Değiştirilemez Risk Faktörleri

İleri yaş: En önemli değiştirilemez risk faktörüdür. Özellikle 50 yaş üzerinde risk önemli bir şekilde artmaktadır (27,30). Ancak günümüzde daha genç yaşlarda KRK vakalarının insidansı artmaktadır (30,31).

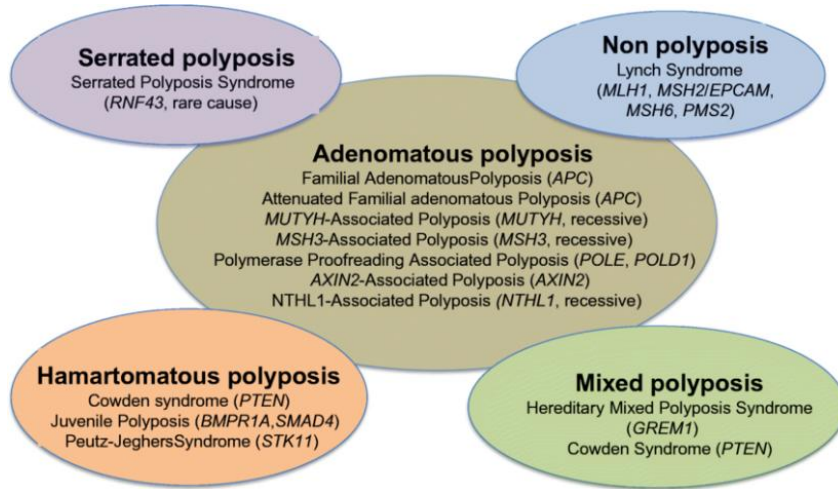
Cinsiyet: Yaş ve etnik kökenden bağımsız olarak KRK riski erkeklerde kadınlardan yaklaşık 1,5 kat yüksektir (1,32).

İrk ve Etnik Köken: Siyah ırkta beyaz ırka göre daha yüksek risk mevcuttur (28). Afroamerikalılar ve Alaska yerlileri gibi bazı ırklarda daha yüksek risk olduğu belirtilmiştir (27).

Aile öyküsü: KRK hastalarının %10-20 kadarında ailede kanser öyküsü vardır (25). Birinci derece akrabasında KRK öyküsü olan kişilerde 2-4 kat daha yüksek

kanser riski vardır (32). 60 yaşından önce tanı konulan akraba olması ve tanı alan akraba sayısının artması kanser riskini artırmaktadır (33).

Hereditör KRK Sendromları: KRK vakalarının büyük çoğunluğu sporadik olarak gelişmektedir. Ancak vakaların %5-7 kadarı germ-line patojenik varyantlardan kaynaklanan hereditör kanser sendromlarıyla ilişkilidir (33,34). Bu sendromlarda erken yaşlarda başlayan ve artmış kanser riski vardır (25). Bu sendromlar polipozis sendromları ve non-polipozis sendromları olarak iki genel gruba ayrılabilir (25). Şekil 3'te hereditör KRK sendromlarının sınıflandırılması gösterilmiştir. Hereditör non-polipozis kolorektal kanser sendromu (HNPCC) yada diğer adıyla Lynch sendromu (LS) en sık görülen hereditör KRK sendromudur (%3-5) (34,35). Mismatch repair (MMR) genlerindeki (*MLH1*, *MSH2* (*EPCAM*), *MSH6* ve *PMS2*) germ-line patojenik varyantlardan kaynaklanan bu sendrom otozomal dominant (OD) kalıtım paternine sahiptir (34,36). HNPCC'li hastalarda KRK gelişme riskinin 50 yaşına kadar yaklaşık %20 ve 85 yaşına kadar yaklaşık %80 olduğu kabul edilmektedir (32,33). Familial Adenomatöz Polipozis (FAP) ikinci en sık görülen hereditör KRK sendromudur (%1) (37). *APC* genindeki germ-line patojenik varyantlardan kaynaklanan bu sendrom da OD kalıtım paternine sahiptir (37). FAP çocukluk döneminden itibaren başlayan yüzlerce hatta binlerce prekanseröz polip ile karakterize bir sendromdur (32,37). 35 yaşına kadar neredeyse tüm hastalarda polipler gelişir ve müdahale edilmezse 40 yaşına kadar KRK gelişme riski neredeyse %100'dür (32,38).



Şekil 3. Hereditör KRK yatkınlık sendromları ve ilgili genler (39).

İnflamatuvar Barsak Hastalıkları (İBH): Ülseratif kolit (ÜK) ile KRK risk artışı arasında önemli bir ilişki vardır (40,41). Kronik inflamasyon durumları tümör büyümesi ve ilerlemesini desteklemektedir (41,42).

Kistik Fibrozis (KF): *CFTR* genindeki patojenik varyantlardan kaynaklanan KF hastalığında sindirim sistemi mukozası da etkilenmektedir. KF tanısı olan hastalarda KRK riskinin 10 kat arttığı gösterilmiştir (43).

Radyasyon Öyküsü: Radyoterapi öyküsü olan hastalarda GİS kanserlerinin riskinin arttığı bildirilmiştir (28,44,45).

2.1.2.2. Değiştirilebilir Risk Faktörleri

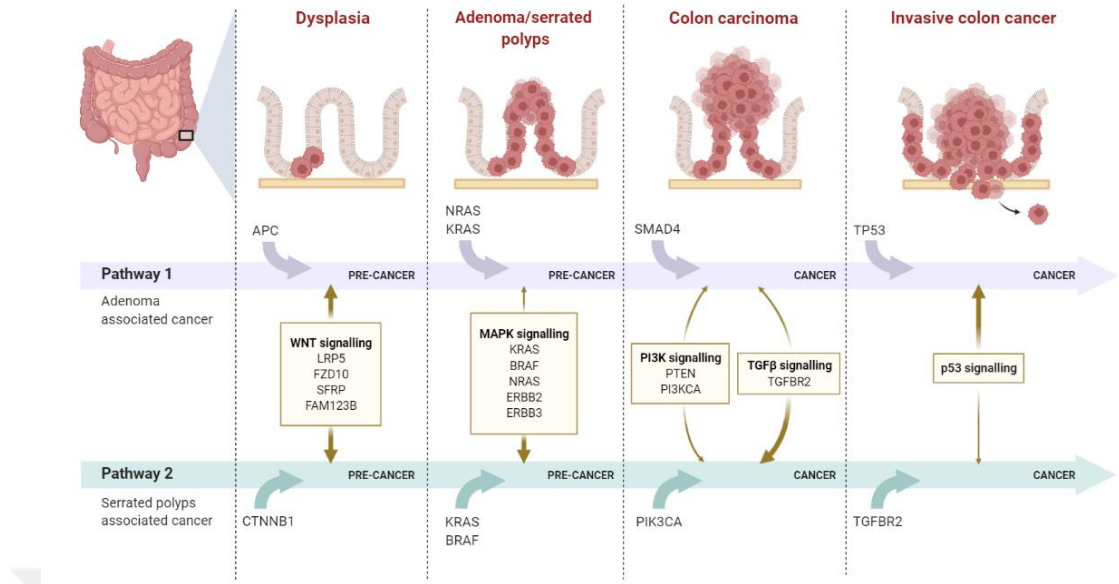
Yaşam Tarzı: Değiştirilebilir risk faktörlerinden en önemlisi yaşam tarzı değişiklikleridir. Sigara ve alkol tüketimi bilinen risk faktörlerindedir (46–49). Obezite ile KRK arasında önemli bir ilişki vardır, bel çevresinde artış görülen hastalarda çeşitli malignitelerin görülme riski artmaktadır (50–52). Kırmızı et tüketimi ve işlenmiş gıdalarla beslenmenin de KRK ve diğer GİS kanserlerinin riskini artırdığı bilinmektedir (27,53,54). Düzenli olarak yapılan fiziksel aktiviteler KRK riskini önemli oranda azaltmaktadır (55). Meyve-sebze tüketimi gibi yüksek lifli diyetlerin koruyucu olduğu düşünülmektedir (27,56).

Diabetes Mellitus (DM): Fiziksel aktivite, vücut kitle endeksi (VKI) yüksekliği ya da sigara içme durumlarından bağımsız olarak KRK için bir risk faktörüdür (57,58). Ayrıca KRK’de kötü prognozla da ilişkilendirilmiştir (59).

İlaçlar: Aspirin, NSAID'ler ve hormon replasman tedavisi alan kişilerde KRK riskinin azaldığı bildirilmiştir (27,32).

2.1.3. Moleküler Patogenez

KRK, normal kolon veya rektum epitelinin adenokarsinoma dönüşmesine neden olan genetik ve epigenetik değişikliklerin ilerleyici birikimiyle meydana gelir (60,61). Bu süreçte onkogenlerde aktivasyon ve tümör baskılayıcı genlerde inaktivasyon gibi sırasıyla meydana gelen birtakım değişiklikler olmaktadır (25,61). KRK, adenomatöz polipler veya sesil serrated lezyonlar olarak başlayıp kademeli olarak invaziv kansere kadar ilerlemektedir (61,62). KRK'lerin büyük çoğunluğu (%80-85) klasik adenom-karsinom yoluyla oluşurken %15 kadarı ise serrated poliplerle başlayan bir yolakla meydana gelir (63,64). Klasik KRK oluşum modelinde anormal kript→polip→erken adenom→ileri adenom→invaziv kanser şeklinde bir sıralama izlenir. Bu süreç mutasyonların ve epigenetik değişikliklerin birikimiyle ilerler ve yaklaşık 10-15 yıl kadar sürer. Lynch sendromu gibi bazı durumlarda ise bu süreç çok daha hızlı ilerler (61). Klasik modelde olayları başlatan ilk adım *APC* geninin susturulmasıdır, sonraki aşamalarda bunu sırayla *RAS* ve *SMAD4* genlerindeki mutasyonlar takip eder ve nihayetinde *TP53* mutasyonlarıyla invaziv kanser gelişmiş olur (61). Daha sonra tanımlanan serrated poliplerle başlayan alternatif modelde de polipten kansere giden yolda benzer bir sıralama izlenir. Bu yolakta ilk mutasyon *CTNNB1* geninde oluşmaktadır, bunu sırasıyla *KRAS/BRAF* genleri, *PIK3CA* geni ve nihayetinde *TGFBR2* genindeki mutasyonlar izlemektedir (61). Şekil 4'te KRK progresyon aşamaları iki önemli yolak üzerinden özetlenmiştir.



Şekil 4. KRK progresyonu (65)

2.1.3.1. Genomik İnstabilite Mekanizmaları

Adenomdan karsinoma giden yolda önemli bir olay genomik ve/veya epigenetik stabilitenin kaybıdır. Genomik instabilite erken neoplastik lezyonların çoğunda gözlenmiştir ve KRK patogenezinde önemli bir olaydır (61). KRK’de genomik instabilite ve patogenezinde önemli 3 farklı yol tanımlanmıştır: Kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilite (MSI) ve CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) (66).

Kromozomal instabilite (CIN): CIN sporadik KRK’de en sık görülen (%80-85) genomik instabilite şekli olduğu için klasik yol olarak da kabul edilir (63). Kromozom yapısı ve sayısında değişikliklerle karakterizedir, anöploidik tümörlere ve heterozigotluk kaybına (LOH) neden olur (60). Tümör baskılayıcı genlerde delesyonlara (*APC*, *TP53*, 18q LOH) ve protoonkogenlerde aktivasyona (*KRAS*) sebep olmaktadır (67). CIN’den kaynaklanan KRK’ler daha kötü prognoza sahiptirler (68).

Mikrosatellit instabilite (MSI): MSI, HNPCC sendromunun ayırt edici bir özelliğidir ve vakaların %95’inden fazlasında görülür; ancak sporadik KRK vakalarının yaklaşık %15 kadarında görülür (69). MMR genlerindeki işlev kaybından kaynaklanmaktadır (66). Bu durum genellikle MMR genlerinin (vakaların >%80’i

MLH1 geninde) promotör hipermetilasyonu ile susturulmasına neden olur ve genomda mikrosatellit bölgelerinde mutasyonların birikmesine sebebiyet verir (60). Bu tümörler çoğunlukla diploiddir ve daha az LOH barındırır. MSI ilişkili KRK genelde 50 yaş altında görülür ve prognozları daha iyidir (63,67).

CpG adası metilatör fenotipi (CIMP): Tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerindeki CpG adalarında yoğun metilasyon sonucu genlerin transkripsiyonel olarak susturulduğu bir fenomendir. Bu durumun varlığı CIMP+ olarak ifade edilir. Bu gruptaki tümörler genellikle *BRAF* (V600E) mutasyonlarıyla ilişkilidir (67). Bu fenomen daha çok proksimal (sağ) kolon kanserleriyle ilişkilidir (62).

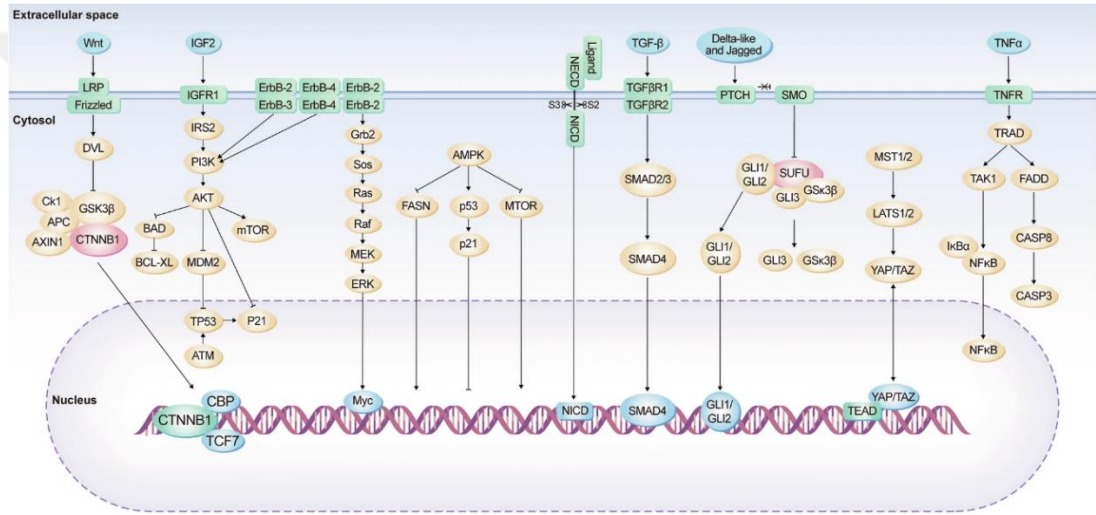
Genomik instabilite mekanizmaları farklı olsa da KRK patogenezinde sıklıkla birlikte bulunurlar; örneğin, CIMP ve MSI sıklıkla birbiriyle ilişkilidir, çünkü CpG adalarının hipermetilasyonu MMR genlerini inaktif hale getirerek MSI'ya yol açabilir. Sporadik KRK'lerde, bu mekanizmalar farklı sıklıkta görülürler; %85 CIN, %20 CIMP+ ve %15 MSI (66).

2.1.3.2. KRK'de Sinyal Yolakları

KRK gelişimi en erken lezyonlardan karsinoma giden yolda oldukça karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir. Bu süreçte çeşitli genler ve sinyal yolakları kompleks bir şekilde beraber hareket etmektedir. Sinyal yolakları hücre büyümesinde, çoğalmasında ve homeostazında önemli bir rol oynarlar (66).

Kontrolsüz hücre çoğalması, anormal hücre farklılaşması, apoptozdan kaçış ve invazyon gibi kansere neden olan biyolojik süreçlerden sinyal yolaklarının anormal aktivasyonuna yol açan genetik ve epigenetik değişiklikler sorumludur. Birçok sinyal yolakları KRK ile ilişkilendirilmiştir ancak bu karmaşık süreç halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Adenomdan karsinoma giden bu yolda sinyal yolaklarının anlaşılması KRK'nin tanı ve tedavisinde yeni potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesi açısından büyük önem arz etmektedir.

KRK genellikle WNT/ β -katenin sinyal yolağını etkileyen mutasyonlarla başlar ve oluşan neoplastik hücrelerde PI3K/Akt, EGFR/MAPK, TGF β dahil diğer sinyal yollarının da etkilenmesiyle kanser ilerlemeye devam eder (61). PI3K/Akt yolağındaki mutasyonlar Akt'nin aşırı ekspresyonuyla ilişkilidir ve KRK vakalarının yaklaşık %70'inde mevcuttur. CREB transkripsiyon faktörünü düzenleyen EGFR/MAPK yolağının aşırı aktivasyonu KRK'de gözlenir. WNT yolağı, hücredeki β -katenin seviyelerini düzenler ve *MYC*, *CCND1* ve *AXIN2* gibi hedef genleri aktive eder (70). KRK patogenezinde rol oynayan çeşitli sinyal yollarını Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. KRK'de rol oynayan çeşitli sinyal yollarını (66)

2.1.3.3. KRK'de Epigenetik Değişiklikler

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik olmadan gen ifadesinde kalıtsal değişikliklerle sonuçlanan modifikasyonları tanımlar (71,72). KRK'de epigenetik genetiğe kıyasla nispeten yeni ve az çalışılmış bir alandır. Epigenetik modifikasyonlar KRK patogenezinde rol alan önemli olaylardır ve genetik mutasyonlarla etkileşim halindedir (73). Genetik mutasyonlar epigenetik düzenlemeyi etkileyerek genomik instabiliteye ve mutageneze neden olur. Aynı şekilde MMR genlerini etkileyen epigenetik faktörler de genomik instabiliteye ve proto-onkogen/tümör baskılayıcı genlerde disregülasyona neden olur (71). Epigenetik değişikliklerin karsinogenezisin erken dönemlerinden itibaren meydana geldiği ve genetik değişikliklerden daha sık

olarak ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (71,74). Epigenetik değişiklikler potansiyel olarak geri döndürülebilir hedefler olduğu için kanser tedavileri için ilgi çekici olmaktadır (72,75). KKK patogenezinde DNA metilasyonu, histon modifikasyonları gibi önemli epigenetik modifikasyonlar ve kodlamayan RNA'lar [özellikle de mikroRNA (miRNA) ve uzun kodlamayan RNA (lncRNA)] gibi epigenetik düzenleyiciler rol almaktadır (75).

DNA metilasyonu: KKK patogenezinde metilasyon profili ile ilgili iki temel değişiklik vardır. Genlerin promotörlerindeki CpG adalarının hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genleri susturur; genomda tekrarlayan genetik elementlerin hipometilasyonu ise genomik instabilite ve onkogen aktivasyonuna neden olur (61).

Histon modifikasyonları: Histon asetilasyonu ve histon metilasyonu gibi modifikasyonların anormal düzenlenmesi tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin ekspresyonunu etkileyerek KKK'de tümör oluşumu, ilerleme ve metastaz gibi olayları başlatabilir (73).

Kodlamayan RNA'lar: miRNA ve lncRNA gibi protein kodlamayan RNA'lar; diğer kodlamayan RNA'lar, kodlayan RNA'lar, proteinler ve DNA ile etkileşerek gen ekspresyon ağlarını düzenlemektedir (72). Kanserde çok önemli rolleri olan bu grup ilerde tartışılacaktır.

2.1.4. Klinik Bulgular

KRK'ler erken dönemlerde çoğunlukla asemptomatiktirler (76). Hastalığın ilerlemesiyle birlikte çeşitli klinik bulgular ortaya çıkabilmektedir. Hastalar gaitada kan, bağırsak alışkanlıklarında değişiklik, karın ağrısı, anemi ve kilo kaybı gibi şikayetlerle başvurabilirler (25). Tümörün anatomik yerleşimi de klinik bulguları etkilemektedir. Genellikle sağ kolondaki tümörlerde abdominal kitle ve anemi, kaşeksi gibi sistemik semptomlar daha sık görülürken, sol kolondaki tümörlerde gaitada kan ve obstrüksiyonlar daha sık görülür. Rektal kanserlerde ise dışkılama alışkanlığında değişiklik gibi bulgular sık görülür (76). Hastaların %20-25 kadarında tanı anında metastaz durumu mevcuttur ve bu hastaları metastatik bulgular açısından değerlendirmek önemlidir (77).

2.1.5. Tanı ve Tarama

KRK tanısı genellikle kolonoskopi sırasında alınan biyopsi ya da cerrahi sırasında alınan örneğin histopatolojik incelemesi ile konulur. Vakalarının çoğunluğu adenokarsinom morfolojisindedir. Yukarıda bahsedilen klinik bulguları olan kişilerde ya da asemptomatik olup rutin tarama testlerinde veya görüntüleme testlerinde tesadüfi bir bulgu görüldüğünde KRK tanısından şüphelenilmelidir. Tanıya yardımcı olan başka yöntemler olsa da kolonoskopi neoplastik lezyonlara tanı koymada halen altın standart yöntemdir (78). Kolonoskopi; lezyonların anatomik lokalizasyonun yapılabilmesine, senkron neoplazmların tespitine, polipektomi yapılmasına ve histopatolojik olarak kesin tanı konulması için gereken biyopsi örneklerinin alınmasına olanak sağlar.

Hemogramda demir eksikliği anemisi ve karaciğer metastazlarına bağlı karaciğer fonksiyon testlerinde (KCFT) değişiklik gibi laboratuvar değerleri kanser tanısı desteklese de tanı testi olarak kullanılamazlar (79). Aynı şekilde karsinoembriyonik antijen (CEA) ve CA 19-9 gibi tümör belirteçleri de prognoz ve hastalık takibinde önemli belirteçler olmasına rağmen tanı ve tarama testi olarak kullanılamazlar (79).

