



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TRANSLASYONEL TIP
ANA BİLİM DALI



**METASTATİK KOLOREKTAL KANSERDE
DOLAŞIMDAKİ TÜMÖR HÜCRESİ DURUMUYLA İLİŞKİLİ
ADAY BİYOBELİRTEÇLERİN ARAŞTIRILMASI**

BERKCAN DOĞAN

DOKTORA TEZİ

BURSA-2024





T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TRANSLASYONEL TIP
ANA BİLİM DALI



**METASTATİK KOLOREKTAL KANSERDE
DOLAŞIMDAKİ TÜMÖR HÜCRESİ DURUMUYLA
İLİŞKİLİ ADAY BİYOBELİRTEÇLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Berkcan DOĞAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN:

Doç. Dr. Dilek PİRİM

**FOA-2021-625 – Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi**

BURSA-2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum "Metastatik Kolorektal Kanserde Dolaşımdaki Tümör Hücreleri Durumuyla İlişkili Aday Biyobelirteçlerin Araştırılması" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Berkcan DOĞAN
Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

19.03.2024

Adı Soyadı: Berkcan DOĞAN

Ana Bilim Dalı: Translasyonel Tıp Ana Bilim Dalı

Tez Konusu: Metastatik Kolorektal Kanserde Dolaşımdaki Tümör Hücresi Durumuyla İlişkili Aday Biyobelirteçlerin Araştırılması

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

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Doç. Dr. Dilek PİRİM

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI	II
KABUL ONAY SAYFASI.....	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	III
İÇİNDEKİLER	IV
TÜRKÇE ÖZET	VI
İNGİLİZCE ÖZET	VII
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kolorektal Kanser	4
2.1.1. Kolorektal kanserin epidemiyolojisi	5
2.1.1.1. Kolorektal kanserin risk faktörleri	7
2.1.1.2. Kolorektal kanserin etiyolojisi	8
2.1.2. Kolorektal kanserin patolojisi	8
2.1.2.1. Kolorektal kanserin histolojik sınıflandırılması.....	10
2.1.2.2. Kolorektal kanserin moleküler sınıflandırması	12
2.1.3. Kolorektal kanserin tanısı	13
2.1.3.1. Kolorektal kanserin semptomları	13
2.1.3.2. Kolorektal kanserin tanı yöntemleri.....	14
2.1.3.3. Kolorektal kanser tanısında kullanılan likit biyopsi temelli teknolojiler	16
2.1.3.4. Kolorektal kanserin moleküler tanısı	18
2.1.4. Metastatik kolorektal kanser	19
2.2. Dolaşımda Bulunan Tümör Belirteçleri	20
2.2.1. Serbest nükleik asitler	22
2.2.2. Hücre dışı veziküller	23
2.2.3. Dolaşımdaki proteinler	24
2.2.4. Dolaşımdaki tümör hücreleri	25
2.2.4.1. Dolaşımdaki tümör hücrelerin metastaz sürecindeki rolleri	25
2.2.4.2. Dolaşımdaki tümör hücreleri belirleme teknolojileri.....	29
2.2.4.3. Metastatik kolorektal kanser ve dolaşımdaki tümör hücreleri	33
2.2.5. MiRNA'lar.....	34
2.2.5.1 MiRNA biyogenezi	35
2.2.5.2. MiRNA'ların fonksiyonu ve regülasyonu	38
2.2.5.3. Metastatik kolorektal kanser ve miRNA'lar	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Örnekler.....	42
3.2. Total RNA İzolasyonu	43
3.3. AdnaTest Protokolü	44
3.3.1. Tümör hücresi seçimi	44
3.3.2. Tümör hücresi ayırımı.....	45
3.4. MiRNA Mikroarray Yöntemi	47
3.5. Veri Analizi	48
3.5.1. DEM analizi	48
3.5.2. İstatistiksel analizler	48
3.5.3. Biyoinformatik analizler	49
3.5.3.1. Hedef gen analizleri	49

3.5.3.2. DEM'lerin ileri analizleri	50
3.5.3.3. DEM'lerin yolak, fonksiyonel ve zenginleştirme analizleri.....	50
3.5.3.4. DEM'lerin TCGA verileri ile karşılaştırılması.....	51
4. BULGULAR	52
4.1. Örnekler.....	52
4.2. Örneklerin Kalite Kontrolü	53
4.3. AdnaTest Protokolünün Sonuçları	53
4.4. Veri Analizi.....	55
4.4.1. DEM analizi	55
4.4.1.1. KEGG ve GO yolak zenginleştirme analizi	60
4.4.2. Biyoinformatik analizler	64
4.4.2.1. CTC durumuyla ilişkili DEM'lerin hedef gen analizleri.....	65
4.4.2.2. DEM'lerin transkripsiyon faktörleri ile regülatör etkileşimleri.....	68
4.4.2.3. DEM'lerin lncRNA analizleri.....	69
4.4.2.4. DEM'lerin KEGG yolak zenginleştirme analizleri	70
4.4.2.5. DEM'lerin IPA ile fonksiyonel zenginleştirme analizi	71
4.4.2.6. DEM'lerin TCGA verileri ile karşılaştırılması.....	72
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	74
6. KAYNAKLAR.....	86
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	105
8. EKLER.....	109
9. TEŞEKKÜR.....	110
10. ÖZGEÇMİŞ	111

TÜRKÇE ÖZET

Kolorektal kanser (KRK), dünya genelinde en yaygın üçüncü kanser türüdür. Son yıllarda, dolaşımdaki mikroRNA (miRNA) profillerinin dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC) durumunu ile ilişkili biyobelirteç özelliğine dair veriler elde edilmiştir. Bu kapsamda metastatik kanser risk değerlendirmesi için bu iki biyobelirtecın kombine analizlerinin kullanım potansiyeli umut vericidir. Bu tez çalışmasında, metastatik KRK (mKRK) hastalarında CTC durumu ile ilişkili dolaşımdaki miRNA imzaları araştırılmıştır.