KRK'lerin %60-70 kadarına ileri evrelerde tanı konulmaktadır (80). Sağlıklı toplumların düzenli bir şekilde taranması erken tanı ve kanserin önlenmesinde büyük önem arz etmektedir. Dünya genelinde yapılan tarama programları genellikle 50-75 yaş aralığındaki bireyleri kapsamaktadır ve programlar arasında çeşitli farklılıklar mevcuttur (33). Ancak farklı risk grubundaki kişilerde farklı stratejiler önerilmektedir. Örneğin; ortalama riske sahip bireylerde 45 yaşından sonra tarama önerilirken, yüksek risk grubundaki FAP hastalarında 10-12 yaşlarından itibaren yıllık sigmoidoskopi önerilir, aynı şekilde HNPCC hastalarının 20'li yaşlardan itibaren yıllık ya da iki yılda bir taranması önerilmektedir (81). Ayrıca 60 yaşından önce KRK tanısı alan birinci derece akrabası olanlarda ya da herhangi bir yaşta KRK tanısı olan ikiden fazla akrabası olanlarda taramanın 40 yaşında veya ailede en erken yaşta tanı alan kişinin başlangıç yaşından 10 sene öncesinde başlanması önerilmektedir (81).

KRK taramasında kullanılan testler üç ana kategoriye ayrılabilir. Gaitadan bakılan Guaiac gaitada gizli kan testi (gFOBT), fekal immunohistokimyasal test (FIT) ve çok hedefli gaita DNA testi (mt-sDNA); periferik kan örneğinden bakılan Epi proColon ve Guardant Shield testleri; doğrudan vizüalizasyona yönelik kolonoskopi, flexible sigmoidoskopi, bilgisayarlı tomografi (BT) kolonografisi (sanal kolonoskopi) ve kapsül endoskopi örnek verilebilir (82,83).

2.1.6. Evreleme ve Prognoz

Evreleme hem prognoz tayini hem de hastalara uygulanacak tedavinin seçimi için büyük önem arz etmektedir (77). Bu amaçla kullanılan TNM (Tümör, Nod, Metastaz) evreleme sistemi uluslararası kabul görmüş standartları sağlamaktadır. TNM sistemi kanserin anatomik yayılımını belirler ve T: tümör boyutu ve bağırsak duvarına invazyon derecesi N: lenf nodu tutulumu ve M: metastaz gibi 3 faktörün birleşimi evreyi belirlemek için kullanılmaktadır (84). KRK genel olarak 5 evreye ayrılabilir;

Evre 0: Karsinoma in-situ (Tis, N0, M0).

Evre 1: (T1-T2, N0, M0).

Evre 2: (T3-T4, N0, M0).

Evre 3: Lenf nodu tutulumu mevcut (Herhangi bir T, N1-N3, M0).

Evre 4: Metastatik kanser (Herhangi bir T, Herhangi bir N, M1).

Yeni tanı konulan KRK olgularında TNM evresi prognoz tayininde altın standarttır. TNM evresi özellikle erken (evre 1) ve ileri (evre 4) hastalıkta güçlü bir prognostik belirteçtir (85). 5 yıllık sağkalım oranı cerrahi olarak rezeke edilebilen lokalize kanserlerde %90'ın üstünde iken cerrahi tedavi şansı olmayan metastatik hastalarda %14'lere kadar düşmektedir (76,86). Histolojik derece, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve tümörün yerleşimi gibi histolojik belirteçler ve MSI, *KRAS*, *BRAF* gibi moleküler biyobelirteçler önemli prognostik bilgi sağlamaktadır (77,85).

2.1.7. Tedavi Stratejileri

KRK'de hastanın klinik durumuna, kanser evresine, tümörün anatomik lokalizasyonuna, tümörün moleküler özelliklerine ve metastaz olup olmamasına göre hastaya uygun bir tedavi stratejisi çizilmektedir. Hastalığın evresine bağlı olarak verilen tedaviler önemli ölçüde farklılıklar göstermektedir. Tedaviler tek başına uygulanabildiği gibi kombine olarak da uygulanabilmektedir. Başlıca tedavi seçenekleri şunlardır;

Cerrahi tedavi: Küratif amaçlı tedavilerin temelini cerrahi tedaviler oluşturur. Metastatik olmayan KRK'li hastalar için temel tedavi yöntemidir (61).

Radyoterapi (RT): RT nüksleri azaltmak ve cerrahiden önce tümör boyutunu küçültmek için kullanılmaktadır (87). KRK vakalarının üçte birini oluşturan rektal kanserde tek başına ya da kombine RT içeren neoadjuvan tedaviler önerilmektedir ve bu tedaviler orta ve ileri evre kanserlerde tümör yükünü önemli oranda azaltmaktadır (87,88).

Kemoterapi (KT): KT'de kanser hücrelerini yok etmek veya çoğalmalarını engellemek amacıyla kullanılan sitotoksik ilaçlar hastalığın ilerleyişini yavaşlatarak bireyin yaşam süresinin uzamasına yardımcı olmaktadır. Cerrahi öncesinde neoadjuvan olarak veya sonrasında adjuvan olarak kullanılabilir (87,88). KRK'de kullanılan sitotoksik ilaçlara 5-florourasil (5-FU), kapesitabin, oksaliplatin ve irinotekan örnek verilebilir.

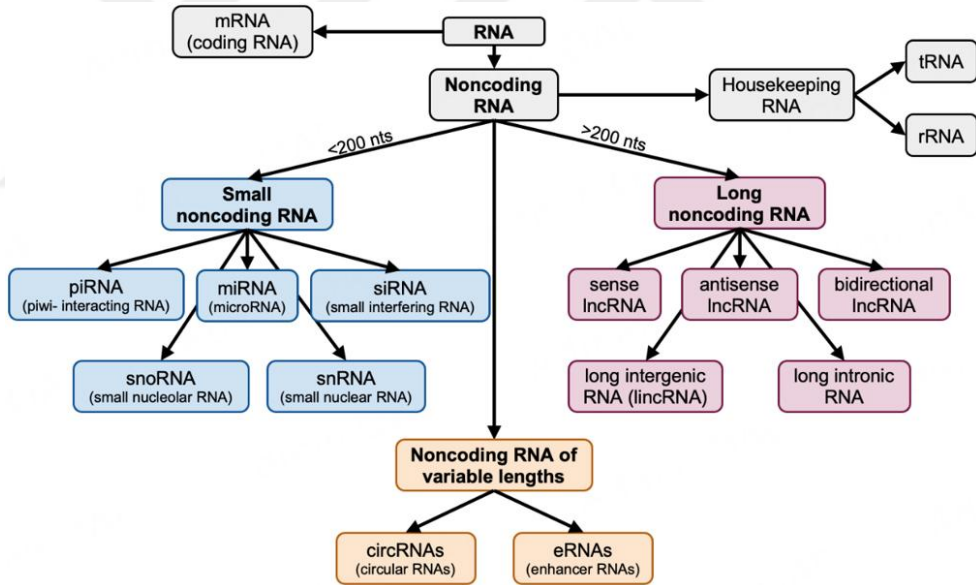
Hedefe yönelik tedaviler: Bu tedaviler belirli bir yolağı hedef alarak doğrudan kanser hücrelerini öldürür. Bu sayede hem tümör hem de sağlıklı hücrelerin ölümüne neden olan KT'ye kıyasla daha az yan etkilere sebep olmaktadır (87). Bu amaçla küçük molekül ağırlıklı monoklonal antikolar kullanılmaktadır (89). Kanserde bir sinyal yolunun bloke edilmesi bazen kanser hücreleri tarafından başka yolların aktive edilmesine yol açarak tümörün tedaviden kaçmasına neden olmaktadır. Bu nedenle genellikle birden fazla inhibitörün kombine edilmesi daha iyi sonuçlar vermektedir ancak kombine tedavilerde de toksisite ve yan etkiler artmaktadır (90). *RAS* mutasyonu olmayan hastalarda kullanılabilen anti-*EGFR* antikoları (cetuximab, panitumumab), anjiyogenezi engelleyen anti-*VEGF* antikoları (bevacizumab, aflibercept), *KRAS* G12C mutasyonu varlığında kullanılabilen sotorasib/adagresib ve *BRAF* V600E mutasyonu varlığında kullanılan encorafenib + cetuximab kombinasyonu KKK'de kullanılan hedefli tedavilere örnek olarak verilebilirler (91,92).

İmmünoterapi: İmmünoterapi, kanser hücrelerini yok etmek için immün sistemin uyarılması sonucu artmış immünite ile ilişkili farklı tedavi stratejilerinin tümüne verilen addır (87,93). Bu tedavi alanı immün hedefli tedavi, immün checkpoint blokajı (ICB), bispesifik antikolar, aşılar, onkolitik virüsler, kimerik antijen reseptörü (CAR) T ve NK hücresi gibi çeşitli yaklaşımları içerir. İmmünoterapiye örnek olarak; MSI-H veya dMMR KKK hastalarında anti-PD1 ilaçları (Pembrolizumab, Nivolumab) immün checkpoint blokajı ile oldukça etkili tedavilerdir (91–93).

Bahsedilen tedavilerle birlikte potansiyel yeni tedavi hedefleri araştırılmaya devam etmektedir. Örneğin; miRNA, lncRNA, small-interfering RNA (siRNA) gibi kodlamayan RNA'lar KKK'de tanısal biyobelirteç ve tedavi hedefi olma yolunda büyük umut vaat etmektedir ve bu alanda sayısız çalışmalar yapılmaktadır (66).

2.2. Kodlama Yapmayan RNA'lar (ncRNA'lar)

İnsan genomunun %2'den daha az kısmı protein kodlayan genlerden oluşmaktadır. Genomun büyük çoğunluğunu oluşturan kodlama yapmayan bölgelerin normal gelişim ve hastalıklardaki rolü yakın zamana kadar bilinmemekteydi. Dizileme teknolojileri, transkriptomik ve biyoinformatik alanlarındaki ilerlemeler transkripsiyona uğrayan ancak protein kodlamayan ncRNA genlerinin varlığını ortaya koymuştur. Bu minvalde yapılan FANTOM ve ENCODE projeleri genomun %80 kadarının RNA'ya transkribe edildiğini ancak büyük çoğunluğunun ncRNA genleri olduğunu göstermiştir (94,95). Binlerce ncRNA tanımlanmasına rağmen halen çoğunun işlevi bilinmemektedir. Oldukça heterojen bir grup olan ncRNA'lar; uzunluklarına, şekillerine, konumlarına ve biyolojik rollerine göre sınıflandırılmaktadır. Şekil 6'da ncRNA'ların önemli bir grubu gösterilmektedir.



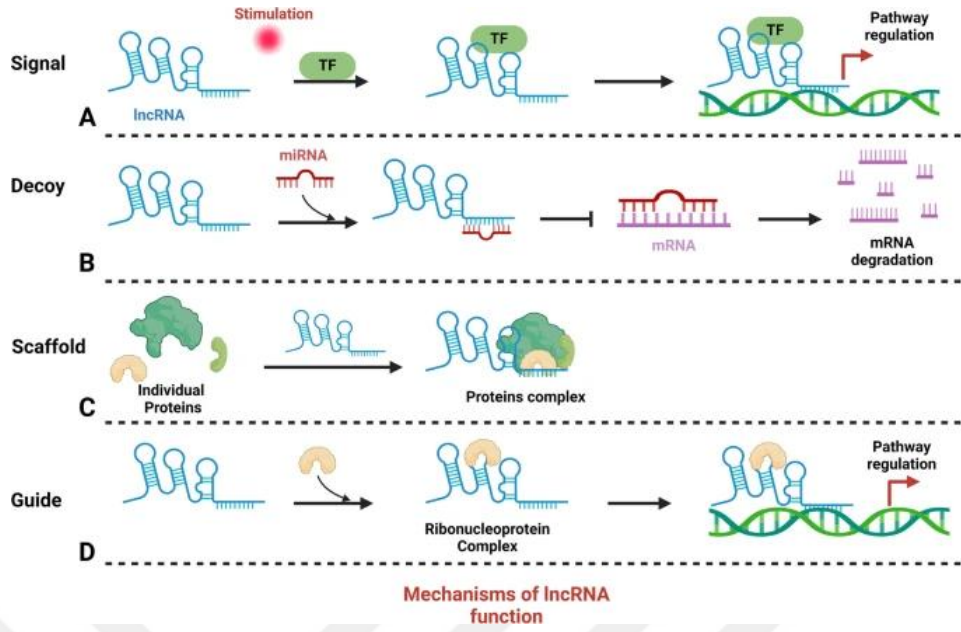
Şekil 6. RNA'ların sınıflandırılması (96). ncRNA'lar housekeeping RNA'lar ve düzenleyici RNA'lar olarak iki gruba ayrılabilir. Düzenleyici RNA'lar da uzunluklarına göre kısa ncRNA'lar (<200 nükleotit) ve uzun ncRNA'lar (>200 nükleotit) olarak iki ana gruba ayrılabilir. Sirküler ve enhancer RNA'lar değişken uzunluklarda olabilir, bu nedenle iki gruptan ayrı tanımlanır.

Uzun kodlamayan RNA (lncRNA), mikroRNA (miRNA), PIWI-interacting RNA (piRNA), sirküler RNA (circRNA) ve küçük nükleer RNA'lar (snRNA) gibi ncRNA'lar hücrelerde yaygın olarak bulunurlar. ncRNA genleri tümör baskılayıcı veya onkogen olarak görev alabilirler ve kanserle ilişkili genleri etkileyerek kanser oluşumunda önemli rol alırlar (97,98). Farklı mekanizmalarla karsinogenezde rol aldıklarından dolayı ncRNA'lar potansiyel tanı ve tedavi hedefi olmaktadır (98).

2.2.1. Uzun Kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar)

Protein kodlamayan RNA'ların en büyük alt grubu olan lncRNA'lar 200 nükleotidden daha uzun RNA'lardan oluşmaktadır. GENCODE veritabanı insanlarda 20.000'in üzerinde lncRNA rapor etmektedir, bazı kaynaklara göre de insanlarda lncRNA sayısının 100.000'in üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (99,100). Oldukça heterojen bir grup olan lncRNA'lar, sıklıkla genomda protein kodlayan genlerin konumuna göre sınıflandırılmaktadırlar (sense, antisense, intergenik, intronik, çift yönlü, enhancer) (101).

lncRNA'ların hücresel lokalizasyonları işlevlerini doğrudan etkilemektedir (102). Nükleusta yer alan lncRNA'lar kromatin modifikasyonu, epigenetik ve transkripsiyonel düzenlemede görev alırken, sitoplazmadaki lncRNA'lar genellikle post-transkripsiyonel düzenlemede görev alır ve böylece mRNA stabilitesini, translasyonu ve rekabetçi endojen RNA (ceRNA) ağını düzenler (99,103). lncRNA'lar gen ifadesini çeşitli düzeylerde etkileyebilirler (99). DNA'yla, diğer RNA'larla veya proteinlerle doğrudan ya da dolaylı etkileşime girerek işlev görürler. Transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel süreçlerde rol alan lncRNA'ların önemli bazı işlevleri Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. lncRNA'ların fonksiyonel mekanizmaları (104). **A** Çeşitli stimülanlara yanıt olarak transkripsiyon faktörlerine bağlanarak sinyal yollarını düzenler. **B** miRNA süngeri olarak davranarak, hedef mRNA degradasyonunu engeller. **C** İskele görevi yaparak protein kompleksleri oluşturmaya yardımcı olur ve böylece hedef genin transkripsiyonunu düzenler. **D** Ribonükleoprotein komplekslerini spesifik DNA dizilerine yönlendirerek gen ekspresyonunu etkiler.

En önemli fonksiyonlarından biri, miRNA süngeri olarak hareket ederek miRNA'ları hedef mRNA'lardan izole etmeleridir ve böylece hücre içi hedef mRNA seviyesini düzenlerler (105,106). mRNA degradasyonunu engelleyerek hücre içi seviyelerini yükseltirler. Yani lncRNA'lar miRNA fonksiyonunun negatif düzenleyicisi ve hedef gen ifadesinin pozitif düzenleyicisi olarak görev yaparlar.

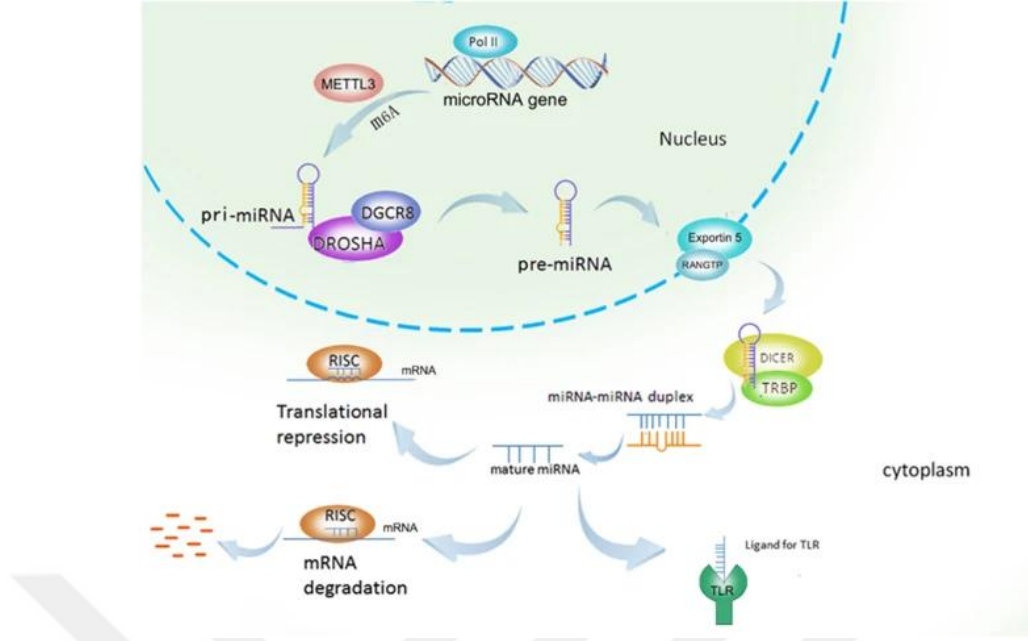
Hücrede çok sayıda önemli biyolojik işlevin düzenlenmesinde rol alan lncRNA'ların anormal profili; hücre proliferasyonu, migrasyon, invazyon, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), apoptoz gibi kanser süreçlerinde yer almaktadır. lncRNA'ların karsinogenez süreçlerinde onkojenik veya tümör baskılayıcı olarak rol aldıkları gösterilmiştir (107). *MALAT1*, *H19* ve *PCA3* kanserde aşırı ekspresyon artışı gösterdiği bulunan ilk lncRNA'lardandır ve daha sonrasında önemli onkojenik rolleri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *HOTAIR*, epigenetik düzenlemelerle kanser progresyonunda rolü gösterilen ilk lncRNA olduğu için önemlidir (108).

KRK gelişiminde prekanseröz polipten uzak metastaza kadar uzanan yolda çok çeşitli lncRNA'lar, farklı evrelerde, farklı rollerde ve farklı mekanizmalarla kanser progresyonunda rol almaktadırlar (109). KRK'de lncRNA'ların rolü halen tam olarak bilinmemektedir ancak bu konuda yapılan çalışmalar lncRNA'ların kanserdeki rollerine ışık tutmaktadır. lncRNA'lar prognostik belirteç ve terapötik hedef olabileme potansiyellerinden dolayı son yıllarda ilgi çeken moleküller olmuşlardır (96,99,104,109).

2.2.2. MikroRNA'lar (miRNA'lar)

2024 Nobel Tıp Ödülünün konusu da olan miRNA'lar, post-transkripsiyonel gen düzenlenmesinde görev alan ~22 nükleotid uzunluğundaki küçük kodlamayan RNA grubudur (110,111). Türler arasında oldukça korunan miRNA'lar çoğalma, farklılaşma, metabolizma, apoptoz ve hayatta kalma gibi temel hücrel biyolojik süreçlerde önemli rollere sahiptirler (111–113). İlk tanımlanan miRNA olan lin-4 1993 yılında, ilk insan miRNA'sı let-7 ise 2000 yılında keşfedilmiştir; günümüzde ise 2000'in üzerinde farklı insan miRNA'sı tanımlanmıştır (114,115).

miRNA genleri protein kodlayan genlerin intron veya ekzonlarında (intragenik) ya da intergenik konumlarda lokalizedir (116). Çoğu miRNA, DNA dizilerinden primer miRNA'lara (pri-miRNA) transkribe olur ve önce prekürsör miRNA'lara (pre-miRNA) daha sonra ise olgun miRNA'lara işlenir (116,117). Olgun miRNA'lar RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) olarak bilinen efektör komplekse entegre olarak hedef mRNA'ların 3' untranslated bölgesinde (UTR) tamamlayıcı dizilerine bağlanır ve translasyonel baskılama ya da mRNA degradasyonu gibi iki temel yoldan biriyle gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (114,117). Şekil 8'de miRNA biyogenezi ve temel fonksiyonel etkileri gösterilmiştir.



Şekil 8. miRNA biyogenezi ve fonksiyonel etkileri (117)

Ayrıca miRNA'ların belirli koşullarda gen ifadesini aktive ettiği de gösterilmiştir (116). Tek bir miRNA'nın 200 kadar farklı mRNA hedefi olabilir, ayrıca birbirinden farklı miRNA'lar aynı hedef mRNA'yı modüle edebilir. Bu durum miRNA ağının geniş kapsamını ve karmaşıklığını göstermektedir (110,111,118,119).

miRNA genlerindeki amplifikasyonlar ve delesyonlar, miRNA biyogenezindeki kusurlar ya da miRNA genlerini etkileyen epigenetik değişiklikler gibi durumlar miRNA ifadesinde düzensizliklere sebep olmaktadır (117,119). miRNA ifadesinin düzensizliği, anormal gen ifadesiyle ilişkilidir ve metabolik hastalık, kardiyovasküler hastalık, nörodejeneratif hastalık ve kanser dahil çok çeşitli patolojik süreçlerle ilişkilendirilmiştir.

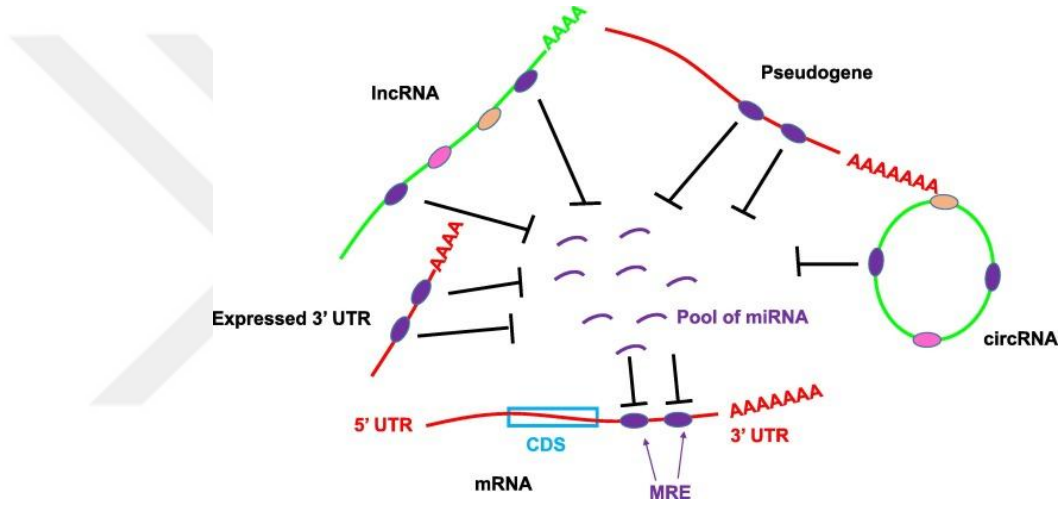
Kanserin gelişiminde ve ilerlemesinde miRNA'ların önemli rolleri bulunmaktadır. miRNA ifadesindeki değişiklikler, tümör başlangıcı, ilerlemesi ve metastaz dahil tümörögenезisin tüm aşamalarında meydana gelebilir. Belirli kanser tipleri onları normal köken dokudan ve diğer kanser tiplerinden ayıran bir miRNA imzası gösterebilir (113). Düzensiz miRNA ifadesi proliferatif sinyali sürdürmek, büyüme baskılayıcılardan kaçınmak, hücre ölümüne direnmek, invazyon ve metastazı aktive etmek ve anjiyogenezi aktive etmek dahil tümörögenезisteki olaylarda önemli roller oynamaktadır (117). Bu değişikliklere neden olan miRNA'lar hücreşel şartlara bağılı olarak onkogen veya tümör baskılayıcı olarak davranabilirler (110,111,113). Örneğın KKK'de *miR-21* gibi miRNA'lar PI3K/Akt sinyal yoluyla tümör baskılayıcı genleri hedefleyerek hücre proliferasyonunu teşvik ettiğı için onkomiR olarak davranırken; *miR-296* ve *miR-145* gibi miRNA'lar Wnt/ β -katenin sinyal yolunu hedef alarak hücre çoğalmasđ, invazyon ve metastaz inhibisyonuyla tümör baskılayıcı miR olarak davranırlar (120). KKK'de miRNA'lar erken tanı, prognoz tayini, terapötik hedef ve ilaç direnci için önemli potansiyel belirteçler olabilirler ve bu nedenle son yıllarda araştırmaların odağı olmuşlardır.

2.2.3. Rekabetçi Endojen RNA (ceRNA) Hipotezi

miRNA'lar hedef RNA transkriptlerinin 3'UTR bölgelerinde tamamlayıcı olan dizilere parsiyel olarak bağılanır, bu dizilere mikroRNA tanıma elemanları (MRE) denilmektedir ve bağılanma genellikle hedef gen ifadesinin baskılanmasıyla sonuçlanır (121). Hedef mRNA'ları baskılayan miRNA'lar genel olarak gen ifadesinin negatif düzenleyicileri olarak kabul edilirler.

miRNA molekülleri çok sayıda MRE'yi hedefleyebilir ve yüzlerce transkripti baskılayabilir. İnsanlarda protein kodlayan genlerin %60'tan fazlasının miRNA'ların potansiyel hedefi olabileceğı ve kanser dahil birçok patolojik süreçte miRNA-mRNA etkileşiminin önemli rol oynadığı düşünölmektedir (109).

İlk olarak Salmena ve arkadaşları tarafından ortaya atılan rekabetçi endojen RNA (ceRNA) hipotezi; MRE'leri içeren çeşitli kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan endojen RNA moleküllerinin miRNA'ların mRNA'lar üzerindeki etkisini rekabetçi bir şekilde engelleyebileceğini öne sürmektedir (122,123). lncRNA'lar, circRNA'lar ve diğer ncRNA'lar gibi kodlamaya yapmayan RNA'lar, diğer mRNA'lar ve psödogenler MRE bölgeleri sayesinde miRNA'ları kendilerine çekerek ceRNA fonksiyonu gösterebilirler ve böylece miRNA-mRNA etkileşimini engellerler (123,124). Şekil 9'da ceRNA hipotezi gösterilmiştir.



Şekil 9. ceRNA hipotezi (124). MRE bölgelerini taşıyan çeşitli endojen RNA molekülleri sınırlı bir miRNA havuzu için rekabet ederler ve böylece mRNA baskılanmasını engelleyerek gen ekspresyonunu pozitif yönde etkilerler. lncRNA ve circRNA gibi kodlamayan RNA'lar birden fazla miRNA için MRE'ler taşıyabilirler (farklı renklerde gösterilmiştir).

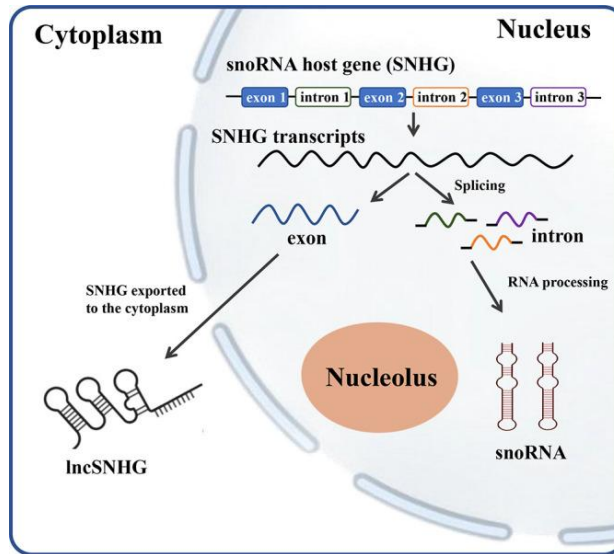
İki ayrı RNA molekülü ortak MRE'yi paylaştıklarında, aynı miRNA için rekabet edeceklerdir. Yani bir ceRNA up-regüle olduğunda daha fazla miRNA'yı bağlayacaktır ve ortamdaki serbest miRNA havuzu azalacaktır dolayısıyla miRNA süngeri olarak fonksiyon gösterecektir. Aynı MRE'yi paylaşan hedef mRNA'ya daha az miRNA bağlanacağı için miRNA baskılanmasından kurtulmuş olacaktır ve gen ekspresyonu pozitif yönde etkilenecektir. Çeşitli ceRNA ağlarının karsinogenez, metastaz ve tedavi direnci gibi kanser süreçlerinde rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca ceRNA ağları yeni tedavi hedeflerinin bulunması fırsatı da sağlamaktadır; örneğin

ceRNA fonksiyonlarını taklit eden yapay miRNA süngerleri, kanser tedavisinde RNA tabanlı terapötik uygulamalara zemin hazırlamaktadır (125).

2.3. lncRNA *SNHG22* / *miR-4492* / *FOXK1* RNA'ları

2.3.1. lncRNA *SNHG22*

Küçük nükleolar RNA konak genleri (SNHG), lncRNA'ların özel bir grubudur. Nükleusta yer alan SNHG'ler primer transkriptlere dönüştükten sonra farklı ekzon ve intronlara ayrılırlar. Splicinge uğrayan ve sitoplazmaya yönlendirilen ekzonlar, mRNA ya da lncSNHG olarak işlev görürken, intronik bölgeler nükleusta kalarak snoRNA'lara işlenir (126,127). Küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA) 60-300 nt uzunluğunda olup rRNA ve diğer RNA'ların modifikasyonunda görev alan kodlamayan RNA'lardır (126). lncSNHG'ler ise diğer lncRNA'lar gibi fonksiyon gösterip tümör baskılayıcı ya da onkojenik görev yapabilirler. Şekil 10'da SNHG, snoRNA ve lncSNHG arasındaki ilişki gösterilmiştir.

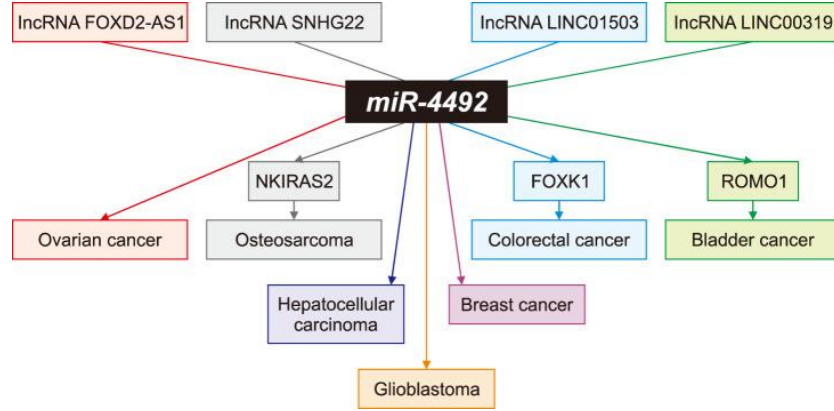


Şekil 10. SNHG, snoRNA ve lncSNHG arasındaki ilişki (127)

lncSNHG ailesinin 32 üyesi tanımlanmıştır (128). Bu ailenin bir üyesi olan *SNHG22* kromozom 18q21.1 de bulunmaktadır. lncRNA *SNHG22*'nin çeşitli kanserlerde onkojenik özellikleri bildirilmiştir. Over kanseri, gastrik kanser, özefagus karsinomu, hepatoselüler karsinom, meme kanseri, renal hücreli karsinom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve kolorektal kanserdeki etkisi araştırılmıştır (3–13). lncRNA *SNHG22* kanserlerde genel olarak çeşitli spesifik miRNA'ları süngerleyerek hedef genlerin ekspresyonlarını artırma yönünde bir etki göstermektedir. Yapılan araştırmalarda yüksek lncRNA *SNHG22* düzeyleri ileri kanser evresi, kötü prognoz ve kemoterapi direnci gibi durumlarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca yapılan bir çalışmada lncRNA *SNHG22*'nin osteosarkomda anti-tümoral etkiler gösterdiği bildirilmiştir (15). Çeşitli sinyal yolları üzerinden etki göstererek onkogeneze rol alan lncRNA *SNHG22*, KRK dahil çeşitli kanserlerde prognostik belirteç ve terapötik bir hedef olarak ilgi çekici hale gelmiştir.

2.3.2. miR-4492

Düzensiz miRNA profillerinin apoptoz, proliferasyon, invazyon ve metastaz gibi kanser süreçlerinde yer aldığı bilinmektedir. KRK ile ilişkili olabilecek miRNAlardan biri olan *miR-4492* kanser çalışmalarında yeterince araştırılmamıştır. Literatürde over kanseri, meme kanseri, mesane kanseri, glioblastoma multiforme, akciğer kanseri, melanoma, osteosarkom ve KRK gibi bazı kanserlerdeki rolü değerlendirilmiştir (14–21). *miR-4492* ile ilgili mevcut veriler çoğunlukla tümör baskılayıcı rol sergilediği yönündedir ancak literatürde meme kanserinde, osteosarkomda ve glioblastoma multiforme'de onkojenik rolleri olabileceğinden bahsedilmektedir (15,19). Şekil 11'de *miR-4492*'nin ilişkili olduğu bazı kanserler gösterilmiştir.



Şekil 11. *miR-4492*'nin ilişkili olduğu bazı kanserler ve ceRNA ağları (129)

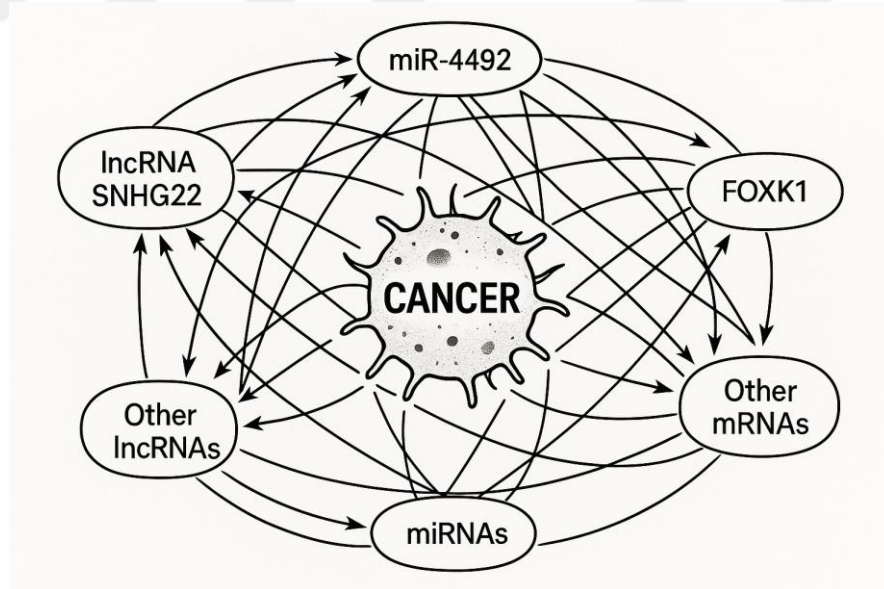
ceRNA ağlarına dahil olarak karsinogeneziste görev alan *mir-4492*'nin genellikle kanserlerde down-regüle olması tümör baskılayıcı rolünü desteklemektedir. Literatürde *mir-4492*'nin KKK ile ilişkisinin gösterildiği tek bir çalışma vardır ve bu çalışmada da *mir-4492*'nin onkojenik *Forkhead box protein K1 (FOXK1)* ekspresyonunu azalttığı ve tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı öne sürülmüştür (18).

2.3.3. FOXK1

Forkhead box (FOX) proteinleri, geniş bir biyolojik süreç yelpazesini (embriyogenez, organogenez, hücre sinyalizasyonu, hücre döngüsü, metabolik süreçler) kontrol eden evrimsel olarak korunmuş bir transkripsiyon faktörleri ailesidir (22,23). *FOX* ailesinin 100'den fazla üyesi vardır. Bu ailenin önemli bir üyesi olan *FOXK1* geni (OMIM * 616302) kromozom 7p22.1 de bulunmaktadır. *FOXK1*; hücre çoğalması, farklılaşma, hücre döngüsü ilerlemesi, otofaji, glikoliz ve DNA hasar yanıtı dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar.

FOXK1'in birçok malign dokuda up-regüle olduğu, tümör proliferasyonu ve metastazını indüklediği bilinmektedir (23,24). Özefagus kanseri, over kanseri, gastrik kanser, KRK, meme kanseri ve prostat kanseri dahil çeşitli kanser türlerinde onkojenik rolleri olduğu gösterilmiştir. Çeşitli kanserlerde araştırılan *FOXK1*'in KRK'de EMT'yi, proliferasyonu, invazyonu ve metastazı artırdığı gösterilmiştir (18,130–133). *FOXK1* çeşitli sinyal yolları tarafından düzenlenir ve *FOXK1* aktivitesini kontrol eden bu karmaşık düzenleyici yollar KRK dahil kanserlerde önemli ölçüde değişimlere uğrar. Bu nedenle *FOXK1* terapötik hedef olarak büyük potansiyel taşımaktadır (134).

Kanser süreçlerinde lncRNA, miRNA ve mRNA'lar arasında yüzlerce hatta binlerce etkileşim meydana gelebilir (Şekil 12). Bu moleküller, geniş ve karmaşık bir regülasyon ağı oluşturarak çeşitli ceRNA eksenlerinde yer almakta ve kanserin gelişiminde kritik roller üstlenmektedir. Kanser patogenezinin daha iyi anlaşılması amacıyla, bu potansiyel ceRNA ağlarının kapsamlı bir şekilde araştırılması büyük önem taşımaktadır.



Şekil 12. Kanser süreçlerinde lncRNA-miRNA-mRNA etkileşimleri. Bu çalışmanın odağı olan potansiyel moleküller ve diğer moleküller arasındaki sayısızca ilişki şematize edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışma Planı

Çalışmamız vaka-kontrol çalışması olarak planlanmıştır ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurul'undan 29.03.2024 tarihinde etik kurul onayı alınmıştır (Sayı: B.30.2.ATA.0.01.00/164, Karar No: 101). Çalışmaya KRK tanısı almış ve 35-80 yaş aralığında 50 hastanın dahil edilmesi planlanmıştır. Çalışmaya dahil olan tüm hastalardan yazılı şekilde aydınlatılmış onam alınmıştır. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi kliniğinde 2024 Mart ayı ile 2025 Şubat ayı arasında KRK tanısı kesinleşmiş olan ve cerrahi müdahaleye giden hastalardan müdahale esnasında alınan kanser dokuları ve cerrahi sınır negatif komşu sağlıklı dokular alınarak toplanmıştır. 50 adet kanserli doku ve 50 adet komşu sağlıklı doku müdahale sonrasında Eppendorf tüpüne alınarak, total RNA izolasyonu yapılana kadar -80 C°'de saklanmıştır.

Çalışmaya Alınma Kriterleri

1. Kolorektal kanser tanısı almış olması
2. Çalışmaya katılmayı kabul etmesi ve onam formunu imzalamış olması
3. Sonuçları etkileyecek herhangi başka bir kronik hastalığının olmaması

Dışlanma Kriterleri

1. Kemoterapi almış olması
2. Kolorektal kanser haricinde başka bir neoplazi öyküsü olması
3. Herhangi bir genetik hastalığı olması
4. RNA düzeylerini etkileyebilecek uzun süreli tedavi almış olması

Hastaların dahil edilme ve dışlanma kriterleri göz önünde bulunduruldu ve çalışmaya alınması uygun olan hastalardan alınan kanserli ve komşu sağlıklı dokular üç aşamalı bir süreçten geçti. Öncelikle total RNA izolasyonu yapıldı, daha sonra komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı ve en son kantitatif real-time polimeraz

zincir reaksiyonu (qPCR) ile hedef lncRNA *SNHG22*, *miR-4492* ve *FOXK1* ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Ekspresyon analizlerinde normalizasyon amacıyla lncRNA ve mRNA için *GAPDH* ve miRNA için *RNU6* genleri kontrol gen olarak kullanıldı. Hastaların laboratuvar ve ölçüm parametreleri klinik bilgileri ile birlikte kaydedildi.

3.2. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu Hybrid-R™ (GeneAll®, Korea; Katalog No: 305-101) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kit, güçlü bir lizis yeteneğine sahip olan RiboEx™'in lizis özelliğini ve glassfiber membran teknolojisine dayalı purifikasyonu kullanır. Doku örnekleri, hücreleri hızla lizise uğratan ve nükleazları inaktive eden fenol ve guanidin tuzu içeren monofazik bir çözelti olan RiboEx™ içinde homojenize edilir. Lizata kloroform eklenmesi homojenatın sulu ve organik fazlara ayrılmasını sağlar. DNA ve proteinler interfaz ve organik fazda kalırken, RNA sulu fazda bulunur. RNA içeren sulu faz, RNA bağlama tamponu olan RB1 ile karıştırılır ve ardından bir mini kolona bağlanır. SW1 ve RNW tamponları ile yıkandıktan sonra, RNA nükleaz içermeyen suda elüe edilir.

Kit üreticinin talimatları doğrultusunda kullanıldı. Kitin içeriği Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Hybrid-R™ kitinin içeriği (100 reaksiyonluk)

Hybrid-R™ 100p Kiti (GeneAll®)	
RiboEx™	100 ml
RB1 Tamponu (konsantre)	15 ml
SW1 Tamponu	55 ml
RNW Tamponu (konsantre)	12 ml
Nükleaz içermeyen su	20 ml
Tip F kolon (mini) (collection tüpü ile birlikte)	100
1.5 ml mikrosantrifüj tüpü	100
Protokol kitapçığı	1

Total RNA izolasyon protokolü aşağıdaki aşamalardan oluşmaktadır;

1. 100 mg doku örneği 1 ml RiboEx™ içinde homojenize edildi.
2. Homojenat oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
3. (Opsiyonel) 4 C°'de 10 dakika boyunca 12000 xg'de santrifüj yapıldı ve süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.
4. 1 ml RiboEx™'e karşılık 200 µl kloroform eklendi, 15 saniye boyunca kuvvetlice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
5. 4 C°'de 15 dakika boyunca 12000 xg'de santrifüj yapıldı ve bu aşamadan sonra karışım 3 faza ayrıldı. En üstte kalan sulu faz yeni bir tüpe aktarıldı.
6. Alınan numuneye 1 volüm kadar RB1 tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı.
7. Bu karışımın 700 µl kadarı collection tüpündeki Tıp F kolona (mini) aktarıldı.
8. Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca ≥ 10000 xg'de santrifüj yapıldı. Collection tüpü boşaltılıp, mini kolon collection tüpüne geri yerleştirildi.
9. Karışımın geriye kalanı kullanılarak 7. ve 8. adımlar tekrarlandı. Collection tüpü boşaltılıp, mini kolon collection tüpüne geri yerleştirildi.
10. Mini kolona 500 µl SW1 tamponu eklendi.
11. Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca ≥ 10000 xg'de santrifüj yapıldı. Collection tüpü boşaltılıp, mini kolon collection tüpüne geri yerleştirildi.
12. Mini kolona 500 µl RNW tamponu eklendi.
13. Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca ≥ 10000 xg'de santrifüj yapıldı. Collection tüpü boşaltılıp, mini kolon collection tüpüne geri yerleştirildi.
14. Kalan yıkama tamponunun çıkması için oda sıcaklığında 1 dakika daha ≥ 10000 xg'de santrifüj yapıldı. Mini kolon yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
15. Mini kolondaki membranın ortasına 50~100 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve 1 dakika bekletildi.
16. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca ≥ 10000 xg'de santrifüj yapıldı.

İzolasyon işlemleri bittikten sonra elde edilen RNA'ların konsantrasyon ölçümleri Maestro Nano spektrofotometre cihazı (Şekil 13) ile ölçüldü. A260/A280 oranına bakılarak total RNA'ların saflığı ve kalitesi belirlendi. Yüksek verimlilik ve

safılıkta (A260/A280 oranı 1.8 ile 2.2 arasında) olan total RNA örnekleri cDNA sentezinde kullanılmaya dek -80 C°'de saklandı.