Tez çalışmasında mKRK hasta örneklerinde (n=48) tümör hücrelerini kolon-spesifik belirteçlere göre tespit eden immünomanyetik temelli AdnaTest ColonCancer teknolojisi ile CTC analizi yapılmıştır. Sağlıklı kontrol (n=8), mKRK-CTC negatif (n=8) ve mKRK-CTC pozitif (n=8) hasta gruplarından seçilmiş örneklerde Agilent miRNA mikroarray platformu ile miRNA profillemesi gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar ve istatistiksel analizler sonucunda CTC durumu ile potansiyel ilişkili aday iki farklı diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA (DEM) grubu belirlenmiştir ($p<0,05$). CTC durumu ve metastaz ile anlamlı ilişkisi bulunan ve aday biyobelirteç özelliği gösteren DEM'lerin etkileşimde olduğu biyomoleküller ve moleküler yollar tespit edilmiştir. Ek olarak, tüm DEM grubunda yer alan miRNA'lar ve hedef genlerin The Cancer Genome Atlas (TCGA) ve Genotype-Tissue Expression (GTEx) veri tabanlarında anlatımları kıyaslanmıştır. DEM grupları arasında yer alan hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-500b-5p ve hsa-miR-769-5p ile ilgili kanser türlerine ait TCGA ve GTEx veri setleri ile karşılaştırıldığında sonuçlarımız ile uyumlu ve anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Sonuç olarak, bulgularımız mKRK risk değerlendirmesinde ve mKRK ilişkili CTC tespitinde kullanım potansiyeli olan yeni aday biyobelirteçleri ortaya çıkarmıştır. İleri ve geniş validasyon çalışmaları ve fonksiyonel analizlerle, elde edilen sonuçların mKRK yönetiminde kullanılacak yeni transkripsiyonel tıp uygulamalarına yol açma potansiyeli yüksektir.

Anahtar Kelimeler: Metastatik kolorektal kanser, likit biyopsi, biyobelirteç, mikroRNA mikroarray, dolaşımdaki tümör hücreleri.

İNGİLİZCE ÖZET

INVESTIGATION OF CANDIDATE BIOMARKERS ASSOCIATED WITH CIRCULATING TUMOR CELL STATUS IN METASTATIC COLORECTAL CANCER

Colorectal cancer (CRC) ranks as the third most prevalent cancer worldwide. In recent years, evidence suggests that circulating microRNA (miRNA) profiles may have biomarker properties to be associated with circulating tumor cells (CTC) status. In this context, the potential of utilization of these two biomarkers for metastatic cancer risk assessment is promising. The dissertation aims to investigate the circulating miRNA signatures associated with CTC status in metastatic CRC (mCRC) patients.

In this dissertation, the CTC status of mCRC samples was determined using AdnaTest ColonCancer technology which detects tumor cells by immunomagnetic approach and characterises them based on colon-specific surface markers. MiRNA expression profiling was performed using the Agilent miRNA microarray platform in 24 selected individuals from healthy individuals (n=8), mCRC-CTC negative (n=8) and mCRC-CTC positive (n=8) groups. As a result of the statistical comparison between groups, two different candidate differentially expressed miRNA (DEM) groups were identified that were associated with CTC status and metastasis ($p<0.05$). The related biomolecules and molecular pathways analysis that interact with DEMs, which have been associated with CTC status and metastasis and evaluated as candidate biomarkers, were performed. The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) databases were also used to compare the expressions of DEM groups and their target genes. Comparison of hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-500b-5p and hsa-miR-769-5p expression among the DEM groups in TCGA and GTEx datasets of related cancer types were found to be significant ($p<0.05$) and compatible with our findings.

In conclusion, our findings reveal candidate biomarkers with potential for use in mCRC risk assessment and mCRC-associated CTC detection. The results have a high potential to lead to new translational medicine applications for mCRC management after further extensive validation and functional studies.