Şekil 13. Maestro Nano spektrofotometre cihazı

3.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezinden önce ilk aşamadaki tüm total RNA'lar konsantrasyonları 100 ng/µl olacak şekilde standardize edildi. cDNA sentezleri A.B.T.TM miR cDNA Synthesis Kit (Atlas Biyoteknoloji, Türkiye; Katalog No: C04-01-20) kullanılarak gerçekleştirildi.

Üreticinin talimatları doğrultusunda bu çalışma için her örnekten üç ayrı cDNA sentez işlemi gerçekleştirildi (lncRNA, mRNA ve *GAPDH* için ayrı bir cDNA, miRNA için ayrı bir cDNA ve *RNU6* için ayrı bir cDNA). Kitin içeriği Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. A.B.T.TM miR cDNA Synthesis Kitinin içeriği (200 reaksiyonluk)

A.B.T. TM miR cDNA Synthesis Kiti (Atlas Biyoteknoloji)	
Reverse Transkriptaz (200 U/µl)	200 µl
10X Reaksiyon tamponu	1000 µl
RNase inhibitör (40 U/µl)	100 µl
20x dNTP karışımı (her biri 2.5 mM)	200 µl
RNase içermeyen su	2 ml

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı;

1. Kalıp olan total RNA'lar ve diğer tüm reaktifler buz üzerinde çözdürüldü, daha sonra hafifçe vorteksenerek karıştırıldı. Ardından tüplerdeki sıvıyı toplamak için kısa bir santrifüj işlemi yapıldı.
2. Tablo 3'te gösterildiği gibi 3 ayrı reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı. Her bir reverse transkriptaz (RT) reaksiyon karışımının total hacmi 20 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon bileşenlerinin karışması için yavaşça pipetleyerek kısa santrifüj yapıldı.

Tablo 3. Üç ayrı reverse transkriptaz reaksiyonu için karışım bileşenleri ve miktarları

	lncRNA, mRNA, GAPDH - cDNA	miRNA - cDNA	RNU6 - cDNA
10X Reaksiyon tamponu	2 µl	2 µl	2 µl
20X dNTP karışımı	1 µl	1 µl	1 µl
<u>Stem-loop miRNA primer</u>	-	2 µl	-
<u>Stem-loop RNU6 primer</u>	-	-	2 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl	1 µl	1 µl
RNase inhibitör	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
RNaz içermeyen su	5.5 µl	3.5 µl	3.5 µl
RNA örneği	10 µl	10 µl	10 µl
Total hacim	20 µl	20 µl	20 µl

3. Hazırlanan karışımların olduğu tüpler Tablo 4'te gösterilen ayarlarda PCR-thermal cycler Labcycler Basic (SensoQuest) cihazında inkübe edildi (Şekil 14).
4. Elde edilen cDNA'lar daha sonraki Real-time qPCR aşamasına kadar -20 C°'de saklandı.

Tablo 4. RT reaksiyonu için PCR-thermal cycler cihazının program ayarları

RT Basamakları	Sıcaklık (C°)	Süre	Siklus Sayısı
1. Basamak	25	10 dakika	1
2. Basamak	37	120 dakika	1
3. Basamak	85	5 dakika	1
4. Basamak	4	∞	1



Şekil 14. PCR-thermal cycler Labcycler Basic (SensoQuest) cihazı

3.4. Real-Time PCR (qPCR) Aşaması

3.4.1. mRNA, lncRNA ve GAPDH qPCR Çalışması

Bu çalışma A.B.T.™ 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (with ROX) (Atlas Biyoteknoloji, Türkiye; Katalog No: Q03-02-05) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Ayrıca bu çalışmadaki lncRNA, mRNA ve *GAPDH* primerleri Atlas Biyoteknolojiden temin edildi. Kullanılan primerler Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. lncRNA, mRNA ve *GAPDH* primer dizileri (5' → 3')

lncRNA <i>SNHG22</i>	forward	CTAAGAGTGGCCTCTGCGTG
	reverse	CAAGGCACCTAACAGGGGAG
<i>FOXK1</i>	forward	TTCCACACGACCCTGAGTTT
	reverse	TGCTGTGAGGTTACGATGGA
<i>GAPDH</i> (referans gen)	forward	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	reverse	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

mRNA, lncRNA ve *GAPDH* ekspresyon düzeylerinin ölçümü için üretici talimatları doğrultusunda gerekli işlemler aşağıdaki gibi yapıldı;

1. Öncelikle tarafımıza liyofilize olarak teslim edilen primerler nükleaz içermeyen su eklenerek reaksiyon için hazır hale getirildi.
2. qPCR reaksiyonu için gerekli bileşenler ve cDNA örnekleri buz üzerinde çözdürüldü, daha sonra hafifçe vortekslenerek karıştırıldı. Ardından tüplerdeki sıvıyı toplamak için kısa bir santrifüj işlemi yapıldı.
3. Reaksiyon karışımı üretici firmanın protokolüne uygun şekilde Tablo 6'da gösterildiği gibi yapıldı. Toplam volüm 20 µl olacak şekilde reaksiyon karışımları hazırlandı.

Tablo 6. mRNA, lncRNA ve *GAPDH* için qPCR reaksiyon karışımı bileşenleri ve volümleri

Bileşenler	Volüm
A.B.T. TM 2X qPCR SYBR-Green MasterMix	10 µl
Forward Primer	0.2 – 2 µl
Reverse Primer	0.2 – 2 µl
cDNA örneği	Değişken
RNaz içermeyen su	Total hacim 20 µl olacak kadar ekle

4. Pipetleme ve mikrosantrifüjle reaksiyonların iyice karışması sağlandı.
5. 0.1 ml hacmindeki strip tüplerde yer alan reaksiyon karışımı QIAGEN Rotor-Gene Q (Şekil 15) real-time PCR cihazına yüklendi. Cihaz 72'lik platform kullanılarak çalıştırıldı. Cihaz kit protokolüne uygun olarak Tablo 7'de yer alan basamaklara göre ayarlandı.

Tablo 7. Real-Time PCR (qPCR) Döngü Basamakları (lncRNA, mRNA ve *GAPDH* için)

0,	Sıcaklık (C°)	Süre	Siklus Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	300 saniye	1
Denatürasyon	95	10-30 saniye	25-40
Bağlanma	55-68	10-60 saniye	



Şekil 15. QIAGEN Rotor-Gene Q Cihazı

3.4.2. miRNA ve *RNU6* qPCR Çalışması

Bu çalışma A.B.T.™ 2X miRqGreen MasterMix (with ROX) (Atlas Biyoteknoloji, Türkiye; Katalog No: Q04-02-05) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Ayrıca bu çalışmadaki miRNA ve *RNU6* primerleri Atlas Biyoteknolojiden temin edildi. Kullanılan primerler Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. miRNA ve *RNU6* primer dizileri (5’ → 3’)

<i>miR-4492</i>	forward	AAGCAGCTGCCTCTGAGGC
	reverse	CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT
<i>RNU6</i> (referans gen)	forward	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
	reverse	CGCTTACGAATTTGCGTGTTCAT

miRNA ve *RNU6* ekspresyon düzeylerinin ölçümü için üretici talimatları doğrultusunda gerekli işlemler aşağıdaki gibi yapıldı;

1. Öncelikle tarafımıza liyofilize olarak teslim edilen primerler nükleaz içermeyen su eklenerek reaksiyon için hazır hale getirildi.
2. qPCR reaksiyonu için gerekli bileşenler ve cDNA örnekleri buz üzerinde çözdürüldü, daha sonra hafifçe vortekslenerek karıştırıldı. Ardından tüplerdeki sıvıyı toplamak için kısa bir santrifüj işlemi yapıldı.
3. Reaksiyon karışımı üretici firmanın protokolüne uygun şekilde Tablo 9’da gösterildiği gibi yapıldı. Toplam volüm 20 µl olacak şekilde reaksiyon karışımları hazırlandı.

Tablo 9. miRNA ve *RNU6* için qPCR reaksiyon karışımı bileşenleri ve volümleri

Bileşenler	Volüm
A.B.T. TM 2X miRqGreen MasterMix	10 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
cDNA örneği (miRNA-cDNA / RNU6-cDNA)	2 µl
RNaz içermeyen su	Total hacim 20 µl olacak kadar ekle

4. Pipetleme ve mikrosantrifüjle reaksiyonların iyice karışması sağlandı.
5. 0.1 ml hacmindeki strip tüplerde yer alan reaksiyon karışımı QIAGEN Rotor-Gene Q real-time PCR cihazına yüklendi. Cihaz 72’lik platform kullanılarak çalıştırıldı. Cihaz kit protokolüne uygun olarak Tablo 10’da yer alan basamaklara göre ayarlandı.

Tablo 10. Real-Time PCR (qPCR) döngü basamakları (miRNA ve *RNU6* için)

PCR Adımı	Sıcaklık (C°)	Süre	Siklus Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	300 saniye	1
Denatürasyon	95	10-30 saniye	25-40
Bağlanma	55-68	10-60 saniye	

PCR verilerinin rölatif kuantifikasyon ile normalizasyonu için *GAPDH* (lncRNA ve mRNA için) ve *RNU6* (miRNA için) referans genleri seçildi ve referans genlerin de qPCR çalışmaları yapıldı.

qPCR çalışmalarından sonra, her bir örnek için erime eğrisi ve reaksiyon eğrisi incelendi, sonrasında ışıma miktarını gösteren Ct (Cycle of threshold; döngü eşiği) değerleri hesaplandı. Daha sonrasında her bir örneğin Ct değeri veri analizlerinde kullanılmak üzere Excel dosyası olarak kaydedildi ve saklandı.

3.5. Verilerin Analizi

Çalışmamızda üretici firmanın talimatları doğrultusunda 50 adet kanserli doku ve 50 adet komşu sağlıklı dokudan toplamda 500 reaksiyon gerçekleştirildi. Her bir örnekten lncRNA *SNHG22*, *miR-4492*, *FOXK1* ekspresyon düzeyleri ve normalizasyon için *GAPDH* ve *RNU6* ekspresyon düzeylerine bakıldı.

Her örneğin Ct değeri qPCR cihazı tarafından otomatik olarak kaydedildi ve Rotor-Gene yazılım programında 50 çift örneğin Ct değerleri ve Ct analiz eğrileri analiz edilip kaydedildi.

Elde edilen veriler kullanılarak lncRNA, miRNA ve mRNA ekspresyon değişiklikleri Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) yöntemiyle hesaplandı. Livak yöntemi qPCR verilerinin analizinde genlerin rölatif ekspresyon farklarını karşılaştırmak için kullanılmaktadır. Ct değeri ise, genin ekspresyon seviyesinin bir göstergesidir; düşük Ct değerleri yüksek gen ekspresyonunu, yüksek Ct değerleri ise düşük gen ekspresyonu göstermektedir. Bu yöntemde, önce ΔCt ($\Delta Ct = \text{hedef genin Ct değeri} - \text{kontrol geninin Ct değeri}$) hesaplanır. Daha sonra $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = \text{örneğin } \Delta Ct \text{ değeri} - \text{kontrollerin ortalama } \Delta Ct \text{ değeri}$) hesaplanır ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüyle iki grup arasındaki kat değişimi (fold change) elde edilir.

Çalışma kapsamında veriler tanımlayıcı istatistiklerle özetlendi ve hedef RNA ekspresyon düzeyleri için ortalama değerler hesaplandı. Hasta verileri IBM SPSS Statistics 30.0 programı kullanılarak analiz edildi.

Tümörlü dokulardaki ve komşu sağlıklı dokulardaki kat değişim değerleri normal dağılıma uymadığı için non-parametrik yöntem olan Wilcoxon testi kullanılarak analizler yapıldı. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Hastaların demografik ve klinik parametreleri arasındaki ifade değişikliklerini gruplar halinde karşılaştırırken non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

lncRNA, miRNA ve mRNA ifadelerinin korelasyon analizi için non-parametrik bir test olan Spearman korelasyon testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubunun Özellikleri

Çalışmaya KRK tanısı ile takip edilen 50 hasta dahil edildi. Hastaların 17'si (%34) erkek ve 33'ü (%66) kadın cinsiyetteydi ve ortalama yaşları 64.8 (\pm 11,04) idi (en genç hasta 35 yaşında ve en yaşlı hasta 80 yaşındaydı).

Histopatolojik olarak hastaların 45'i (%90) adenokarsinom tipindeydi, diğer 5 hasta (%10) müsinöz adenokarsinom alt tipindeydi.

MSI durumuna göre hasta örneklerinin 41'i (%82) MSS, 6'sı (%12) MSI-H (yüksek instabilite) ve kalan 3'ü (%6) MSI-L (düşük instabilite) göstermekteydi.

Klinik evreye göre hastaların 8'i (%16) evre I, 16'sı (%32) evre II, 14'ü (%28) evre III ve 12'si (%24) uzak metastazı olan evre IV'tü.

Ayrıca tümör lokalizasyonu açısından bakıldığında 28'i (%56) sol/distal kolon, 17'si (%34) sağ/proksimal kolon ve 5'i (%10) rektum yerleşimliydi.

Çalışmaya alınan hastaların demografik, klinik ve patolojik verileri Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Çalışmaya alınan hastaların demografik, klinik ve patolojik verileri

No	Yaş	Cinsiyet	Tümör Yeri	Patolojik Tanı	TN*	Uzak Metastaz	Klinik Evre	MSI durumu
1	64	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T4aN2a	+	4	MSS
2	71	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T4bN0	-	2	MSI-H
3	42	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N2b	-	3	MSS
4	58	K	Sol Kolon	Müsinöz Adenokarsinom	T3N2b	-	3	MSS
5	79	K	Sol Kolon	Müsinöz Adenokarsinom	T4aN0	+	4	MSS
6	56	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
7	66	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N1c	-	3	MSS

Tablo 11. (Devamı)

8	61	K	Sol Kolon	Müsinöz Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
9	76	K	Sağ Kolon	Müsinöz Adenokarsinom	T4aN1	-	3	MSS
10	71	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
11	62	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
12	35	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
13	79	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
14	64	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T4bN2a	+	4	MSS
15	67	E	Rektum	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
16	80	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4aN1b	+	4	MSS
17	80	K	Rektum	Adenokarsinom	T2N0	-	1	MSS
18	61	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T2N0	-	1	MSI-L
19	66	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
20	75	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4aN1a	-	3	MSS
21	60	K	Rektum	Adenokarsinom	T2N0	-	1	MSS
22	66	E	Rektum	Adenokarsinom	T3N1c	-	3	MSS
23	70	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSI-L
24	64	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4aN0	+	4	MSS
25	67	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
26	80	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T2N0	-	1	MSS
27	80	K	Rektum	Adenokarsinom	T2N1	-	3	MSI-L
28	61	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N1	+	4	MSS
29	66	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4aN1a	-	3	MSI-H
30	75	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
31	60	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N1b	+	4	MSS
32	66	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T2N0	-	1	MSS
33	77	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N1a	-	3	MSS
34	65	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T1N0	-	1	MSS
35	65	K	Sol Kolon	Müsinöz Adenokarsinom	T4aN2b	+	4	MSS
36	74	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
37	80	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N1b	-	3	MSS
38	35	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4bN0	+	4	MSI-H
39	64	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4aN1c	-	3	MSS
40	58	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N1a	-	3	MSS
41	58	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T1N0	-	1	MSS

Tablo 11. (Devamı)

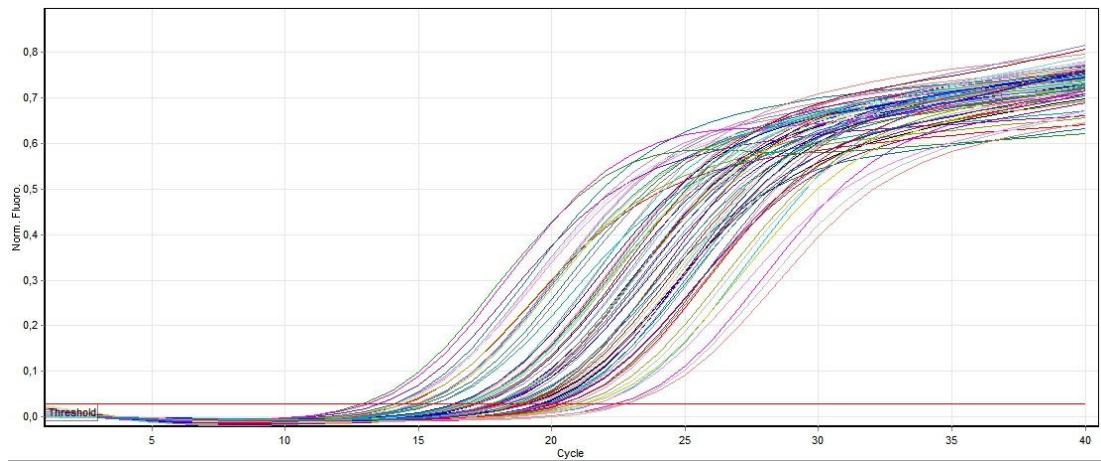
42	68	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSI-H
43	48	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N0	+	4	MSS
44	69	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N2b	+	4	MSS
45	51	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
46	64	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4N0	+	4	MSS
47	41	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4aN2b	-	3	MSI-H
48	62	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T2N0	-	1	MSI-H
49	71	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
50	64	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4aN1a	-	3	MSS

*Patolojik evreleme AJCC'nin 8. versiyonuna göre değerlendirilmiştir.

E: Erkek, K: Kadın, T: Tumor N: Lenf nodu, MSI: Mikrosatellit İnstabilitesi, MSS: Mikrosatellit Stabil, MSI-H: Yüksek Mikrosatellit İnstabilitesi, MSI-L: Düşük Mikrosatellit İnstabilitesi.

4.2. Ekspresyon Analizi Bulguları

Çalışmaya dahil edilen hastaların hem tümör dokularından hem de komşu sağlıklı doku örneklerinden lncRNA *SNHG22*, *miR-4492*, *FOXK1* ve normalizasyon için *GAPDH* ile *RNU6* genlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. lncRNA *SNHG22* ve *FOXK1* için *GAPDH*, *miR-4492* için ise *RNU6* housekeeping gen olarak kullanıldı. Şekil 16'da qPCR çalışmalarından birine ait amplifikasyon eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 16. Bir çalışmaya ait örnek qPCR amplifikasyon eğrileri

qPCR çalışmaları sonucunda tümör dokularından ve komşu sağlıklı dokulardan elde edilen Ct değerleri Tablo 12 ve Tablo 13'te gösterildi.

Tablo 12. Tümörlü (T) dokulardan elde edilen Ct değerleri

Örnek	IncRNA <i>SNHG22</i>	<i>miR-4492</i>	<i>FOXK1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>RNU6</i>
T1	19,50	21,04	26,44	20,88	15,33
T2	24,31	20,56	26,91	23,57	18,10
T3	20,21	22,67	26,36	21,62	15,05
T4	23,04	20,70	26,64	23,37	16,75
T5	28,64	21,71	26,85	28,73	22,51
T6	29,52	19,22	27,05	24,54	21,68
T7	25,58	22,09	26,76	25,92	19,28
T8	24,36	24,25	26,84	24,70	17,32
T9	20,43	23,67	25,85	20,18	14,13
T10	27,66	20,13	27,46	22,63	19,02
T11	19,85	22,38	26,43	19,75	14,49
T12	24,23	23,47	27,23	23,39	18,50
T13	25,46	20,60	31,79	22,04	17,96
T14	20,23	17,96	26,85	16,04	13,59
T15	20,77	22,24	26,33	20,44	14,31
T16	25,96	23,10	27,25	21,03	18,38
T17	25,04	22,56	27,13	20,83	17,78
T18	24,97	21,40	27,19	24,16	18,87
T19	25,19	21,20	27,27	23,45	18,97
T20	26,18	24,72	27,34	27,90	19,95
T21	22,61	22,67	26,84	23,26	16,57
T22	18,42	19,46	24,68	18,75	13,17
T23	23,22	21,85	27,07	20,27	16,50
T24	22,82	21,57	26,97	21,14	17,02
T25	23,80	19,18	27,01	22,61	17,89
T26	25,20	21,56	28,90	23,94	18,38
T27	22,99	22,77	28,60	22,56	17,13
T28	27,10	22,11	29,45	24,25	20,97
T29	27,76	19,88	29,29	23,25	19,81
T30	26,93	22,43	29,45	23,30	20,12
T31	24,93	22,31	28,84	24,69	19,33
T32	26,29	19,89	28,90	26,52	19,96
T33	28,20	19,53	29,44	23,48	20,49
T34	31,10	19,45	33,69	24,72	21,40
T35	25,94	22,48	31,75	25,59	19,20
T36	26,14	22,31	32,93	23,11	17,93
T37	26,46	24,19	32,12	27,88	22,82

Tablo 12. (Devamı)

T38	23,90	23,76	29,50	25,76	17,59
T39	25,62	22,77	31,70	26,77	18,87
T40	25,31	21,40	32,49	23,00	17,90
T41	27,35	22,02	33,41	22,95	19,43
T42	25,74	20,38	31,80	20,25	16,71
T43	24,45	21,09	31,79	19,51	16,56
T44	25,38	21,19	32,25	18,50	15,58
T45	23,95	18,65	30,75	19,31	16,02
T46	25,24	21,18	32,15	20,47	16,70
T47	29,77	19,58	33,54	20,69	17,63
T48	29,54	20,96	34,15	24,59	20,29
T49	31,68	17,84	34,06	24,55	20,74
T50	26,75	20,66	32,51	20,58	16,43

Tablo 13. Komşu sağlıklı (S) dokulardan elde edilen Ct değerleri

Örnek	lncRNA <i>SNHG22</i>	miR-4492	<i>FOXK1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>RNU6</i>
S1	17,85	20,23	26,10	19,52	15,23
S2	22,21	24,21	26,77	24,58	17,75
S3	19,01	21,05	26,45	19,42	14,19
S4	19,73	22,42	26,42	21,73	15,33
S5	23,18	22,28	26,65	23,54	17,86
S6	25,68	24,53	26,84	25,51	19,67
S7	25,47	24,78	26,76	25,31	19,08
S8	23,06	24,69	26,65	20,13	16,65
S9	21,14	23,77	25,70	19,88	14,98
S10	22,50	24,32	26,97	22,04	14,96
S11	23,00	24,32	27,07	23,76	16,80
S12	22,70	24,61	26,68	21,70	15,56
S13	25,14	19,47	30,17	24,82	18,10
S14	22,63	24,32	26,78	21,38	17,32
S15	24,43	24,19	27,28	21,81	16,85
S16	28,84	21,87	27,19	27,11	22,79
S17	24,23	23,32	27,12	25,94	19,04
S18	24,62	22,57	27,47	24,35	18,00
S19	26,38	23,60	27,17	23,31	19,71
S20	26,43	24,46	27,22	27,86	20,76

Tablo 13. (Devamı)

S21	18,69	19,87	24,72	20,01	14,10
S22	18,28	19,83	24,32	17,83	12,97
S23	25,29	20,45	27,02	24,64	19,15
S24	23,53	17,87	27,25	21,82	17,76
S25	22,94	20,30	26,95	22,54	16,96
S26	24,51	17,73	28,67	24,30	17,31
S27	24,50	23,89	29,57	24,91	19,34
S28	26,31	20,38	29,20	27,15	20,47
S29	26,12	23,36	29,08	26,52	16,82
S30	23,89	21,95	28,63	20,57	16,35
S31	25,63	23,14	29,01	26,58	20,00
S32	28,74	23,56	29,31	24,09	21,32
S33	22,29	22,60	27,29	20,77	15,63
S34	27,53	22,04	33,53	24,94	20,41
S35	25,89	22,75	31,72	24,00	17,93
S36	27,55	23,18	33,09	27,39	21,67
S37	28,19	22,36	33,44	21,47	18,71
S38	24,08	24,27	29,78	26,99	17,44
S39	25,68	25,36	30,87	27,65	19,11
S40	25,14	21,28	30,96	24,31	18,32
S41	26,29	21,73	33,24	22,41	18,39
S42	25,98	21,72	32,61	23,17	18,39
S43	24,78	21,06	31,07	21,32	15,11
S44	24,77	23,99	30,12	26,63	19,82
S45	22,62	23,19	28,60	22,44	17,85
S46	26,20	21,62	30,27	22,75	18,87
S47	26,71	21,12	33,31	23,72	19,83
S48	23,80	22,59	30,31	19,61	16,63
S49	25,22	19,93	31,30	24,68	18,55
S50	27,69	19,06	32,51	28,19	20,71

4.3. Ekspresyon Değerlerinin Karşılaştırılması

Livak yöntemi ile lncRNA *SNHG22*, *miR-4492* ve *FOXK1* ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. Hasta verilerinden elde edilen ortalama ΔCt ve ortalama kat

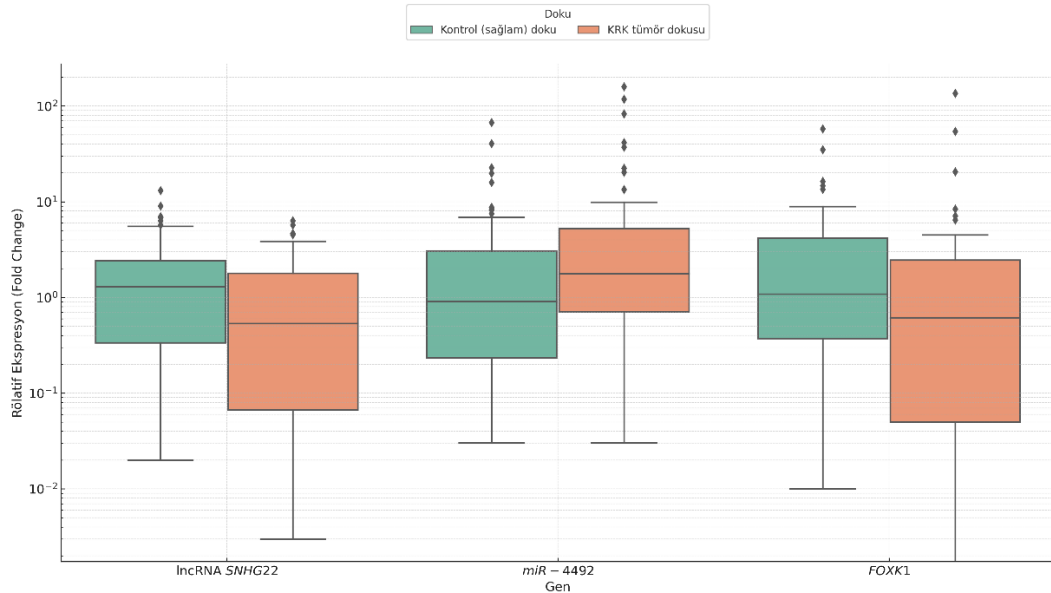
değişimi (fold change) değerleri Tablo 14’te gösterilmiştir. $p < 0.05$ olan ölçümler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 14. lncRNA *SNHG22*, *miR-4492* ve *FOXK1* RNA'larının ortalama ΔCt ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

	Ortalama ΔCt		Ortalama Fold Change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			
	Sağlıklı (kontrol) doku	Tümör dokusu	Sağlıklı (kontrol) doku	Tümör dokusu	Rölatif Değişim*	<i>p</i> değeri
lncRNA <i>SNHG22</i>	0,80	2,29	1,44	1,23	0,36	0,0021
<i>miR-4492</i>	4,41	3,39	1,84	11,81	2,03	<i>0,1236</i>
<i>FOXK1</i>	5,20	6,33	2,46	5,50	0,46	<i>0,1038</i>

* Rölatif Değişim (fold change) hesaplarken geometrik ortalama kullanılmıştır.

Tümörlü dokulardaki ve komşu sağlıklı dokulardaki kat değişim farkları karşılaştırıldı. Kat değişim değerleri normal dağılıma uymadığı için non-parametrik yöntem olan Wilcoxon testi kullanılarak analizler yapıldı. lncRNA *SNHG22*'nin kat değişim farklılığı istatistiki olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$) ancak *miR-4492* ve *FOXK1*'in kat değişim farklılığı istatistiki olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).



Şekil 17. KRC’li tümör dokularında ve komşu sağlıklı dokularda lncRNA *SNHG22*, *miR-4492* ve *FOXK1* ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması. Rölatif kat değişimleri geometrik ortalama ile hesaplanmıştır.

4.3.1. lncRNA *SNHG22* Ekspresyonu

KRK'li tümör dokularında eşleştirilmiş sağlam dokulara kıyasla lncRNA *SNHG22* ekspresyonunda **0,36** kat azalma görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,0021$) (Tablo 14, Şekil 17). lncRNA *SNHG22* ekspresyonu hastaların 37'sinde (%74) düşük, 13'ünde (%26) ise yüksekti. lncRNA *SNHG22* ekspresyon seviyeleri hastaların yaş, cinsiyet, patolojik tanı, klinik evre, T-evresi, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, MSI durumu ve tümör yerleşimi gibi parametrelerle değerlendirildi (Tablo 15).

Tablo 15. lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun hastaların klinik parametreleri ile ilişkisi

Parametreler		n=50	lncRNA <i>SNHG22</i>		p-değeri
			Düşük	Yüksek	
Cinsiyet	Kadın	33	25	8	0,539
	Erkek	17	12	5	
Yaş	<65.5	25	20	5	0,907
	>65.5	25	17	8	
Patolojik tanı	Adenokarsinom	45	35	10	0,029
	Müsinöz tip	5	2	3	
Klinik evre	Erken (I-II)	24	19	5	0,831
	İleri (III-IV)	26	18	8	
T-evresi	T1-2	9	8	1	0,658
	T3-4	41	29	12	
Uzak metastaz	Var	12	10	2	0,742
	Yok	38	27	11	
LN metastazı	Var	21	14	7	0,898
	Yok	29	23	6	
MSI durumu	MSS	41	28	13	0,193
	MSI (L/H)	9	9	0	
Tümör yerleşimi	Kolon	45	34	11	0,400
	Rektum	5	3	2	

LN: Lenf nodu, MSI: Mikrosatellit İnstabilitesi, MSS: Mikrosatellit Stabil, MSI-H: Yüksek Mikrosatellit İnstabilitesi, MSI-L: Düşük Mikrosatellit İnstabilitesi.

Cinsiyete göre bakılırsa lncRNA *SNHG22*'nin düşük ekspresyonu hem erkeklerde hem de kadınlarda daha yaygındı. Ancak iki cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,539$). Hasta yaşları ortanca değere (65.5) göre iki gruba ayrıldığında her iki yaş grubunda da düşük lncRNA *SNHG22* ekspresyonun daha yaygın olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,907$).

Tüm hastalar patolojik olarak adenokarsinom tipindeydi, ancak beş hasta müsinöz adenokarsinom alt tipindeydi. Patolojik tanı açısından anlamlı bir farklılık olup olmadığını test etmek için, hastalar adenokarsinom ve müsinöz adenokarsinom olarak iki gruba ayrıldı. Adenokarsinomlu hastalarda lncRNA *SNHG22*'nin düşük ekspresyonu yaygınken, müsinöz alt tipindeki hastalarda yüksek ekspresyon daha çoktu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,029$).

TNM evrelemesine göre değerlendirme yapıldı. T-evresine göre T1-2 ve T3-4 şeklinde iki grup değerlendirildiğinde de her iki grupta da lncRNA *SNHG22*'nin düşük ekspresyonu yaygındı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,658$). Aynı şekilde LN metastazı ve uzak metastaz varlığına/yokluğuna göre değerlendirildiğinde her iki parametrede de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla $p=0,898$, $p=0,742$) ve lncRNA *SNHG22*'nin düşük ekspresyonu yaygındı. Klinik evreye göre de hastalar erken evre (I-II) ve ileri evre (III-IV) olarak değerlendirildiğinde her iki grupta da lncRNA *SNHG22*'nin düşük ekspresyonu yaygındı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,831$).

MSI durumuna göre hastalar değerlendirildiğinde MSS hasta grubunda lncRNA *SNHG22*'nin düşük ekspresyonu yaygındı, MSI (L/H) grupta ise tüm hastalarda düşük ekspresyon vardı, ancak iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,193$).

Son olarak tümör yerleşimine göre değerlendirildiğinde hem kolon hem de rektum kanserlerinde lncRNA *SNHG22*'nin düşük ekspresyonu yaygındı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,400$).

4.3.2. miR-4492 Ekspresyonu

KRK'li tümör dokularında eşleştirilmiş sağlam dokulara kıyasla *miR-4492* ekspresyonunda **2,03** kat artış görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,1236$) (Tablo 14, Şekil 17). *miR-4492* ekspresyonu hastaların 28'inde (%56) yüksek, 22'sinde (%44) ise düşüktü. *miR-4492* ekspresyon seviyeleri hastaların yaş, cinsiyet, patolojik tanı, klinik evre, T-evresi, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, MSI durumu ve tümör yerleşimi gibi parametrelerle değerlendirildi (Tablo 16).

Tablo 16. *miR-4492* ekspresyonunun hastaların klinik parametreleri ile ilişkisi

Parametreler		n=50	<i>miR-4492</i>		<i>p-değeri</i>
			Düşük	Yüksek	
Cinsiyet	Kadın	33	12	21	0,239
	Erkek	17	10	7	
Yaş	<65.5	25	10	15	0,961
	>65.5	25	12	13	
Patolojik tanı	Adenokarsinom	45	21	24	0,400
	Müsinöz tip	5	1	4	
Klinik evre	Erken (I-II)	24	9	15	0,111
	İleri (III-IV)	26	13	13	
T-evresi	T1-2	9	4	5	0,870
	T3-4	41	18	23	
Uzak metastaz	Var	12	6	6	0,086
	Yok	38	16	22	
LN metastazı	Var	21	11	10	0,219
	Yok	29	11	18	
MSI durumu	MSS	41	18	23	0,733
	MSI (L/H)	9	4	5	
Tümör yerleşimi	Kolon	45	18	27	0,265
	Rektum	5	4	1	

LN: Lenf nodu, MSI: Mikrosatellit İnstabilitesi, MSS: Mikrosatellit Stabil, MSI-H: Yüksek Mikrosatellit İnstabilitesi, MSI-L: Düşük Mikrosatellit İnstabilitesi.

Cinsiyete göre bakıldığında kadınlarda *miR-4492*'nin yüksek ekspresyonu yaygınken, erkeklerde düşük ekspresyon yüksek ekspresyondan daha fazlaydı. Ancak

iki cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,239$). Hasta yaşları ortanca değere (65.5) göre iki gruba ayrıldığında her iki yaş grubunda da yüksek *miR-4492* ekspresyonunun daha yaygın olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,961$).

Patolojik tanı açısından hem adenokarsinomlu hastalarda hem de müsinöz alt tipteki hastalarda *miR-4492*'nin yüksek ekspresyonu daha çoktu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,400$).

TNM evrelemesine göre değerlendirme yapıldı. T-evresine göre T1-2 ve T3-4 şeklinde iki grup değerlendirildiğinde de her iki grupta da *miR-4492*'nin yüksek ekspresyonu yaygındı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,870$). LN metastazı olan grupta *miR-4492*'nin düşük ekspresyonu daha çok iken, LN metastazı olmayan grupta yüksek ekspresyon daha yaygındı, ancak bu ilişki anlamlı değildi ($p=0,219$). Aynı şekilde uzak metastazı olan grupta yüksek ve düşük ekspresyon eşit sayıda iken, uzak metastazı olmayan grupta yüksek ekspresyon daha yaygındı, ancak yine bu ilişki anlamlı değildi ($p=0,086$). Klinik evreye göre de hastalar değerlendirildiğinde erken evre hastalarda *miR-4492*'nin yüksek ekspresyonu yaygınken, ileri evre hastalarda yüksek ve düşük ekspresyon eşit sayıda görüldü, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,111$).

MSI durumuna göre hastalar değerlendirildiğinde hem MSS hasta grubunda hem de MSI (L/H) hasta grubunda *miR-4492*'nin yüksek ekspresyonu yaygındı ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,733$).

Son olarak tümör yerleşimine göre değerlendirildiğinde kolon kanserlerinde *miR-4492*'nin yüksek ekspresyonu yaygın iken rektum kanserlerinde düşük ekspresyon daha yaygın bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,265$).

4.3.3. FOXK1 Ekspresyonu

KRK'li tümör dokularında eşleştirilmiş sağlam dokulara kıyasla FOXK1 ekspresyonunda **0,46** kat azalma görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,1038$) (Tablo 14, Şekil 17). FOXK1 ekspresyonu hastaların 29'unda (%58) düşük, 21'inde (%42) ise yüksekti. FOXK1 ekspresyon seviyeleri hastaların yaş, cinsiyet, patolojik tanı, klinik evre, T-evresi, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, MSI durumu ve tümör yerleşimi gibi parametrelerle değerlendirildi (Tablo 17).

Tablo 17. FOXK1 ekspresyonunun hastaların klinik parametreleri ile ilişkisi

Parametreler		n=50	FOXK1		p-değeri
			Düşük	Yüksek	
Cinsiyet	Kadın	33	16	17	0,143
	Erkek	17	13	4	
Yaş	<65.5	25	15	10	0,907
	>65.5	25	14	11	
Patolojik tanı	Adenokarsinom	45	29	16	0,030
	Müsinöz tip	5	0	5	
Klinik evre	Erken (I-II)	24	13	11	0,741
	İleri (III-IV)	26	16	10	
T-evresi	T1-2	9	4	5	0,240
	T3-4	41	25	16	
Uzak metastaz	Var	12	9	3	0,203
	Yok	38	20	18	
LN metastazı	Var	21	12	9	0,753
	Yok	29	17	12	
MSI durumu	MSS	41	22	19	0,331
	MSI (L/H)	9	7	2	
Tümör yerleşimi	Kolon	45	26	19	0,948
	Rektum	5	3	2	

LN: Lenf nodu, MSI: Mikrosatellit İnstabilitesi, MSS: Mikrosatellit Stabil, MSI-H: Yüksek Mikrosatellit İnstabilitesi, MSI-L: Düşük Mikrosatellit İnstabilitesi.

Cinsiyete göre bakıldığında kadınlarda FOXK1'in yüksek ekspresyonu düşük ekspresyondan fazla iken, erkeklerde düşük ekspresyon daha yaygındı. Ancak iki

cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,143$). Hasta yaşları ortanca değere (65.5) göre iki gruba ayrıldığında her iki yaş grubunda da düşük *FOXK1* ekspresyonunun daha yaygın olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,907$).

Patolojik tanı açısından adenokarsinomlu hastalarda *FOXK1*'in düşük ekspresyonu yaygınken, müsinöz alt tipindeki tüm hastalarda yüksek ekspresyon vardı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,03$).

TNM evrelemesine göre değerlendirme yapıldı. T-evresine göre T1-2 grubunda yüksek *FOXK1* ekspresyonu daha fazla iken, T3-4 grubunda düşük ekspresyon daha yaygındı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,240$). Aynı şekilde LN metastazı ve uzak metastaz varlığına/yokluğuna göre değerlendirildiğinde her iki parametrede de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla $p=0,753$, $p=0,203$) ve *FOXK1*'in düşük ekspresyonu yaygındı. Klinik evreye göre de hastalar değerlendirildiğinde her iki grupta da *FOXK1*'in düşük ekspresyonu yaygındı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,741$).

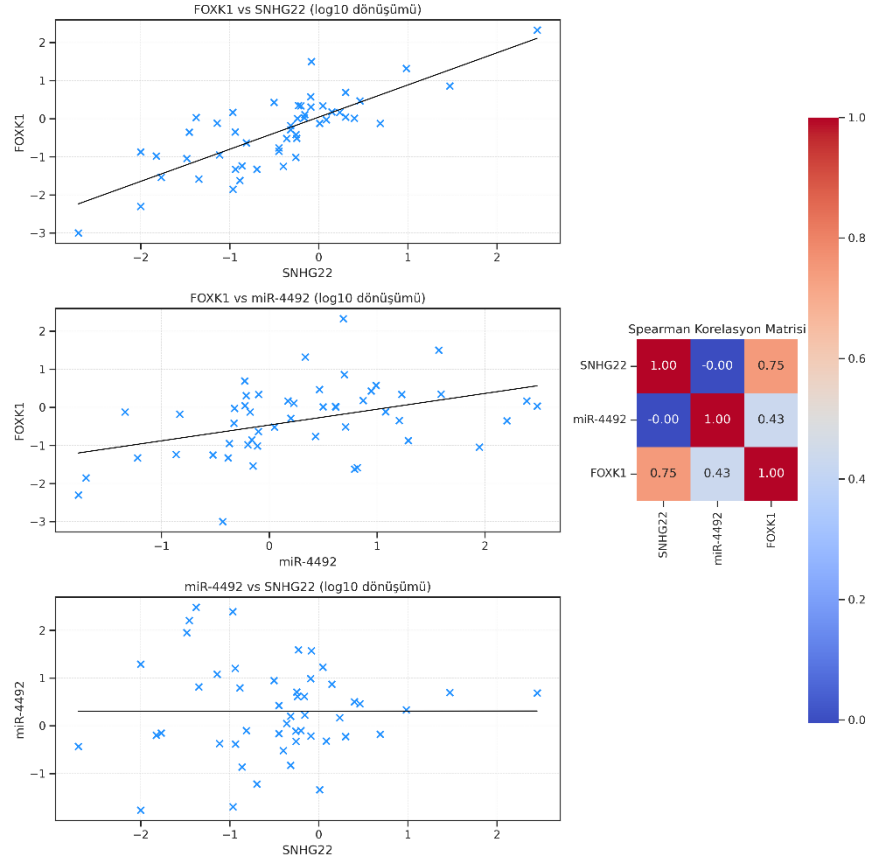
MSI durumuna göre hastalar değerlendirildiğinde hem MSS hasta grubunda hem de MSI (L/H) hasta grubunda *FOXK1*'in düşük ekspresyonu yaygındı ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,331$).

Son olarak tümör yerleşimine göre değerlendirildiğinde hem kolon hem de rektum kanserlerinde *FOXK1*'in düşük ekspresyonu yaygındı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,948$).

4.4. Korelasyon Analizi

lncRNA *SNHG22*, *miR-4492* ve *FOXK1* genleri arasında olası etkileşimler hakkında öngöründe bulunmak için korelasyon analizi gerçekleştirildi. lncRNA *SNHG22* ve *FOXK1* arasında güçlü bir pozitif ilişki saptandı ve istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu [$p=4,70 \times 10^{-10}$, korelasyon katsayısı(r)= $0,747$]. lncRNA *SNHG22* ve *miR-4492* arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmedi ($p=0,973$, $r=-0,005$). *miR-4492*

ve *FOXK1* arasında ise orta düzeyde pozitif bir ilişki saptandı ($p=0,0017$, $r=0,432$). Şekil 18’de bu korelasyonlar grafiklerle gösterilmiştir.