Keywords: Metastatic colorectal cancer, liquid biopsy, biomarker, microRNA microarray, circulating tumor cells.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ
İLE İLİŞKİSİ

					
☐	☐	☒	☐	☐	☐
					
☐	☐	☐	☐	☐	☐
					
☐	☐	☐	☐	☐	☐

Doktora tezi olarak sunduğum "**Metastatik Kolorektal Kanserde Dolaşımdaki Tümör Hücresi Durumuyla İlişkili Aday Biyobelirteçlerin Araştırılması**" başlıklı tez **3.** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK), dünya genelinde tüm kanser vakalarının %10'unu oluşturmaktadır (Sung ve ark., 2021). Mevcut tanı yöntemlerinin limitasyonları nedeniyle metastaz sürecinin değerlendirilmesi için yeni biyobelirteçlerin belirlenmesi KRK sağkalımı için oldukça önemlidir. Bu nedenle, son yıllarda likit biyopsi ile saptanabilen biyobelirteçlerin [dolaşımdaki tümör hücreleri (circulating tumor cells, CTC), serbest tümör DNA'sı (cell free tumor DNA), mikroRNA (miRNA) vb.] analizleri ile KRK'e yönelik transkripsiyonel kanser araştırmaları hız kazanmıştır (Ding ve ark., 2020; Niu ve ark., 2021; Petrik ve ark., 2022; Wen ve ark., 2020).

Likit biyopsi analitlerinden biri olan CTC'ler uzak dokulara ekstrasvazasyon yaparak koloni oluşturmaktadırlar. CTC'lerin dolaşımında sağ kalabilmesi ve uzak dokulara ulaşip lokalize olabilmeleri, mikroçevresinde bulunan birçok faktör ve mekanizmanın etkileşimleri ile gerçekleşmektedir (Heeke, Mograbi, Alix-Panabieres, & Hofman, 2019). CTC'ler metastaz sürecinde kilit bir rol oynadığından dolayı kanser tanısı ve takibinde tümör dokularından dolaşıma katılan ve sağ kalan bu hücrelerin hassas ve özgül tespitleri için farklı teknolojiler geliştirilmiştir. Bu metodların her birinin spesifik limitasyonları ve güçlü yönleri olduğu bilinmektedir (Habli, AlChamaa, Saab, Kadara, & Khraiche, 2020; Petrik ve ark., 2022).

Yapılan bir araştırmada, metastatik KRK (mKRK) hastaların çoğunda tespit edilen CTC'lerin metastatik hücrelerin moleküler özelliklerini primer tümör hücrelerine göre daha iyi yansıttıkları gösterilmiştir ve bu doğrultuda likit biyopsi analizleri için önemi vurgulanmıştır (Onstenk ve ark., 2016). Ayrıca, non-metastatik KRK (nmKRK) hastalarında CTC varlığının kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Y. J. Lu ve ark., 2017). Buna ek olarak, CTC spesifik gen anlatım dinamiklerinin ve CTC sayılarındaki değişikliklerin mKRK prognozu için biyobelirteç potansiyelleri gösterilmiştir (Barbazan ve ark., 2014). İlgili çalışmada, mKRK hastalarının doku örneklerinde EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) süreci ile ilgili genler dahil olmak üzere CTC spesifik belirteçlerin ekspresyon düzeyi belirlenmiştir. Çalışmada, tedavi sırasında CTC belirteçlerinin ekspresyonu azaldığı ve ilgili hastalarda daha iyi bir prognoz gözlemlenmiştir (Barbazan ve ark., 2014). CTC'ler periferik kanda nadir olarak (10^8 kan hücresinde 1 CTC) bulunmaktadır ve

bu da CTC'lerin tespit ve karakterizasyonlarında zorluklara neden olarak araştırmalarda yanlış-negatif sonuçlara yol açabilmektedir (Nelson, 2010). Bu doğrultuda, CTC analizlerine tamamlayıcı olarak kullanılma potansiyeli olan CTC varlığı/yokluğu ile ilişkili tümör biyobelirteçlerinin araştırılması literatürdeki bu konudaki eksikliklerin giderilmesine ışık tutabilecek potansiyeldedir.

Diğer bir likit biyopsi analiti olan miRNA'lar dolaşımda bol miktarda bulunarak yüksek derecede stabil kaldıkları için kanser araştırmalarında biyobelirteç potansiyelleri oldukça yüksek olan moleküllerdir (Rapado-Gonzalez ve ark., 2019). Yüksek çıktılı (high-throughput) teknolojilerinin gelişimiyle miRNA anlatım analizleri için sayıda yöntem geliştirmiştir ve böylece miRNA'ların sistematik değerlendirilmesi mümkün hale gelmiştir. Dolayısıyla, miRNA'ların yakın gelecekte kişiselleştirilmiş tıpta köklü değişikliklere neden olabileceği ön görölmektedir (Vishnoi, & Rani, 2023). Literatürde metastazla ilişkili miRNA'lar araştırılmış olsa da henüz rutin kullanıma yönelik mKrk risk değerlendirilmesine uygun bir miRNA paneli geliştirilmemiştir. Günümüzdeki klinik yaklaşımlarda Kkr'lı hastaların klinikopatolojik karakteristikleri ile bilinen epigenetik ve genetik biyobelirteçler analiz edilerek tümörün metastatik potansiyeli değerlendirilmektedir (Filip ve ark., 2020). Bu yaklaşımlar, intertümör ve intratümör heterojenitesini yansıtmakta yetersiz kaldığı için mKrk hastalarının doğru bir şekilde değerlendirilmesi ve hastaların risk durumlarına göre doğru tedaviye yönlendirilmesi translaşyonel kanser araştırmaları için hala önemli bir konudur (Niu ve ark., 2021; Wen ve ark., 2020). Kkr ile ilgili güncel çalışmalar, miRNA anlatım profillerinin oluşturulmasına ve periferik kan kökenli miRNA'ların dolaşımdaki yeni biyobelirteçlerin olarak tanımlanmasına odaklanmıştır (Niu ve ark., 2021; Wen ve ark., 2020). Farklı biyolojik yollardaki işlevlerine dayanarak bazı miRNA'ların tümör progresyonunda ve kanser patogeneğinde görev aldığı tespit edilmiştir (Rapado-Gonzalez ve ark., 2019).

Likit biyopsi analizleri ile tespit edilen CTC ve miRNA ekspresyon profilleri Kkr metastaz gelişim riskini değerlendirmek için büyük bir potansiyele sahiptir (de Miguel Perez ve ark., 2020). Perez ve arkadaşları, Bevacizumab ile tedavi uygulanan mKrk'lı hastalardan tedavinin farklı zamanlarında hücre dışı veziküllerden RNA izolasyonu yaparak, literatürde Kkr ile ilişkisi gösterilen 10 miRNA'yı qRT-PCR yöntemi ile analiz etmişlerdir. Sonuçta, hsa-miR-21'in ekspresyon seviyesi ile CTC

varlığı arasında korelasyon ($p=0,023$) bulunmuştur (de Miguel Perez ve ark., 2020). Bahsedilen çalışmada, miRNA profillemesi yerine literatürden seçilmiş olan miRNA'ların qRT-PCR analizine dayandığı için CTC durumu ile ilişkili olabilecek diğer miRNA'lar ve dolaşımdaki serbest miRNA'ların ekspresyonu göz ardı edilmiştir.

Bu tez çalışmasının amacı, mKRK'lı hastalarda metastaz gelişim riskini değerlendirme potansiyeli olan CTC durumu ile ilişkili miRNA imzalarını araştırmaktır. Tez çalışmasının hedefleri;

1. mKRK hastalarında CTC analizi gerçekleştirerek hastaları CTC durumlarına (CTC pozitif ve CTC negatif) göre sınıflandırmak,
2. mKRK-CTC negatif ($n=8$) ve mKRK-CTC pozitif ($n=8$) hasta grupları ve sağlıklı kontrol (SK) örnek grubu ($n=8$) dahil olmak üzere toplam 24 örneğe miRNA mikroarray analizi ile miRNA profillemesi gerçekleştirerek gruplar arası diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA'ları (DEM) belirlemek,
3. İstatistiksel olarak anlamlı, metastaz ve CTC durumu ile ilişkili ve grup kıyaslamalarında CTC ayırım gücü en yüksek olan miRNA'ları belirlemek,
4. Belirlenen aday DEM'lerin etkileşimde olduğu biyomoleküller ve moleküler yollardaki fonksiyonel önemlerini biyoinformatik araçlar ile araştırmak şeklinde özetlenebilir.

Özetle, mKRK hastalarının metastaz riskinin tespitinde ve prognoz takibinde girişimsel olmayan yöntemlerle dolaşımda yer alan CTC ve miRNA'ların kombine biyobelirteç olarak kullanılması oldukça önemlidir. Ek olarak, daha önce CTC durumuna göre sınıflandırılmış mKRK hastalarında miRNA mikroarray yöntemi ile miRNA profillemesi gerçekleştirilmemiştir. Bu noktada, literatürde sınırlı olan CTC ve miRNA'ların kombine analizleri şeklinde tasarlanmış araştırmamızda metastaz sürecini daha hassas bir şekilde predikte edebilme potansiyeli olan miRNA'ların belirlenmesi hedeflenerek, hastalara yönelik yeni bir teranostik yaklaşım sağlayabilecektir. Metastaza özgü ve CTC tespitinde potansiyel biyobelirteç özelliği taşıyan ve anlamlı bulunan miRNA'ların mKRK değerlendirmesinde klinikte rutin olarak kullanımı için non-invaziv, hassas, özgül ve maliyeti düşük miRNA paneli tasarlanması için geniş örnek gruplarında validasyonları gerekmektedir. Böylece, hastalığın moleküler mekanizmasının belirlenmesinde ve transkripsiyonel tıp uygulamalarının geliştirilmesinde bizleri bir adım daha yaklaştıracaktır.

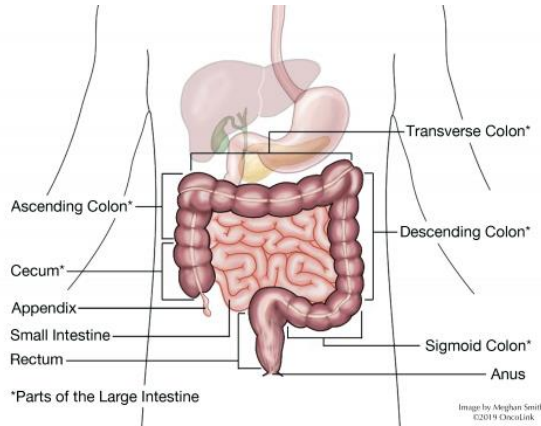
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

KRK gelişmiş ülkelerde kanser kaynaklı ölümler arasında ikinci sırada yer alan ve en sık görülen üçüncü kanser türüdür (Sung ve ark., 2021). Genel popülasyonda yaşam boyu KRK riski yaklaşık %4,1'dir. 2020 yılında 1,9 milyondan fazla yeni KRK vakası ve yaklaşık 930.000 ölüm oranının yanı sıra 2040 yılına kadar 3,2 milyon yeni vakaya ve 1,6 milyon ölüme yükseleceği tahmin edilmektedir (Morgan ve ark., 2023).