Şekil 18. lncRNA *SNHG22*, *miR-4492* ve *FOXK1* arasındaki korelasyon analizleri ve Spearman korelasyon matrisi

5. TARTIŞMA

KRK, dünya genelinde hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık rastlanan maligniteler arasında yer almakta olup, kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir (1,2). Son yıllarda tedavi stratejilerinde önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, KRK'ye bağlı mortalite oranları halen yüksek seyretmektedir. Özellikle geç evrede tanı alan hastalar, günümüzde hâlâ önemli bir sorun teşkil etmektedir; ileri evrelerde hastalığın seyri kötü olmakta ve mortalite oranları belirgin şekilde artmaktadır. Bu bağlamda, KRK'nin başlangıcında ve ilerleyişinde etkili olan potansiyel moleküler mekanizmaların daha kapsamlı bir şekilde araştırılması, yeni prognostik belirteçlerin ve terapötik yaklaşımların geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, ncRNA'ların kanser süreçlerinde önemli roller üstlendiğini ortaya koymuştur (97,98). Özellikle lncRNA'lar ve miRNA'lar, hücrel süreçlerin düzenlenmesinde kritik işlevlere sahiptir. lncRNA'lar, miRNA'lara bağlanarak onların hedef mRNA'ları baskılamasını engelleyebilir ve böylece ceRNA ağları oluşturabilirler (105,106). Bu moleküler etkileşimler, kanser hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu ve metastazı gibi süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinde bu karmaşık etkileşimlerin anlaşılması, yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasına ve yenilikçi tedavi stratejilerinin geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır.

lncRNA'lar, protein kodlamalarına rağmen, gen ekspresyonunun transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeyde düzenlenmesinde kritik roller üstlenmektedirler (99,103). Karsinogenez süreçlerinde, onkojenik veya tümör baskılayıcı etki gösterebilirler (107). lncRNA'ların farklı dokularda ve farklı koşullarda sergiledikleri özgün ekspresyon paternleri, kanserde potansiyel biyobelirteç ve terapötik hedefler olarak öne çıkmalarını sağlamaktadır.

lncRNA'lardan birisi olan lncRNA *SNHG22*, son yıllarda çeşitli kanser türlerinde potansiyel bir tedavi hedefi ve prognostik biyobelirteç olarak dikkat çekmiştir. Yapılan çalışmalar over kanseri, gastrik kanser, özefagus karsinomu, hepatoselüler karsinom, meme kanseri, renal hücreli karsinom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve kolorektal kanser gibi malignitelerde lncRNA *SNHG22*'nin işlevsel

roller üstlendiğini ortaya koymuştur. lncRNA *SNHG22*'nin, diğer lncRNA'lar gibi, kanser hücrelerinde belirli miRNA'ları süngerleyerek hedef genlerin ekspresyonunu artırdığı ve böylece hücre proliferasyonu, apoptoz, migrasyon ve metastaz gibi kanser süreçlerinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (3–13).

Bildiğimiz kadarıyla lncRNA *SNHG22*'nin kanserle ilişkili ilk çalışmaları, epitelyal over kanseri üzerine gerçekleştirilmiştir. Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, epitelyal over kanseri hücre hatlarında ve hasta dokularında lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun tümör hücrelerinde anlamlı düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, yüksek lncRNA *SNHG22* düzeylerinin kemoterapi direnci ve kötü prognoz ile ilişkilendirildiği rapor edilmiştir. Çalışmada, lncRNA *SNHG22*'nin *miR-2467*'yi hedef alarak *Gal-1* ekspresyonunu düzenlediği ve bu mekanizma üzerinden ceRNA işlevi gösterdiği ortaya konulmuştur (8). Bu çalışmayla lncRNA *SNHG22*'nin kanserde onkojenik rol aldığı ilk kez gösterilmiştir. Guan ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada da epitelyal over kanseri hücre hatlarında ve hasta dokularında lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun tümör hücrelerinde belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, *SPI* transkripsiyon faktörünün lncRNA *SNHG22*'nin promotör bölgesine bağlanarak bu lncRNA'nın ekspresyonunu artırdığını ortaya koymuşlardır. Çalışmada, lncRNA *SNHG22*'nin aşırı ekspresyonunun hücrelerde glukoz alımı, laktat üretimi ve ATP seviyelerini yükselterek glikolizi ve hücre proliferasyonunu teşvik ettiği ve böylece tümör gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (7).

Yang ve arkadaşlarının berrak hücreli renal hücreli karsinom (ccRCC) hastaları üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun tümör dokularında anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, yüksek lncRNA *SNHG22* ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkili bulunmuş ve bu lncRNA'nın prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (13).

Fang ve arkadaşlarının triple negatif meme kanserinde (TNBC) yürüttükleri çalışmada, lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun hem hasta dokularında hem de hücre hatlarında anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada, lncRNA *SNHG22*'nin *miR-324-3p*'yi süngerleyerek *SUDS3* ekspresyonunu artırdığı ve bu mekanizma

aracılığıyla tümör hücrelerinin proliferasyon ve göç yeteneklerini güçlendirdiği ortaya konmuştur. İlginç bir şekilde, hormon reseptörü pozitif veya HER2 pozitif meme kanseri hücre hatlarında lncRNA *SNHG22* ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik tespit edilmediği rapor edilmiş. Bu bağlamda, lncRNA *SNHG22*'nin özellikle TNBC'de önemli bir biyolojik rol oynayabileceğini ve potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini belirtmişlerdir (11).

Zheng ve arkadaşlarının osteosarkom hücre hatları üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada, lncRNA *SNHG22*'nin ekspresyon düzeylerinin osteosarkomda belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada lncRNA *SNHG22*'nin, *miR-4492*'yi süngerleyerek *NKIRAS2*'nin transkripsiyonel aktivitesini desteklediği ve bu mekanizma üzerinden rol aldığı gösterilmiştir. Ayrıca, lncRNA *SNHG22*'nin hücre döngüsünde G1 fazında duraksamaya yol açarak hücre proliferasyonunu baskıladığı; VEGF düzeylerini azaltarak anjiyogenezi engellediği, hücre göçü ve invazyonunu azalttığı ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) süreçlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Öte yandan, lncRNA *SNHG22*'nin susturulması durumunda bu etkilerin tersine döndüğü ve tümör ilerlemesini destekleyici bir hücresel yanıt geliştiği gözlemlenmiştir. Tüm bu bulgular, lncRNA *SNHG22*'nin osteosarkomda potansiyel bir tümör baskılayıcı molekül olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir (15).

Li ve arkadaşları lncRNA *SNHG22*'yi yassı hücreli özefagus kansinomunda (ESCC) incelemişlerdir. Hücre hatlarında yapılan bu çalışmada lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun tümörlü hücre hatlarında belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir. Araştırmada lncRNA *SNHG22*'nin, *miR-429*'u süngerleyerek *SES3*'ün ekspresyonunu artırdığı ve bu mekanizma aracılığıyla tümör hücrelerinin proliferasyon, invazyon ve göç yeteneklerini desteklediği belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları, lncRNA *SNHG22*'nin ESCC'de onkogenik bir rol oynadığını ve tümör ilerlemesinde önemli bir katkı sağladığını ortaya koymuştur (10).

Zhang ve arkadaşları lncRNA *SNHG22*'nin hepatoselüler kanserdeki (HCC) rolünü incelemişlerdir. Hasta dokuları ve hücre hatlarında yapılan çalışmada, lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun tümör hücrelerinde belirgin şekilde arttığını ve yüksek lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmada, lncRNA *SNHG22*'nin susturulmasının hücre proliferasyonu, göçü, invazyonu ve in vitro ortamda anjiyogenezi baskıladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, lncRNA *SNHG22*'nin *EZH2* aracılığıyla *DNMT1*'i *miR-16-5p* geninin promotör bölgesine çekerek, *miR-16-5p*'in transkripsiyonunu DNA metilasyonu yoluyla inhibe ettiğini ve bu mekanizma ile HCC'de tümorogenezi ve anjiogenezi kolaylaştırdığını ortaya koymuşlardır (5).

Yakın zamanda Cheng ve arkadaşlarının küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada, hasta serumlarında lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı şekilde arttığı ve bu artışın kötü prognozla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada ayrıca, *miR-128-3p* seviyesinin lncRNA *SNHG22* tarafından baskılandığı ve bu iki molekül arasındaki ilişkinin tümör gelişimiyle bağlantılı olduğu ortaya konmuştur. lncRNA *SNHG22*'nin up-regülasyonu, lenf nodu metastazı, TNM evresi ve hastaların genel prognozu ile yakından ilişkili bulunmuştur. Bu bulgular, serum lncRNA *SNHG22* düzeylerinin NSCLC hastalarında prognostik bir belirteç olarak önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (4).

Gastrik kanserde (GC) lncRNA *SNHG22*'nin rolü üç ayrı çalışmada araştırılmıştır. Cui ve arkadaşlarının çalışmasında hem hasta dokularında hem de hücre hatlarında lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. Araştırmaya göre lncRNA *SNHG22*, *miR-361-3p*'yi süngerleyerek *HMGAI* ekspresyonunu artırmakta ve bu durum *Wnt/β-catenin* sinyal yolunun aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca lncRNA *SNHG22*'nin baskılanması, tümör hücrelerinde proliferasyon, migrasyon, invazyon ve anjiyogenezi azaltmıştır (12). Mao ve arkadaşlarının çalışmasında da hem hasta dokularında hem de hücre hatlarında lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı ve bu artışın kötü prognozla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmada, transkripsiyon faktörü *ELK4*'ün lncRNA *SNHG22*'nin promotör bölgesine bağlanarak ekspresyonunu artırdığı ortaya konmuştur. Ayrıca, lncRNA *SNHG22*'nin *EZH2* ile doğrudan etkileşim kurarak tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, lncRNA *SNHG22*'nin *miR-200c-3p*'yi süngerleyerek *Notch1* ekspresyonunu artırdığı ve bu mekanizma üzerinden tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyon

kapasitesini güçlendirdiği gösterilmiştir (6). Li ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da GC hasta dokuları ve hücre hatlarında lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı ve bu artışın kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmada, lncRNA *SNHG22*'nin *miR-101-3p*'yi süngerleyerek bu miRNA'nın hedefi olan *E2F2* geninin ekspresyonunu dolaylı olarak artırdığı belirlenmiştir. Bu mekanizma üzerinden lncRNA *SNHG22*, GC hücrelerinde proliferasyonu ve invazyonu desteklemektedir, buna karşın lncRNA *SNHG22*'nin susturulması bu onkojenik özelliklerin azalmasına yol açmaktadır (3). Bu çalışmalardan elde edilen veriler, lncRNA *SNHG22*'nin GC ilerleyişinde kritik bir rol oynadığını ve potansiyel bir prognostik biyobelirteç veya terapötik hedef olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

KRK'de lncRNA *SNHG22*'nin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada KRK hasta dokuları ve hücre hatlarında lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiş ve bu artış kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Araştırmada, lncRNA *SNHG22*'nin *miR-128-3p*'yi süngerleyerek *E2F3* ekspresyonunu artırdığı, böylece tümör oluşumu ve metastaz süreçlerini desteklediği ortaya konmuştur. Ayrıca in-vivo modellerde lncRNA *SNHG22*'nin baskılanması, tümör büyümesini anlamlı şekilde yavaşlatmıştır. Bu bulgular, lncRNA *SNHG22*'nin KRK'de önemli bir onkojenik rol üstlendiğini ve gelecekte potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir (9).

Sonuç olarak, mevcut literatür verileri lncRNA *SNHG22*'nin birçok solid tümörde genellikle onkojenik bir rol üstlendiğini göstermektedir. Bununla birlikte, yalnızca osteosarkom üzerine yapılan bir çalışmada lncRNA *SNHG22*'nin tümör baskılayıcı özellikler sergilediği bildirilmiştir (15). lncRNA *SNHG22*'nin, çeşitli miRNA'ları "süngerleyerek" bir ceRNA gibi işlev gördüğü ve bu mekanizma aracılığıyla hücre proliferasyonu, invazyon, metastaz ve anjiyogenez gibi tümör ilerlemesiyle ilişkili biyolojik süreçlere katkı sağladığı ortaya konmuştur. Klinik düzeyde, artmış lncRNA *SNHG22* ekspresyonu genellikle kötü prognoz, ileri evre hastalık ve metastatik yayılım ile ilişkilendirilmiştir. Bu kapsamda lncRNA *SNHG22* hem prognostik bir biyobelirteç hem de kanser tedavisi için potansiyel bir hedef olarak dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda, KRK dokularında lncRNA *SNHG22* ekspresyon düzeylerinin sağlıklı kontrol dokularına kıyasla anlamlı şekilde düşük olduğu saptanmıştır ($p=0,0021$). Bu bulgu, lncRNA *SNHG22*'nin KRK'de down-regülasyona uğradığını ve potansiyel olarak tümör baskılayıcı bir rol üstlenebileceğini düşündürmektedir. Elde edilen sonuçlar, osteosarkom üzerine yapılmış ve lncRNA *SNHG22*'nin tümör baskılayıcı etkilerini ortaya koyan literatür bulgularıyla uyumluluk göstermektedir. Söz konusu çalışmada, lncRNA *SNHG22*'nin G1 fazında hücre döngüsünü duraksatarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, VEGF düzeylerini düşürerek anjiyogenezi engellediği, hücre göçü ve invazyonunu azalttığı, ayrıca epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) süreçlerini inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu anti-tümöral etkiler, çalışmamızda elde edilen bulguları desteklemektedir (15). Bununla birlikte, literatürde farklı kanser türlerinde lncRNA *SNHG22*'nin onkojenik etkilerine dair bulguların da yer alması, lncRNA'ların biyolojik rollerinin kanserin geliştiği dokuya ve tümör tipine özgü olarak değişebileceğini ortaya koymaktadır. Nitekim, Fang ve arkadaşlarının çalışmasında da görüldüğü üzere, TNBC dokularında lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun artış göstermesi, ancak hormon reseptörü pozitif ya da HER2 pozitif meme kanseri hücre hatlarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemesi de bu durumu destekler niteliktedir (11). Bu durum, lncRNA *SNHG22*'nin bazı kanser türlerinde tümör baskılayıcı, bazı kanser türlerinde ise onkojenik etkiler gösterebileceği, yani çift yönlü (dual) fonksiyonlara sahip olabileceği olasılığını ortaya çıkarmaktadır. Bu bağlamda, lncRNA *SNHG22*'nin KRK patogenezindeki rolünü ve ilişkili moleküler mekanizmaları daha net ortaya koymak amacıyla, geniş örneklem gruplarıyla desteklenmiş, fonksiyonel ve translasyonel düzeyde kapsamlı ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda, KRK'li hastalarda lncRNA *SNHG22* ekspresyon düzeyleri ile çeşitli klinik ve patolojik parametreler arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, lncRNA *SNHG22* ekspresyon düzeylerinin klinik değişkenlerle anlamlı bir ilişki göstermediği görülse de bazı parametrelerde gözlemlenen eğilimler biyolojik olarak dikkat çekicidir ve daha ileri araştırmaları gerektirmektedir. En dikkat çeken bulgu, histopatolojik alt tip ile lncRNA *SNHG22* ekspresyonu arasındaki anlamlı ilişkidir ($p=0,029$). Adenokarsinom tipinde lncRNA *SNHG22* ekspresyon düzeyleri çoğunlukla düşük

seviyede izlenirken, müsinöz karsinom alt tipinde yüksek ekspresyon oranlarının daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum, lncRNA *SNHG22*'nin tümör histolojisine özgü farklı biyolojik roller üstlenebileceğini ve özellikle müsinöz tümörlerde potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Ancak müsinöz alt tipteki örnek sayısının görece düşük olması nedeniyle bu sonucun dikkatle değerlendirilmesi gerekmektedir. Hastaların cinsiyeti, yaşı, klinik evresi, T-evresi, uzak metastaz, LN metastazı ve MSI durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Sonuç olarak, çalışmamızda lncRNA *SNHG22*'nin özellikle tümör histolojisi gibi parametrelere göre farklılık gösterebilecek şekilde ekspresyon profili sergilediği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, lncRNA *SNHG22*'nin KRK'de potansiyel dokuya özgü biyolojik roller üstlenebileceğini ve belirli alt gruplarda prognostik ya da terapötik hedef olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, lncRNA *SNHG22*'nin moleküler mekanizmalarının daha ayrıntılı olarak ortaya konulabilmesi amacıyla, daha geniş örneklem gruplarını kapsayan, fonksiyonel ve translasyonel düzeyde ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

miRNA'lar, post-transkripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunu düzenleyen ~22 nükleotid uzunluğundaki küçük RNA molekülleridir (110,111). Son yıllarda yapılan çalışmalar, miRNA'ların kanser gelişiminde önemli roller üstlendiğini ortaya koymuştur. Kanser dokularında anormal şekilde ifade edilen miRNA'lar, onkojenik veya tümör baskılayıcı olarak rol alabilirler (110,111,113). Ayrıca çeşitli sinyal yollarını hedefleyerek hastalık progresyonu, tedavi yanıtı ve kemoterapi direnci üzerinde belirleyici etkiler gösterebilirler. Bu nedenle, miRNA'ların KRK gibi solid tümörlerdeki işlevlerinin daha iyi anlaşılması, tanısal biyobelirteçlerin geliştirilmesi ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin oluşturulması açısından önemli bir potansiyel taşımaktadır.

KRK'de etkili olabileceği düşünülen miRNA'lardan birisi olan *miR-4492*, kanser çalışmalarında yeterince araştırılmamıştır. Literatürde over kanseri, meme kanseri, mesane kanseri, glioblastoma multiforme, akciğer kanseri, melanoma, osteosarkom ve KRK gibi bazı kanserlerdeki rolü değerlendirilmiştir (14–21).

Bildiğimiz kadarıyla *miR-4492*'nin kanserle ilişkili ilk çalışmaları, meme kanseri üzerine gerçekleştirilmiştir. Boo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, meme kanseri sferoid zenginleştirilmiş MCF-7 hücre hattında *miR-4492*'nin yüksek ekspresyon gösterdiği bildirilmiştir. Bu durum, *miR-4492*'nin özellikle tümör kökenli hücrelerde aktif olabileceğini düşündürmektedir (19).

Ahn ve arkadaşlarının Glioblastoma multiforme (GBM) üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, CRT-MG hücre hattında nekroz koşullarında *miR-4492*'nin ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgu, *miR-4492*'nin nekrozla ilişkili olarak GBM'de önemli bir rol oynayabileceğini ve bu miRNA'nın GBM için potansiyel bir prognostik biyomarker olabileceğini düşündürmektedir (20).

Zheng ve arkadaşlarının osteosarkom hücre hatları üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, *miR-4492*'nin onkojenik özellikler sergilediği ortaya konmuştur. Araştırmada, *miR-4492*'nin hücrelerin canlılık ve invazyon kapasitelerini artırdığı ve bu etkilerle, lncRNA *SNHG22*'nin etkilerine karşı koyduğu gösterilmiştir. Ayrıca, *SNHG22*'nin *miR-4492*'yi “süngerleyerek” *NKIRAS2* geninin ekspresyonunu artırdığı ve bu ceRNA mekanizması üzerinden osteosarkom progresyonuna katkıda bulunduğu belirlenmiştir (15).

Şu ana kadar bahsedilen üç çalışmanın da ortak özelliği *miR-4492*'nin onkojenik roller üstlenmesidir (15,19,20). Ancak *miR-4492*'nin tümör baskılayıcı rolünü vurgulayan çalışmalar da vardır. Örneğin Yang ve arkadaşları, mesane kanserinde (BCa) *miR-4492*'nin rolünü incelemişlerdir. Çalışmalarında, mesane kanseri dokuları ve hücre hatlarında *miR-4492*'nin ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığını tespit etmişlerdir. *miR-4492*'nin, *ROMO1* genini hedef alarak tümör baskılayıcı bir rol oynadığını ve böylece kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyonunu engellediğini göstermişlerdir (16).

Gao ve arkadaşlarının over kanseri üzerine gerçekleştirdiği çalışmada, *miR-4492*'nin tümör dokularında ve kanser hücre hatlarında anlamlı şekilde azalmış ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir. Araştırma bulguları, lncRNA *FOXD2-AS1*'in *miR-4492*'yi hedef alarak ekspresyonunu baskıladığını ve bu yolla hücre

proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu teşvik ettiğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, *miR-4492*'nin over kanserinde tümör baskılayıcı bir rol üstlenebileceğini düşündürmektedir (17).

Chakraborty ve Nath'ın yaptıkları bir çalışmada, akciğer kanserinde aşırı eksprese olan genleri hedefleyen miRNA'lar sistematik olarak analiz edilmiştir. Yapılan biyoinformatik değerlendirmeler sonucunda, *CELSR2* geninin potansiyel hedeflerinden birinin *miR-4492* olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, *miR-4492*'nin *CELSR2* ekspresyonunu düzenleyerek akciğer kanseri patogeneğinde tümör baskılayıcı bir rol üstlenebileceğini düşündürmektedir (135). Liu ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği başka bir çalışmada da akciğer kanseri dokuları ve hücre hatlarında yapılan analizler sonucunda, *miR-4492*'nin tümör baskılayıcı özellik gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmada, *hsa_circ_0000043*'ün *miR-4492*'yi süngerleyerek düzenleyici etkisini azalttığını ortaya koymuşlardır. Bu etkileşim sonucunda, *miR-4492*'nin hedefi olan *BDNF* ve *STAT3* genlerinin ekspresyonu artmakta, bu durum da hücre proliferasyonu, invazyon ve migrasyonu destekleyerek tümör progresyonuna katkı sağlamaktadır (136). Bu bulgular *miR-4492*'yi, akciğer kanserinde potansiyel bir moleküler belirteç ve terapötik hedef aday olarak göstermektedir.

Ding ve arkadaşları *miR-4492*'nin melanomadaki rolünü incelemiştir. Melanomlu hasta örnekleri ve hücre hatları üzerinde yapılan çalışmada, *miR-4492*'nin tümör baskılayıcı işlev gördüğü belirlenmiştir. Çalışmada, *LINC01214*'ün *miR-4492*'yi süngerleyerek fonksiyonel olarak inaktive ettiği ve bunun sonucunda *PPP1R11* geninin ekspresyonunun arttığı ortaya konmuştur. Bu mekanizma, CD8+ T hücre aktivitesinin baskılanmasına ve böylece tümör mikro-çevresinde immün yanıtın kaçışa neden olmaktadır. Elde edilen bulgular, *miR-4492*'nin melanoma patogeneğinde immün baskılayıcı süreçleri regüle eden önemli bir moleküler hedef olabileceğini ve potansiyel bir prognostik biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir (21).