KRK, kanserli olmayan poliplerden gelişmektedir ve bu gelişim genellikle 10-15 yıl sürmektedir. Bu uzun preklinik faz, KRK'yi taramaya uygun hale getirmektedir. KRK'ye bağlı insidans ve mortalite oranlarındaki düşüşün önemli bir kısmı, tarama ve erken teşhis ile ilişkilendirilmiştir (Wagner, 2017).

KRK, kalın bağırsak (large intestine, large bowel) olarak da adlandırılan kolon ve rektumun her bölgesinde gelişebilmektedir. Kalın bağırsak çekum, apendiks, çıkan kolon, transver kolon, inen kolon, sigmoid kolon, rektum, anal kanal ve anüsten oluşmaktadır. Rektum ise yaklaşık 10-14 cm uzunluğunda, sigmoid kolonun devamı olarak başlayarak sakrum ve koksiks eğriliğini izleyerek diyafram ve pelvisi geçip anal kanal ile devam etmektedir (Şekil 1) (Baran ve ark., 2018).

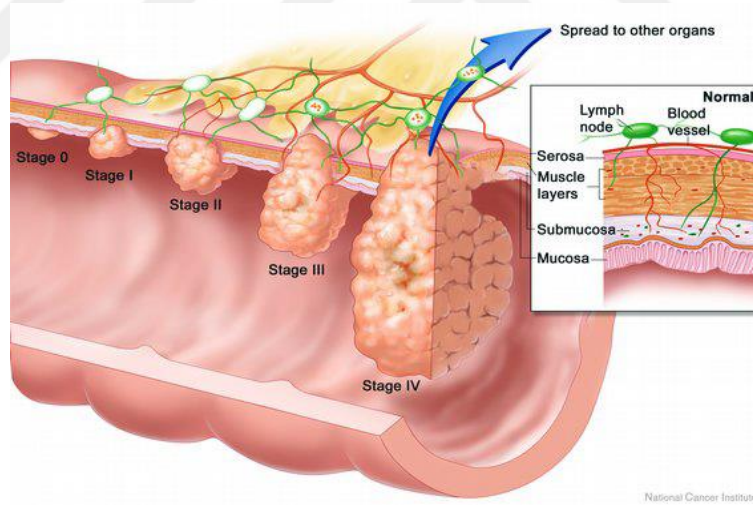


Şekil 1. Kolon anatomisi (Healy, 2022).

KRK, kolonun epitel tabakasında kontrolsüz hücresel bölünmesinden kaynaklanmaktadır. Bu süreç hiperplazi ile başlamakta ve kötü huylu hale gelmeden önce de polip olarak bilinmektedir. Polipler kolonoskopi (lokal eksizyon) sırasında

çıkarılabilmektedir. Bununla birlikte, tedavi edilmezse, adenomatöz polipler displastik hale gelerek daha sonra bir karsinoma dönüşebilmektedir (Ramzy ve ark., 2023).

KRK 4 evreden oluşmaktadır. Belirli evrelerde, KRK hastalarının hayatta kalma oranı önemli ölçüde değişiklik göstermektedir. Beş yıllık sağkalım, evre I için %93, evre II için %78, evre III için %64 (bölgesel lenf bezlerine yayılmış) ve evre IV için %8'dir (uzak bölgelere metastaz yapmış bölgeler). KRK hastalarının %20'sinde tanı anında metastaz saptanırken, %50'sinde de metastaz gelişmektedir (Wagner, 2017) (Şekil 2). Kanserın lokalize olduğundaki evrelerde (evre I–III) cerrahi rezeksiyon temel tedavi yöntemidir. Evre II (yüksek riskli) ve evre III hastalarında ise nüks riskini azaltmak için genellikle 3-6 ay süreyle adjuvan kemoterapi önerilmektedir. Erken evre KRK ve öncüleri olan adenomatöz polipler ve adenomlar asemptomatik olduğundan ancak tarama yöntemleri ile saptanabilmektedir. Kolonoskopi ile rutin taramanın KRK insidansını %80'e kadar azaltabileceği tahmin edilmektedir (Ramzy ve ark., 2023).



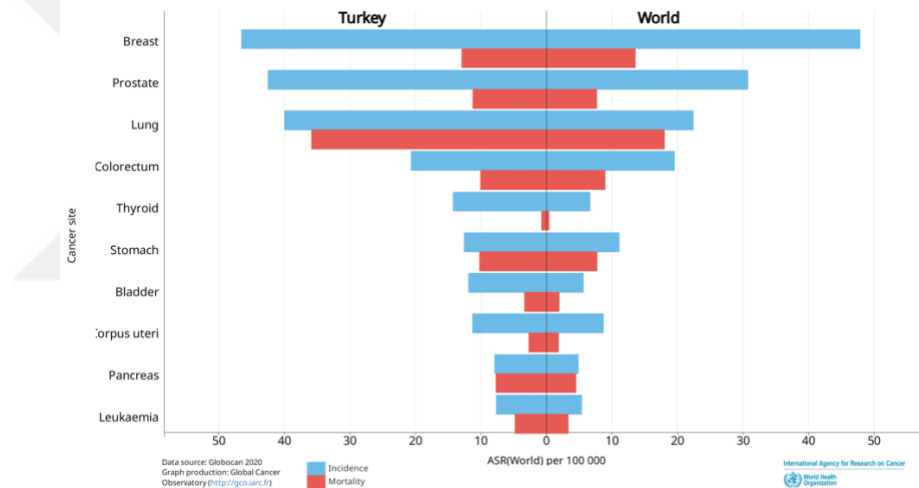
Şekil 2. Kolorektal kanseri evreleri ve kanser gelişim süreci (National Institutes of Health, 2015).