KRK'de *miR-4492*'nin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Lu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, KRK'li hasta örnekleri ve hücre hatlarında *miR-4492*'nin baskılandığını göstermişlerdir. Çalışmada, *LINC01503*'ün *miR-4492*'yi

süngerleyerek baskıladığı ve bunun sonucunda *miR-4492*'nin hedefi olan *FOXK1* geninin aşırı eksprese olduğu ortaya konmuştur. FOXK1'in artan ekspresyonu hücre proliferasyonu ve invazyonunu destekleyerek tümör progresyonuna katkı sağlamaktadır. Bu bulgular, *miR-4492*'nin KRK'de tümör baskılayıcı bir işlev üstlenebileceğini ve hem prognostik biyobelirteç hem de potansiyel terapötik hedef olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (18).

miR-4492 üzerine yapılan çalışmalar tümör dokuları ile sınırlı değildir. Pratama ve arkadaşları, hepatoselüler karsinom (HCC) hastalarında dolaşımdaki miRNA'ların tedavi yanıtı ve hastaliksız sağkalım üzerindeki olası belirleyici rollerini incelemiştir. Çalışma bulgularına göre, *miR-4492*'nin ekspresyon düzeyinin yüksek olması, transarteriyel kemoembolizasyon (TACE) tedavisine verilen tam yanıtla anlamlı düzeyde ilişkilendirilmiştir. Bu sonuçlar, *miR-4492*'nin HCC'de tedavi yanıtını öngörmeye kullanılabilecek potansiyel bir prognostik biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir (137,138).

Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda, KRK dokularında *miR-4492*'nin ekspresyon düzeylerinin sağlıklı kontrol dokularına kıyasla artış gösterdiği gözlemlenmiş, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,1236$). Her ne kadar istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamış olsa da elde edilen bu bulgu, *miR-4492*'nin KRK'de up-regülasyona uğrayabileceğini ve potansiyel olarak onkojenik bir rol üstlenebileceğini düşündürmektedir. Bu yöndeki varsayımımız, literatürde yer alan bazı çalışmalarla da örtüşmektedir. Özellikle meme kanseri, osteosarkom ve GBM üzerine yapılan çalışmalarda, *miR-4492*'nin artmış ekspresyon düzeyleri ile tümör progresyonunu desteklediği bildirilmiştir (15,19,20). Literatürde mesane kanseri, over kanseri, akciğer kanseri ve melanomada *miR-4492* üzerine yapılan çalışmalarda ise tümör baskılayıcı işlevine vurgu yapılmıştır (16,17,21,135,136). Bu çalışmalar bütünüyle değerlendirildiğinde, bu miRNA'nın farklı kanser türlerinde çeşitli biyolojik roller üstlenebileceği ve tek bir işlev yerine, tümörün geliştiği dokuya özgü olarak onkojenik ya da tümör baskılayıcı şekilde davranabileceği anlaşılmaktadır. Bu nedenle, KRK'deki rolünün daha net biçimde ortaya konabilmesi için daha geniş örneklem gruplarında ve fonksiyonel deneylerle desteklenmiş ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, KRK'li hastalarda *miR-4492* ekspresyon düzeyleri ile çeşitli klinik ve patolojik parametreler arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; cinsiyet, yaş, patolojik tanı, klinik evre, T evresi, uzak metastaz ve lenf nodu metastazı, MSI durumu ve tümör yerleşimi gibi parametrelerle *miR-4492* ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Bununla birlikte, bazı eğilimler dikkat çekicidir. Özellikle cinsiyet açısından, kadın hastalarda yüksek *miR-4492* ekspresyonunun daha sık gözlenmesi, erkeklerde ise düşük ekspresyonun baskın olması, cinsiyete bağlı epigenetik ya da hormonal regülasyon mekanizmalarının *miR-4492* ekspresyonunu etkileyebileceğine işaret etmektedir. Tümör yerleşimi açısından da benzer şekilde bir eğilim söz konusudur; kolon yerleşimli tümörlerde yüksek ekspresyon daha yaygınken, rektum yerleşimli tümörlerde düşük ekspresyon daha baskındır. Bu durum, *miR-4492*'nin tümörün lokalizasyonuna bağlı olarak farklı biyolojik roller üstlenebileceğini ve kolorektal tümör alt tiplerinde farklı düzenleyici ağlara entegre olabileceğini akla getirmektedir. Ayrıca, ileri evre hastalarda düşük ve yüksek ekspresyonun eşit dağılması, *miR-4492*'nin hastalık progresyonuyla doğrudan ilişkili olmayabileceğini düşündürmektedir. Uzak metastaz varlığında da düşük ve yüksek ekspresyon düzeylerinin eşit olması benzer şekilde belirgin bir bağlantının olmadığını göstermektedir. Ancak bu eğilimlerin anlamlılığı sınırlı örneklem büyüklüğü nedeniyle istatistiksel olarak gösterilememiş olabilir. Dolayısıyla, bu ön bulguların doğrulanması ve *miR-4492*'nin klinik parametrelerle ilişkisini daha net ortaya koyabilmek adına daha büyük kohortlarla yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

FOXK1 çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde görev alan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre proliferasyonu, farklılaşma, hücre döngüsünün ilerlemesi, otofaji, enerji metabolizması ve DNA hasarına verilen yanıt gibi temel biyolojik süreçlerin kontrolünde rol oynamaktadır. Literatürde, *FOXK1*'in birçok malign tümörde artmış ekspresyon gösterdiği ve bu artışın hücre proliferasyonu ile metastatik kapasitenin artışıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (23,24). Özefagus kanseri, over kanseri, gastrik kanser, KRK, meme kanseri ve prostat kanseri dahil çeşitli kanser türlerinde onkojenik rolleri olduğu gösterilmiştir. Özellikle KRK bağlamında, *FOXK1*'in EMT, hücre çoğalması, invazyon ve metastaz süreçlerini destekleyerek

tümör progresyonuna katkı sağladığı belirlenmiştir (18,130–133). Ayrıca *FOXK1*'in, Wnt/ β -katenin, PI3K/AKT ve TGF- β gibi kritik sinyal yolları tarafından regüle edildiği ve bu yollardaki düzensizliklerin *FOXK1*'in fonksiyonel aktivitesini artırarak malign davranışları tetikleyebileceği öne sürülmektedir. Bu bağlamda *FOXK1*, kolorektal kanserde hem tanısal hem de terapötik açıdan potansiyel bir hedef olarak değerlendirilmektedir.

Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda, KRK dokularında *FOXK1* ekspresyon düzeylerinin sağlıklı kontrol dokularına kıyasla düşük olduğu gözlemlenmiştir; ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,1038$). Bu durum, *FOXK1*'in KRK'de down-regülasyona uğradığına ve potansiyel olarak tümör baskılayıcı bir rol üstlenebileceğine işaret etse de anlamlılık düzeyinin altında kalması, bu ilişkinin netleştirilmesi için daha geniş örneklem gruplarıyla yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Literatürde ise *FOXK1*'in birçok farklı kanser türünde artmış ekspresyon gösterdiği ve tümör hücrelerinin proliferasyon, invazyon ve metastaz gibi onkojenik özelliklerini desteklediği raporlanmıştır. Bu bağlamda, elde ettiğimiz bulgu literatürde yaygın olarak bildirilen *FOXK1*'in onkojenik etkileriyle uyumlu değildir. Söz konusu farklılık, *FOXK1*'in biyolojik fonksiyonlarının kanserin geliştiği doku mikrosistemine, genetik ve epigenetik bağlama ya da hastaya özgü moleküler özelliklere bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle *FOXK1*'in, farklı kanser türlerinde bulunduğu biyolojik ve moleküler bağlama göre hem tümör baskılayıcı hem de onkojenik roller üstlenebileceği; yani kanserin geliştiği dokuya ve çevresel faktörlere bağlı olarak farklı işlevler gösterebileceği düşünülmelidir. Bu sonuçlar, *FOXK1*'in KRK'deki kesin rolünün belirlenebilmesi için daha kapsamlı, fonksiyonel ve moleküler düzeyde ileri çalışmalar yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda, KRK'li hastalarda *FOXK1* ekspresyon düzeyleri ile çeşitli klinik ve patolojik parametreler arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; *FOXK1* ekspresyon düzeylerinin klinik değişkenlerle anlamlı bir ilişki göstermediği görülse de bazı parametrelerde gözlemlenen eğilimler biyolojik olarak dikkat çekicidir ve daha ileri araştırmaları gerektirmektedir. En dikkat çeken bulgu, histopatolojik alt tip ile *FOXK1* ekspresyonu arasındaki anlamlı ilişkidir ($p=0,03$). Adenokarsinom tipinde

FOXK1 ekspresyonu çoğunlukla düşükken, müsinöz alt tip tümörlerin tamamında ise daha önce yapılan çalışmalar gibi *FOXK1* ekspresyonunun yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak literatürdeki çalışmada histopatolojik ayırım yapılmamıştır (18). Bu bulgu, *FOXK1*'in tümör histolojik alt tiplerine göre farklı şekilde regüle edilebileceğini ve belirli alt tiplerde biyolojik olarak daha aktif olabileceğini düşündürmektedir. Cinsiyet dağılımında, erkek hastalarda *FOXK1* ekspresyonunun daha belirgin şekilde düşük olması ve kadınlarda daha dengeli dağılması, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da ($p=0,143$), *FOXK1* ekspresyonunun cinsiyete özgü epigenetik veya hormonal mekanizmalarla etkilenebileceği yönünde ipuçları sunmaktadır. Diğer klinik parametreler olan yaş, klinik evre, T-evresi, lenf nodu metastazı, uzak metastaz varlığı, MSI durumu ve tümör yerleşimi ile *FOXK1* ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ancak örneklem büyüklüğünün sınırlı olması, bazı potansiyel ilişkilerin istatistiksel olarak ortaya konmasını güçleştirmiş olabilir. Bu nedenle daha büyük hasta gruplarıyla yapılacak ileri düzey çalışmalarla bu ilişkilerin daha net ortaya konması gereklidir.

Bu çalışmada korelasyon analizi sonuçlarına göre, lncRNA *SNHG22* ile *FOXK1* arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı ve güçlü bir pozitif ilişki saptanmıştır. Bu bulgu, lncRNA *SNHG22*'nin *FOXK1* ekspresyonunu doğrudan veya dolaylı bir mekanizma aracılığıyla düzenleyebileceğini düşündürmektedir. Söz konusu iki molekülün yüksek korelasyon düzeyi, aynı biyolojik yolak içinde yer alabileceklerini veya birbirine bağlı düzenleyici ağlarda işlev görebileceklerini ortaya koymaktadır. Literatürde *FOXK1*'in ekspresyonunun çeşitli lncRNA'lar tarafından post-transkripsiyonel düzeyde kontrol edildiği gösterilmiş olup, bu çalışmadaki bulgular lncRNA *SNHG22*'nin benzer bir düzenleyici rol üstlenebileceğine işaret etmektedir (18,134). Bu nedenle, lncRNA *SNHG22-FOXK1* etkileşiminin moleküler düzeyde daha ayrıntılı biçimde araştırılması, KRK'nin patogenezine ışık tutabilecek önemli veriler sağlayabilir.

Öte yandan, lncRNA *SNHG22* ile *miR-4492* arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Literatürde osteosarkom üzerine yapılan çalışmada, lncRNA *SNHG22*'nin *miR-4492* için sünger görevi gördüğü ve bu iki molekül arasında negatif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (15). Ancak, mevcut çalışmada böyle bir ilişki

gözlemlenmemesi, bu iki molekül arasında doğrudan bir düzenleyici etkileşimin bulunmadığını ya da bu ilişkinin örneklem büyüklüğünün sınırlılığı nedeniyle tespit edilemeyecek kadar zayıf olduğunu düşündürmektedir. *miR-4492* ile *FOXK1* arasında ise orta düzeyde pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Oysa literatürde KKK üzerine yapılan çalışmada, bu iki molekül arasında negatif bir korelasyon rapor edilmiştir (18). Bu farklılık, *miR-4492*'nin *FOXK1* ekspresyonunu doğrudan baskılamak yerine, dolaylı mekanizmalar yoluyla etkiliyor olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim Hill ve Tran, miRNA'ların yalnızca doğrudan hedef mRNA'ları değil, aynı zamanda transkripsiyon faktörleri, epigenetik düzenleyiciler ve miRNA biyogenez bileşenleri aracılığıyla diğer genleri dolaylı olarak etkileyebileceğini ortaya koymuştur (139). Bu bağlamda, *miR-4492*'nin *FOXK1* ile olan ilişkisi, bir transkripsiyonel düzenleyici veya başka bir miRNA üzerinden dolaylı biçimde gerçekleşiyor olabilir. Ayrıca, bu iki molekülün birbirinden bağımsız şekilde düzenleniyor olabileceği olasılığı da göz önünde bulundurulmalıdır. Bu çerçevede, *miR-4492* ve *FOXK1* arasındaki pozitif korelasyon, klasik miRNA-hedef gen etkileşimlerinden farklı bir düzenlenme biçiminin söz konusu olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, korelasyon analizinin yalnızca iki değişken arasındaki doğrusal ilişkiyi ortaya koyduğu ve nedensel bir ilişkiyi kanıtlamadığı unutulmamalıdır. Bu nedenle, bu moleküller arasındaki ilişkilerin biyolojik temellerini daha iyi anlamak için ileri düzey fonksiyonel analizlere ihtiyaç vardır. Gelecekte yapılacak çalışmalar, bu moleküllerin biyolojik ve klinik rollerini daha kapsamlı bir şekilde ortaya koyabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. lncRNA *SNHG22* ekspresyonunun, KRK'li tümör dokularında kontrol olarak kullanılan komşu sağlıklı dokulara kıyasla anlamlı düzeyde down-regüle olduğu saptanmıştır ($p=0,0021$). Ayrıca, tümörlü dokularda histopatolojik alt tipe göre lncRNA *SNHG22* ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0,029$). Adenokarsinom alt tipinde lncRNA *SNHG22* ekspresyon düzeyleri genellikle düşük seviyelerde izlenirken, müsinöz karsinom alt tipinde yüksek ekspresyon oranlarının daha yaygın olduğu gözlemlenmiştir. Öte yandan, hastaların cinsiyeti, yaşı, klinik evresi, T-evresi, uzak metastaz, LN metastazı ve MSI durumu ile lncRNA *SNHG22* ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).
2. *miR-4492* ekspresyonunun, KRK'li tümör dokularında kontrol olarak kullanılan komşu sağlıklı dokulara kıyasla up-regüle olduğu belirlenmiş olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,1236$). Hastaların cinsiyeti, yaşı, patolojik tanısı, klinik evresi, T-evresi, uzak metastaz ve LN metastazı, MSI durumu ve tümör yerleşimi gibi parametrelerle *miR-4492* ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$). Bununla birlikte bazı dikkat çekici eğilimler gözlemlenmiştir. Özellikle kadın hastalarda yüksek ekspresyonun daha sık izlenmesi, erkek hastalarda ise düşük ekspresyonun baskın olması dikkat çekicidir. Benzer şekilde, kolon yerleşimli tümörlerde yüksek ekspresyon oranı daha fazla iken, rektum yerleşimli tümörlerde düşük ekspresyon ön plandadır. Ayrıca, ileri evre hastalarda düşük ve yüksek ekspresyonun eşit dağılması ile uzak metastaz varlığında da benzer bir dağılım gösterilmesi, *miR-4492* ekspresyonunun hastalık progresyonu ile doğrudan ilişkili olmayabileceğini düşündürmektedir.
3. *FOXK1* ekspresyonunun, KRK'li tümör dokularında kontrol olarak kullanılan komşu sağlıklı dokulara kıyasla down-regüle olduğu belirlenmiş olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,1038$). Öte yandan, tümörlü dokularda histopatolojik alt tipler dikkate alındığında, *FOXK1*

ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,03$). Adenokarsinom alt tipinde *FOXK1* ekspresyonu çoğunlukla düşük düzeyde iken, müsinöz karsinom alt tipine sahip tümörlerin tamamında *FOXK1* ekspresyonunun yüksek olduğu gözlenmiştir. Cinsiyet açısından değerlendirildiğinde, erkek hastalarda *FOXK1* ekspresyonunun belirgin şekilde düşük seyretmesi ve kadın hastalarda daha dengeli bir dağılım göstermesi dikkat çekici olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,143$). Diğer klinik parametreler olan yaş, klinik evre, T-evresi, LN metastazı, uzak metastaz varlığı, MSI durumu ve tümör yerleşimi ile *FOXK1* ekspresyonu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

4. lncRNA *SNHG22* ile *FOXK1* arasında güçlü bir pozitif korelasyon saptanmış olup, bu ilişki istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı bulunmuştur [$p = 4,70 \times 10^{-10}$, $r = 0,747$]. Öte yandan, lncRNA *SNHG22* ile *miR-4492* arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir ($p = 0,973$, $r = -0,005$). *miR-4492* ile *FOXK1* arasında ise orta düzeyde pozitif bir korelasyon saptanmış ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0,0017$, $r = 0,432$).

Sonuç olarak, bu çalışma lncRNA *SNHG22*, *miR-4492* ve *FOXK1*'in KRK ile ilişkili moleküler ağlardaki potansiyel rollerine dair yeni ve önemli ipuçları sunmaktadır. Elde edilen bulguların doğrulanması ve söz konusu moleküler ilişkilerin altında yatan mekanizmaların ayrıntılı biçimde aydınlatılması için ileri düzey ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Gelecekte gerçekleştirilecek kapsamlı araştırmalar ile bu moleküler yolların daha iyi anlaşılması, lncRNA *SNHG22*, *miR-4492* ve *FOXK1*'in tanisal, prognostik ya da terapötik hedefler olarak klinik uygulamalarda değerlendirilebilmelerinin önünü açabilir.

KAYNAKLAR

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–63.
2. Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2025 Jan 10]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
3. Li Z, Lang Z, Wang T, Qu G, Sui W, Liu J. LncRNA SNHG22 promotes gastric cancer progression by regulating the miR-101-3p/e2f2 axis. *Cell Cycle.* 22(3):347–60.
4. Cheng Q, Chen G, Wu X, Fang H, Shi J, Zhong B. Detection of serum SNHG22 and its correlation with prognosis of non-small cell lung cancer. *J Cardiothorac Surg.* 2024 Sep 20;19:536.
5. Zhang Y, Lu C, Cui H. Long non-coding RNA SNHG22 facilitates hepatocellular carcinoma tumorigenesis and angiogenesis via DNA methylation of microRNA miR-16-5p. *Bioengineered.* 12(1):7446–58.
6. Mao X, Ji T, Liu A, Weng Y. ELK4-mediated lncRNA SNHG22 promotes gastric cancer progression through interacting with EZH2 and regulating miR-200c-3p/Notch1 axis. *Cell Death Dis.* 2021 Oct 18;12(11):957.
7. Guan N, Zheng H, Wu X, Xie L, Tong X. SP1-Regulated Non-Coding RNA SNHG22 Promotes Ovarian Cancer Growth and Glycolysis. *Cancer Manag Res.* 2021 Sep 21;13:7299–309.
8. Zhang PF, Wu J, Luo JH, Li KS, Wang F, Huang W, et al. SNHG22 overexpression indicates poor prognosis and induces chemotherapy resistance via the miR-2467/Gal-1 signaling pathway in epithelial ovarian carcinoma. *Aging.* 2019 Oct 3;11(19):8204–16.
9. Yao J, Wang C, Dong X, Zhang Y, Li Y, Zhou H, et al. lncRNA SNHG22 sponges miR-128-3p to promote the progression of colorectal cancer by upregulating E2F3. *Int J Oncol.* 2021 Aug 6;59(3):71.
10. Li ZW, Zhang TY, Yue GJ, Tian X, Wu JZ, Feng GY, et al. Small nucleolar RNA host gene 22 (SNHG22) promotes the progression of esophageal squamous cell carcinoma by miR-429/SESN3 axis. *Ann Transl Med.* 2020 Aug;8(16):1007.
11. Fang X, Zhang J, Li C, Liu J, Shi Z, Zhou P. Long non-coding RNA SNHG22 facilitates the malignant phenotypes in triple-negative breast cancer via sponging miR-324-3p and upregulating SUDS3. *Cancer Cell Int.* 2020 Jun 17;20:252.
12. Cui X, Zhang H, Chen T, Yu W, Shen K. Long Noncoding RNA SNHG22 Induces Cell Migration, Invasion, and Angiogenesis of Gastric Cancer Cells via microRNA-361-3p/HMGA1/Wnt/ β -Catenin Axis. *Cancer Manag Res.* 2020 Dec 15;12:12867–83.