2.1.1. Kolorektal kanserin epidemiyolojisi

Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (National Cancer Institute, NCI) yürüttüğü SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program) başlıklı araştırma verilerine göre 2023 yılında tahmini yeni 153.020 vaka ve 52.550 ölüm beklenmektedir. İlgili yılda yeni vaka sayısı tüm yeni kanser vakalarının yüzde %7,8'sini oluştururken, ölüm

oranı ise tüm kanser türlerinin %8,6'sını oluşturmaktadır (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>).

Yapılan istatistiksel analizlerle tüm kanser türlerinde olduğu gibi KRK hasta grubunda da gelecek yıllarda insidans ve mortalite oranlarında artış beklenmektedir. Global Cancer Observatory verilerine göre, ülkemizde 2020 yılında tüm yaş aralıklarında her iki cinsiyete ait bireylerde insidans oranı 21.000 ve mortalite oranı 10.700 olması öngörüldürken 2040 yılında ise insidans oranı 36.600 ve mortalite oranı 20.300'a çıkması beklenmektedir. Aynı veri tabanındaki verilerine göre, KRK dünya genelinde en sık görülen dördüncü, mortalite oranı en yüksek olan üçüncü kanser türüdür. Ülkemizde ise insidansı ve mortalite oranı en yüksek dördüncü kanser türüdür (Siegel, Miller, Wagle, & Jemal, 2023) (Şekil 3).



Şekil 3. Dünya genelinde ve ülkemizde görülen kanser türlerinin insidans ve mortalite oranlarının karşılaştırılması (<http://globocan.iarc.fr> adresinden alınmıştır).

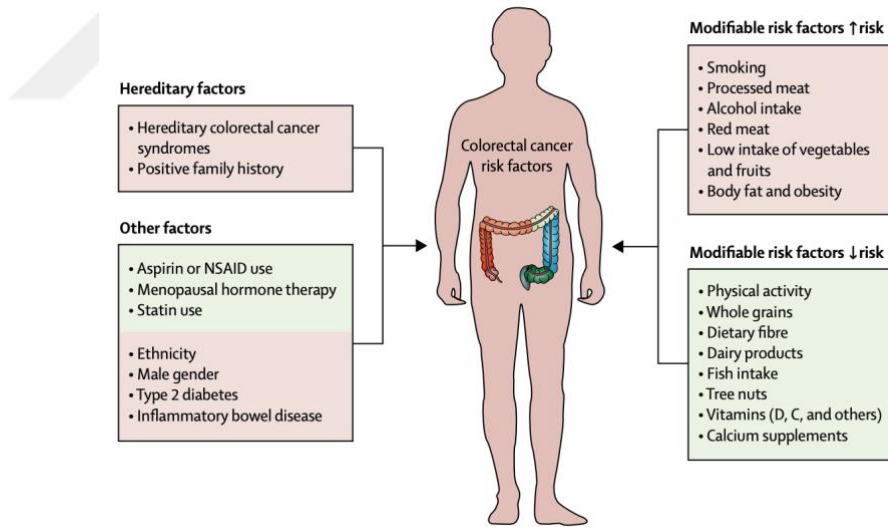
KRK tedavisindeki gelişmeler, artan vakalara rağmen gelişmiş ülkelerde KRK mortalitesinin azalmasına yol açmıştır. Hayatta kalma oranlarındaki bu artış poliplerin çıkarılması ve erken tespit yöntemlerinin geliştirilmesi ile sağlanmıştır. Gelişen tarama testlerinin rutin uygulamaları ile daha önce teşhis edilmemiş hastalar nedeniyle insidans oranları artmış olabilir, ancak uzun vadede kanser öncesi veya metastaz yapmamış poliplerin çıkarılması sayesinde mortalite oranı azalmıştır (Arnold ve ark., 2017; Rawla, Sunkara, & Barsouk, 2019).

Birçok araştırma, KRK insidans oranının artmasının hareketsiz bir yaşam tarzı, obezite, yüksek oranda işlenmiş gıda tüketimi, alkol, kırmızı et tüketimi ve genel

yaşam süresinin artması gibi çevresel değişikliklerin de bir sonucu olduğunu vurgulamaktadır (Sawicki ve ark., 2021).

2.1.1.1. Kolorektal kanserin risk faktörleri

KRK gelişiminde kalıtsal faktörlerin yanı sıra çevresel risk faktörleri de rol oynamaktadır (Dekker ve ark., 2019) (Şekil 4). Epidemiyolojik çalışmalar, kadınlara göre erkeklerde ve artan yaş ile KRK insidansı arasında güçlü korelasyon olduğunu göstermiştir. Ailede KRK öyküsü bulunmasının tüm hastaların yaklaşık %10-20'sini etkilemektedir. Ek olarak, ikiz bireyler ve aile çalışmalarına dayalı olarak, KRK kalıtsallığı %12-35 arasında değişmektedir (Czene, Lichtenstein, & Hemminki, 2002; Lichtenstein ve ark., 2000). Etkilenen akrabaların sayısına, derecesine ve tanı yaşına bağlı olarak değişen risk faktörleri de KRK gelişiminde önemlidir (Henrikson ve ark., 2015).



Şekil 4. Kolorektal kanser gelişiminde etkili olan kalıtsal ve çevresel risk faktörleri (Dekker ve ark., 2019).

Sigara kullanımı (Botteri ve ark., 2020), aşırı alkol tüketimi (Cai, Li, Ding, Chen, & Jin, 2014), obezite (Kyrgiou ve ark., 2017) ve kırmızı ve işlenmiş et tüketimi (Chan ve ark., 2011) gibi değiştirilebilir yaşam tarzı faktörleri KRK oluşum riskini artırmaktadır. Güncel mikrobiyom çalışmaları, *Fusobacterium nucleatum* ve

Bacteroides fragilis gibi spesifik türlerin KRK riskini artırabileceğini belirtmiştir (Kwong ve ark., 2018).

2.1.1.2. Kolorektal kanserin etiyolojisi

Epidemiyolojik çalışmalar, ülkeler arasındaki KRK insidansındaki farklılıkları çevresel ve yaşam tarzı ilişkilerine bağlı olduğunu göstermektedir. KRK, sporadik (%70), ailesel kümelenme (%20) ve kalıtsal sendromlar (%10) şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Sporadik KRK için ortalama tanı yaşı 50 üzerindedir ve çoğunlukla çevresel faktörlerle bağlantılıdır. En yaygın kalıtsal KRK sendromları familial adenomatöz polipozis koli (familial adenomatous polyposis coli, FAP) ve Lynch (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC) sendromudur. KRK türlerinin yaklaşık %5'i bu iki alt tür olarak ortaya çıksa da gruplandırılmamış KRK hastalarının %10-15'i FAP ve/veya HNPCC ile ilişkili olmayan yüksek riskli mutasyon taşımaktadır (Lotfollahzadeh, Recio-Boiles, & Cagir, 2023).

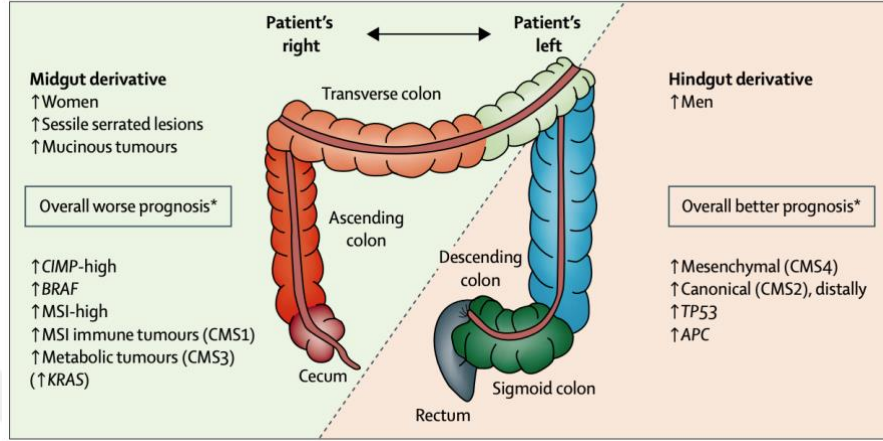
Ülseratif kolitin yanı sıra inflamatuvar bağırsak hastalığının (inflammatory bowel disease, IBD) KRK ile bilinen bir ilişkisi bulunmaktadır. IBD tanısından sonraki 10-20 yıl içinde tahmini KRK insidansı yılda %0,5 ve bundan sonraki yıllarda %1'dir. İnsülin direnci, diyabet gibi hastalıklar ve böbrek nakli olan hastaların uzun süreli immünosupprese tedavi alması gibi durumlar da KRK riskini artıran diğer etkenlerdir (Lotfollahzadeh ve ark., 2023).

Buna karşılık, güncel popülasyon çalışmaları, fiziksel aktivite, beslenme (meyve ve sebze, lif, dirençli nişasta, balık ağırlıklı), vitamin takviyeleri (Folat, Folik asit, Piridoksin B6, Kalsiyum, Magnezyum, Vitamin D), sarımsak, kahve ve bazı ilaçların [aspirin, non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID), menopoz sonrası hormon replasman tedavisi, statinler, bifosfonat ve anjiyotensin inhibitörleri] KRK için koruyucu rol oynadığını saptanmıştır (Lotfollahzadeh ve ark., 2023).

2.1.2. Kolorektal kanserin patolojisi

KRK kalın bağırsağın her yerinde gelişebilmektedir. Sağ taraflı tümörlerin (çıkan kolonda) ve sol taraflı tümörlerin (inen kolonda ve sigmoid kolonda)

prognozları ve kemoterapiye verdikleri yanıtlar açısından farklılık göstermektedir. Sağ ve sol kolon tümörleri arasındaki farklılıklar moleküler alt tiplerin farklı dağılımları ve patogenezi altında yatan birçok moleküler mekanizma ile açıklanmaktadır (Şekil 5) (Schulz, 2023).