13. Yang W, Zhang K, Li L, Ma K, Hong B, Gong Y, et al. Discovery and validation of the prognostic value of the lncRNAs encoding snoRNAs in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Aging*. 2020 Mar 3;12(5):4424–44.
14. Liu J, Xie J, Xu E, Xu B, Zhou J, Zhou J, et al. CircRNA hsa_circ_0000043 acts as a miR-4492 sponge to promote lung cancer progression via BDNF and STAT3 expression regulation in anti-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-transformed 16HBE cells. *Toxicol Sci*. 2023 Sep 1;195(1):87–102.
15. Zheng HL, Yang RZ, Xu WN, Liu T, Chen PB, Zheng XF, et al. Characterization of LncRNA SNHG22 as a protector of NKIRAS2 through miR-4492 binding in osteosarcoma. *Aging*. 2020 Sep 20;12(18):18571–87.
16. Yang Y, Zhang F, Huang H, Xie Z, Huang W, Xie H, et al. Long noncoding RNA LINC00319 regulates ROMO1 expression and promotes bladder cancer progression via miR-4492/ROMO1 axis. *J Cell Physiol*. 2020;235(4):3768–75.
17. Gao J, Liu F, Zhao X, Zhang P. Long non-coding RNA FOXD2-AS1 promotes proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells via regulating the expression of miR-4492. *Exp Ther Med*. 2021 Apr;21(4):307.
18. Lu SR, Li Q, Lu JL, Liu C, Xu X, Li JZ. Long non-coding RNA LINC01503 promotes colorectal cancer cell proliferation and invasion by regulating miR-4492/FOXK1 signaling. *Exp Ther Med*. 2018 Dec;16(6):4879–85.
19. Boo L, Ho WY, Ali NM, Yeap SK, Ky H, Chan KG, et al. MiRNA Transcriptome Profiling of Spheroid-Enriched Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Breast MCF-7 Cell Line. *Int J Biol Sci*. 2016 Feb 12;12(4):427–45.
20. Ahn SH, Ahn JH, Ryu DR, Lee J, Cho MS, Choi YH. Effect of Necrosis on the miRNA-mRNA Regulatory Network in CRT-MG Human Astrogloma Cells. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc*. 2018 Apr;50(2):382–97.
21. Ding Z, Wu B, Yang J, Wang D, Qiao J, Guo F. Glycolysis regulated exosomal LINC01214 inhibited CD8+ T cell function and induced anti-PD1 resistance in melanoma via modulating miR-4492/PPP1R11 axis. *Non-Coding RNA Res*. 2024 Oct 30;10:242–51.
22. Myatt SS, Lam EWF. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Nov;7(11):847–59.
23. Yu M, Yu H, Mu N, Wang Y, Ma H, Yu L. The Function of FoxK Transcription Factors in Diseases. *Front Physiol [Internet]*. 2022 Jul 12 [cited 2025 Feb 21];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2022.928625/full>
24. Garry DJ, Maeng G, Garry MG. Foxk1 regulates cancer progression. *Ann Transl Med*. 2020 Sep;8(17):1041.
25. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *The Lancet*. 2019 Oct 19;394(10207):1467–80.
26. Murat TÜRKYILMAZ, Ege İhsan ORUÇ HAMAVİOĞLU, Selin DÜNDAR, Aysun KAVAK ERGÜN, Arzu SEVİNÇ, Semra TÜTÜNCÜ. TÜRKİYE KANSER İSTATİSTİKLERİ 2018 [Internet]. Tolga TOLUNAY, Sedat

- KAYGUSUZ, Bekir KESKİNKILIÇ, Süleyman ÖZSARI, Mehmet Enes GÖKLER, editors. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü; 2022. Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/Dokumanlar/Istatistikler/Kanser_Rapor_2018.pdf
27. Sninsky JA, Shore BM, Lupu GV, Crockett SD. Risk Factors for Colorectal Polyps and Cancer. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2022 Apr 1;32(2):195–213.
 28. Ionescu VA, Gheorghe G, Bacalbasa N, Chiotoroiu AL, Diaconu C. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina (Mex)*. 2023 Sep 12;59(9):1646.
 29. Yang Y, Gao Z, Huang A, Shi J, Sun Z, Hong H, et al. Epidemiology and early screening strategies for colorectal cancer in China. *Chin J Cancer Res*. 2023 Dec 30;35(6):606–17.
 30. Kim BJ, Hanna MH. Colorectal cancer in young adults. *J Surg Oncol*. 2023;127(8):1247–51.
 31. Low EE, Demb J, Liu L, Earles A, Bustamante R, Williams CD, et al. Risk Factors for Early-Onset Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2020 Aug;159(2):492-501.e7.
 32. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterol*. 2019;14(2):89–103.
 33. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*. 2021 Apr 22;13(9):2025.
 34. Ghorbanoghli Z, Jabari C, Sweidan W, Hammoudeh W, Cortas G, Sharara AI, et al. A new hereditary colorectal cancer network in the Middle East and eastern mediterranean countries to improve care for high-risk families. *Fam Cancer*. 2018 Apr 1;17(2):209–12.
 35. Basso G, Bianchi P, Malesci A, Laghi L. Hereditary or sporadic polyposis syndromes. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017 Aug 1;31(4):409–17.
 36. Hryhorowicz S, Kaczmarek-Ryś M, Lis-Tanaś E, Porowski J, Szuman M, Grot N, et al. Strong Hereditary Predispositions to Colorectal Cancer. *Genes*. 2022 Dec;13(12):2326.
 37. Menon G, Carr S, Kasi A. Familial Adenomatous Polyposis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jan 11]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538233/>
 38. Dinarvand P, Davaro EP, Doan JV, Ising ME, Evans NR, Phillips NJ, et al. Familial Adenomatous Polyposis Syndrome: An Update and Review of Extraintestinal Manifestations. *Arch Pathol Lab Med*. 2019 May 29;143(11):1382–98.
 39. Hall MJ. Updates in Chemoprevention Research for Hereditary Gastrointestinal and Polyposis Syndromes. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2021 Mar 1;19(1):30–46.

40. Olén O, Erichsen R, Sachs MC, Pedersen L, Halfvarson J, Askling J, et al. Colorectal cancer in ulcerative colitis: a Scandinavian population-based cohort study. *The Lancet*. 2020 Jan 11;395(10218):123–31.
41. Li W, Zhao T, Wu D, Li J, Wang M, Sun Y, et al. Colorectal Cancer in Ulcerative Colitis: Mechanisms, Surveillance and Chemoprevention. *Curr Oncol*. 2022 Aug 25;29(9):6091–114.
42. Brandaleone L, Dal Buono A, Gabbiadini R, Marcozzi G, Polverini D, Carvello M, et al. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes and Inflammatory Bowel Diseases: Risk Management and Surveillance Strategies. *Cancers*. 2024 Aug 26;16(17):2967.
43. Yamada A, Komaki Y, Komaki F, Micic D, Zullo S, Sakuraba A. Risk of gastrointestinal cancers in patients with cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2018 Jun 1;19(6):758–67.
44. Rombouts AJM, Hugten N, Elferink MAG, Poortmans PMP, Nagtegaal ID, de Wilt JHW. Increased risk for second primary rectal cancer after pelvic radiation therapy. *Eur J Cancer*. 2020 Jan 1;124:142–51.
45. Ho CH, Cheng KC, Chao CM, Lai CC, Chiang SR, Chen CM, et al. Does radiotherapy increase the risk of colorectal cancer among prostate cancer patients? A large population-based study. *J Cancer*. 2020 Aug 25;11(21):6204–12.
46. Deng Y, Huang J, Wong MCS. Associations of alcohol and coffee with colorectal cancer risk in East Asian populations: a Mendelian randomization study. *Eur J Nutr*. 2023 Mar;62(2):749–56.
47. Zhou X, Wang L, Xiao J, Sun J, Yu L, Zhang H, et al. Alcohol consumption, DNA methylation and colorectal cancer risk: Results from pooled cohort studies and Mendelian randomization analysis. *Int J Cancer*. 2022 Jul 1;151(1):83–94.
48. Gram IT, Park SY, Wilkens LR, Haiman CA, Le Marchand L. Smoking-Related Risks of Colorectal Cancer by Anatomical Subsite and Sex. *Am J Epidemiol*. 2020 Jun;189(6):543–53.
49. Botteri E, Borroni E, Sloan EK, Bagnardi V, Bosetti C, Peveri G, et al. Smoking and Colorectal Cancer Risk, Overall and by Molecular Subtypes: A Meta-Analysis. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG*. 2020 Dec;115(12):1940.
50. Ye P, Xi Y, Huang Z, Xu P. Linking Obesity with Colorectal Cancer: Epidemiology and Mechanistic Insights. *Cancers*. 2020 May 29;12(6):1408.
51. Soltani G, Poursheikhani A, Yassi M, Hayatbakhsh A, Kerachian M, Kerachian MA. Obesity, diabetes and the risk of colorectal adenoma and cancer. *BMC Endocr Disord*. 2019 Oct 29;19(1):113.
52. Pati S, Irfan W, Jameel A, Ahmed S, Shahid RK. Obesity and Cancer: A Current Overview of Epidemiology, Pathogenesis, Outcomes, and Management. *Cancers*. 2023 Jan 12;15(2):485.
53. Kim E, Coelho D, Blachier F. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutr Res*. 2013 Dec 1;33(12):983–94.

54. Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS ONE*. 2011 Jun 6;6(6):e20456.
55. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec;16(12):713–32.
56. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*. 2015 May;148(6):1244-1260.e16.
57. Kim DS, Scherer PE. Obesity, Diabetes, and Increased Cancer Progression. *Diabetes Metab J*. 2021 Nov;45(6):799–812.
58. Goto A, Yamaji T, Sawada N, Momozawa Y, Kamatani Y, Kubo M, et al. Diabetes and cancer risk: A Mendelian randomization study. *Int J Cancer*. 2020 Feb 1;146(3):712–9.
59. Xiao W, Huang J, Zhao C, Ding L, Wang X, Wu B. Diabetes and Risks of Right-Sided and Left-Sided Colon Cancer: A Meta-Analysis of Prospective Cohorts. *Front Oncol*. 2022;12:737330.
60. Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, Hiraishi H. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer*. 2016 Jan 6;35:4.
61. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primer*. 2015 Nov 5;1(1):1–25.
62. Kasi A, Handa S, Bhatti S, Umar S, Bansal A, Sun W. Molecular Pathogenesis and Classification of Colorectal Carcinoma. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2020 Sep;16(5):97–106.
63. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 19;18(1):197.
64. Kedrin D, Gala MK. Genetics of the Serrated Pathway to Colorectal Cancer. *Clin Transl Gastroenterol*. 2015 Apr;6(4):e84.
65. Colon Cancer Progression | BioRender Science Templates [Internet]. [cited 2025 Jan 13]. Available from: <https://www.biorender.com/template/colon-cancer-progression>
66. Li Q, Geng S, Luo H, Wang W, Mo YQ, Luo Q, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Oct 7;9(1):1–48.
67. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res GCR*. 2012;5(1):19–27.
68. Luo XJ, Zhao Q, Liu J, Zheng JB, Qiu MZ, Ju HQ, et al. Novel Genetic and Epigenetic Biomarkers of Prognostic and Predictive Significance in Stage II/III Colorectal Cancer. *Mol Ther*. 2021 Feb 3;29(2):587–96.
69. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan;22(1):130.

70. Ahmad R, Singh JK, Wunnava A, Al-Obeed O, Abdulla M, Srivastava SK. Emerging trends in colorectal cancer: Dysregulated signaling pathways (Review). *Int J Mol Med*. 2021 Mar;47(3):14.
71. Rezkitha YAA, Panenggak NSR, Lusida MI, Rianda RV, Mahmudah I, Pradana AD, et al. Detecting colorectal cancer using genetic and epigenetic biomarkers: screening and diagnosis. *J Med Life*. 2024 Jan;17(1):4–14.
72. Cao Q, Tian Y, Deng Z, Yang F, Chen E. Epigenetic Alteration in Colorectal Cancer: Potential Diagnostic and Prognostic Implications. *Int J Mol Sci*. 2024 Mar 15;25(6):3358.
73. Ajithkumar P, Vasantharajan SS, Pattison S, McCall JL, Rodger EJ, Chatterjee A. Exploring Potential Epigenetic Biomarkers for Colorectal Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2024 Jan 10;25(2):874.
74. Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology*. 2015 Oct;149(5):1204-1225.e12.
75. Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, Balaguer F, Goel A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020 Feb;17(2):111–30.
76. Duan B, Zhao Y, Bai J, Wang J, Duan X, Luo X, et al. Colorectal Cancer: An Overview. In: Morgado-Diaz JA, editor. *Gastrointestinal Cancers* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 [cited 2025 Jan 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK586003/>
77. Mahmoud NN. Colorectal Cancer: Preoperative Evaluation and Staging. *Surg Oncol Clin N Am*. 2022 Apr 1;31(2):127–41.
78. Waddell O, Keenan J, Frizelle F. Challenges around diagnosis of early onset colorectal cancer, and the case for screening. *ANZ J Surg*. 2024;94(10):1687–92.
79. Clinical presentation, diagnosis, and staging of colorectal cancer - UpToDate [Internet]. [cited 2025 Jan 22]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-diagnosis-and-staging-of-colorectal-cancer>
80. Maida M, Dahiya DS, Shah YR, Tiwari A, Gopakumar H, Vohra I, et al. Screening and Surveillance of Colorectal Cancer: A Review of the Literature. *Cancers*. 2024 Jan;16(15):2746.
81. Jacobsson M, Wagner V, Kanneganti S. Screening for Colorectal Cancer. *Surg Clin North Am*. 2024 Jun 1;104(3):595–607.
82. Gupta S. Screening for colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2022 Jun;36(3):393–414.
83. Ladabaum U, Dominitz JA, Kahi C, Schoen RE. Strategies for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology*. 2020 Jan 1;158(2):418–32.
84. Rosen RD, Sapra A. TNM Classification. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jan 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/>

85. Chen K, Collins G, Wang H, Toh JWT. Pathological Features and Prognostication in Colorectal Cancer. *Curr Oncol*. 2021 Dec 13;28(6):5356–83.
86. Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73(3):233–54.
87. Abedizadeh R, Majidi F, Khorasani HR, Abedi H, Sabour D. Colorectal cancer: a comprehensive review of carcinogenesis, diagnosis, and novel strategies for classified treatments. *Cancer Metastasis Rev*. 2024 Jun 1;43(2):729–53.
88. Kumar A, Gautam V, Sandhu A, Rawat K, Sharma A, Saha L. Current and emerging therapeutic approaches for colorectal cancer: A comprehensive review. *World J Gastrointest Surg*. 2023 Apr 27;15(4):495–519.
89. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Mar 20;5(1):1–30.
90. Modest DP, Pant S, Sartore-Bianchi A. Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2019 Mar 1;109:70–83.
91. Gmeiner WH. Recent Advances in Therapeutic Strategies to Improve Colorectal Cancer Treatment. *Cancers*. 2024 Jan;16(5):1029.
92. Manzi J, Hoff CO, Ferreira R, Pimentel A, Datta J, Livingstone AS, et al. Targeted Therapies in Colorectal Cancer: Recent Advances in Biomarkers, Landmark Trials, and Future Perspectives. *Cancers*. 2023 Jan;15(11):3023.
93. Salva de Torres C, Baraibar I, Saoudi González N, Ros J, Salva F, Rodríguez-Castells M, et al. Current and Emerging Treatment Paradigms in Colorectal Cancer: Integrating Hallmarks of Cancer. *Int J Mol Sci*. 2024 Jan;25(13):6967.
94. Loganathan T, Doss C GP. Non-coding RNAs in human health and disease: potential function as biomarkers and therapeutic targets. *Funct Integr Genomics*. 2023 Jan 10;23(1):33.
95. Li J, Liu C. Coding or Noncoding, the Converging Concepts of RNAs. *Front Genet*. 2019 May 22;10:496.
96. Tamblin-Hopper P, Kiss-Toth E, Sudbery I, Young D, Wilkinson JM. The potential therapeutic applications of long non-coding RNAs. *J Transl Genet Genomics*. 2024 Jun 27;8(3):225–43.
97. Zhou H, Hao X, Zhang P, He S. Noncoding RNA mutations in cancer. *WIREs RNA*. 2023 Nov;14(6):e1812.
98. Yan H, Bu P. Non-coding RNA in cancer. *Essays Biochem*. 2021 Oct;65(4):625–39.
99. Statello L, Guo CJ, Chen LL, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Feb;22(2):96–118.
100. Li Z, Liu L, Feng C, Qin Y, Xiao J, Zhang Z, et al. LncBook 2.0: integrating human long non-coding RNAs with multi-omics annotations. *Nucleic Acids Res*. 2022 Nov 4;51(D1):D186–91.

101. Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2016 Mar 23;73(13):2491–509.
102. Deogharia M, Gurha P. The “guiding” principles of noncoding RNA function. *WIREs RNA*. 2022 Jul;13(4):e1704.
103. Gao N, Li Y, Li J, Gao Z, Yang Z, Li Y, et al. Long Non-Coding RNAs: The Regulatory Mechanisms, Research Strategies, and Future Directions in Cancers. *Front Oncol* [Internet]. 2020 Dec 18 [cited 2025 Jan 23];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2020.598817/full>
104. Naseer QA, Malik A, Zhang F, Chen S. Exploring the enigma: history, present, and future of long non-coding RNAs in cancer. *Discov Oncol*. 2024 Jun 7;15(1):214.
105. Zhang Y, Liu Q, Liao Q. Long noncoding RNA: a dazzling dancer in tumor immune microenvironment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020 Nov 4;39(1):231.
106. Bhat AA, Afzal M, Moglad E, Thapa R, Ali H, Almalki WH, et al. lncRNAs as prognostic markers and therapeutic targets in cuproptosis-mediated cancer. *Clin Exp Med*. 2024 Sep 26;24(1):226.
107. Jin KT, Yao JY, Fang XL, Di H, Ma YY. Roles of lncRNAs in cancer: Focusing on angiogenesis. *Life Sci*. 2020 Jul 1;252:117647.
108. Segal D, Dostie J. The Talented LncRNAs: Meshing into Transcriptional Regulatory Networks in Cancer. *Cancers*. 2023 Jan;15(13):3433.
109. Wang L, Cho KB, Li Y, Tao G, Xie Z, Guo B. Long Noncoding RNA (lncRNA)-Mediated Competing Endogenous RNA Networks Provide Novel Potential Biomarkers and Therapeutic Targets for Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan;20(22):5758.
110. Wang H. MicroRNAs and Apoptosis in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 28;21(15):5353.
111. Huang X, Zhu X, Yu Y, Zhu W, Jin L, Zhang X, et al. Dissecting miRNA signature in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Lett*. 2021 Mar 31;501:66–82.
112. Saberinia A, Alinezhad A, Jafari F, Soltany S, Akhavan Sigari R. Oncogenic miRNAs and target therapies in colorectal cancer. *Clin Chim Acta*. 2020 Sep 1;508:77–91.
113. Stark VA, Facey COB, Viswanathan V, Boman BM. The Role of miRNAs, miRNA Clusters, and isomiRs in Development of Cancer Stem Cell Populations in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 31;22(3):1424.
114. Budakoti M, Panwar AS, Molpa D, Singh RK, Büsselberg D, Mishra AP, et al. Micro-RNA: The darkhorse of cancer. *Cell Signal*. 2021 Jul 1;83:109995.
115. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):5451–65.

116. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol.* 2018 Aug 3;9:402.
117. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016 Jan 28;1(1):1–9.
118. Balacescu O, Sur D, Cainap C, Visan S, Cruceriu D, Manzat-Saplacan R, et al. The Impact of miRNA in Colorectal Cancer Progression and Its Liver Metastases. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 22;19(12):3711.
119. Hussen BM, Hidayat HJ, Salihi A, Sabir DK, Taheri M, Ghafouri-Fard S. MicroRNA: A signature for cancer progression. *Biomed Pharmacother.* 2021 Jun 1;138:111528.
120. Osei GY, Adu-Amankwaah J, Koomson S, Beletaa S, Asiamah EA, Smith-Togobo C, et al. MicroRNAs and colorectal cancer: clinical potential and regulatory networks. *Mol Biol Rep.* 2023 Nov 1;50(11):9575–85.
121. Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the Rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell.* 2011 Aug 5;146(3):353–8.
122. Cheng Y, Geng L, Wang K, Sun J, Xu W, Gong S, et al. Long Noncoding RNA Expression Signatures of Colon Cancer Based on the ceRNA Network and Their Prognostic Value. *Dis Markers.* 2019 Mar 11;2019:7636757.
123. Fang Y, Pan X, Shen HB. Recent Deep Learning Methodology Development for RNA–RNA Interaction Prediction. *Symmetry.* 2022 Jul;14(7):1302.
124. Dykes IM, Emanuelli C. Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2017 Jun 1;15(3):177–86.
125. Yang C, Wu D, Gao L, Liu X, Jin Y, Wang D, et al. Competing endogenous RNA networks in human cancer: hypothesis, validation, and perspectives. *Oncotarget.* 2016 Feb 8;7(12):13479–90.
126. Huo M, Rai SK, Nakatsu K, Deng Y, Jijiwa M. Subverting the Canon: Novel Cancer-Promoting Functions and Mechanisms for snoRNAs. *Int J Mol Sci.* 2024 Jan;25(5):2923.
127. Xiao H, Feng X, Liu M, Gong H, Zhou X. SnoRNA and lncSNHG: Advances of nucleolar small RNA host gene transcripts in anti-tumor immunity. *Front Immunol.* 2023 Mar 15;14:1143980.
128. Braga EA, Filippova EA, Uroshlev LA, Lukina SS, Pronina IV, Kazubskaya TP, et al. LncRNA Genes of the SNHG Family: Co-methylation and Common Functions in Ovarian Cancer. *Biochem Mosc.* 2024 Nov 1;89(11):2051–68.
129. Alizamir A, Amini MA, Karbasi A, Beyrami M. MiR-4492, a New Potential MicroRNA for Cancer Diagnosis and Treatment: A Mini Review. *Chonnam Med J.* 2024 Jan;60(1):21–6.
130. Wu W, Chen Y, Ye S, Yang H, Yang J, Quan J. Transcription factor forkhead box K1 regulates miR-32 expression and enhances cell proliferation in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2021 May 1;21(5):1–12.

131. Wu M, Wang J, Tang W, Zhan X, Li Y, Peng Y, et al. FOXK1 interaction with FHL2 promotes proliferation, invasion and metastasis in colorectal cancer. *Oncogenesis*. 2016 Nov;5(11):e271–e271.
132. Fan Q, He W, Shang Y. Forkhead box protein K1-regulated neurexophilin 4 promotes proliferation, metastasis and glycolysis in colorectal cancer. *Exp Ther Med*. 2023 Sep 1;26(3):1–10.
133. Wu Y, Peng Y, Wu M, Zhang W, Zhang M, Xie R, et al. Oncogene FOXK1 enhances invasion of colorectal carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2016 May 19;7(32):51150–62.
134. Liu Y, Ding W, Ge H, Ponnusamy M, Wang Q, Hao X, et al. FOXK transcription factors: Regulation and critical role in cancer. *Cancer Lett*. 2019 Aug 28;458:1–12.
135. Chakraborty S, Nath D. A Study on microRNAs Targeting the Genes Overexpressed in Lung Cancer and their Codon Usage Patterns. *Mol Biotechnol*. 2022 Oct 1;64(10):1095–119.
136. Liu J, Xie J, Xu E, Xu B, Zhou J, Zhou J, et al. CircRNA hsa_circ_0000043 acts as a miR-4492 sponge to promote lung cancer progression via BDNF and STAT3 expression regulation in anti-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-transformed 16HBE cells. *Toxicol Sci*. 2023 Aug 29;195(1):87–102.
137. Pratama MY, Visintin A, Crocè LS, Tiribelli C, Pascut D. Circulatory miRNA as a Biomarker for Therapy Response and Disease-Free Survival in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*. 2020 Sep 29;12(10):2810.
138. Huang T, Chen J, Zhang L, Wang R, Liu Y, Lu C. Diagnostic performance of microRNAs for predicting response to transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Front Oncol*. 2025 Jan 14;14:1483196.
139. Hill M, Tran N. miRNA:miRNA Interactions: A Novel Mode of miRNA Regulation and Its Effect On Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2022;1385:241–57.