Şekil 5. Sağ kolon ve sol kolon tümörlerindeki moleküler mekanizma farklılıkları (Dekker ve ark., 2019).

KRK, birkaç öncü (precursor) aşama ile gelişmektedir ve genellikle polip kökenlidir. Bu süreç anormal bir kript oluşumuyla başlamakta, neoplastik öncü lezyona (polip) dönüşmekte ve yaklaşık 10-15 yıl içerisinde KRK gelişmektedir. KRK alt türlerinin çoğunun kökeninin şu anda bir kanser kök hücresi ya da kök hücre benzeri hücre olduğu düşünülmektedir. Kanser kök hücreleri, onkogenleri aktifleştiren ve tümör baskılayıcı genleri etkisizleştiren genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi ile oluşmaktadır. Kanser kök hücreleri kolonik kriptlerin taban kısmında bulunmaktadır ve tümör oluşumunda, büyümesinde rol oynamaktadır. Kanser kök hücrelerinin proliferasyonunu düzenleyen mekanizmaların incelenmesi, olası terapötik ajanlar ve önleyici tedaviler için ümit verici bir araştırma konusudur (Medema, 2013; Nassar, & Blanpain, 2016).

Bağırsağın iç yüzeyinde veya dışı doğru meydana gelen poliplerin kontrolsüzce büyümesi durumunda kansere dönüşmesi her zaman söz konusu değildir. Poliplerin türüne göre bazı polipler uzun yıllar sonra kansere dönüşebilmektedir (Markowitz, & Bertagnolli, 2009). Kolorektal polipler histolojik olarak neoplastik veya neoplastik olmayan olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 1). Çoğu polip tarama sırasında veya diğer tanısal nedenlerle (gastrointestinal kanama gibi) bulunan küçük,

neoplastik olmayan lezyonlardır. Malignite potansiyeli ve sonraki tarama sıklıkları polip tipine bağlı değişmektedir. Ek olarak, polip içindeki villöz doku yüzdesinin artması ve polip çapının 1 cm'den büyük olması artan malignite riski ve displazinin daha yüksek dereceleri ile ilişkilidir (Colucci, Yale, & Rall, 2003).

Tablo 1. Kolorektal poliplerin histolojik sınıflandırılması ve malign profilleri (Colucci ve ark., 2003).

Histolojik Sınıflandırma	Polip Tipi	Malign Profil
Non-Neoplastik Polipler	Hiperplastik polipler	Yok
	Hamartomlar	
	Lenfoid agregatları	
	İnflamatuar polipler	
Neoplastik Polipler (Adenomlar)	Tübüler adenomlar (%0-25 villöz doku)	Var
	Tübülovilloz adenomlar (%0-25 villöz doku)	
	Villöz adenom (%75-100 villöz doku)	

Adenomatöz poliplerin %75-85'lik kısmını tübüler adenomlar oluştururken, bu adenomların malign olma ihtimali %5'ten azdır. Tübülovillöz adenomlar ise poliplerin yaklaşık %15'ini temsil eder ve %20-25'lik bir kısmı malign özelliktedir. Villöz adenomlar ise yaklaşık %10'luk kısmını oluşturur ve KRK poliplerin en çok malignite gösteren türü %40 ile villöz adenomlardır (Amersi, Agustin, & Ko, 2005).

2.1.2.1. Kolorektal kanserin histolojik sınıflandırılması

Kolorektal poliplerin 2 ana farklı öncü lezyon yolağı vardır. Bunlar:

- I. %70-90 oranında KRK gelişimine yol açan adenom-karsinom yolağı (kromozomal instabilite dizisi, chromosomal instability sequence) ve
- II. %10-20 oranında KRK gelişimine yol açan tırtıklı neoplazi (serrated neoplasia) yolağıdır (Dekker ve ark., 2019).

Adenom-karsinom ve tırtıklı neoplazi yolakları çok sayıda farklı genetik ve epigenetik faktör ile düzenlenen oldukça karmaşık yolaklardır. Kromozomal instabilite fenotipleri tipik olarak bir APC (Adenomatous Polyposis Coli) mutasyonu tarafından başlayan genomik değişikliklerin ardından RAS (Rat Sarcoma) aktivasyonu veya TP53 (Tumor Protein 53)'ün fonksiyon kaybının ardından gelişmektedir (Dekker ve ark., 2019). Çoklu adenomatöz polipler, kalıtsal kanser sendromu olan FAP ile karakterize edilmektedir (Schulz, 2023). Tırtıklı neoplazi yolağı ise RAS ve RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) mutasyonları ve CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) ile karakterize edilen epigenetik düzensizliklerle ilişkilendirilmiştir

(Dekker ve ark., 2019). Tırtıklı polipler (serrated polyps), sağ kolonda daha sık bulunmaktadır ve benzer şekilde kalıtsal Lynch sendromundan kaynaklanan tümörlerin tipik bir örneğidir (Schulz, 2023).

Klinikte KRK, invazyon boyutuna ve tümör kitlesinin yayılmasına göre evrelendirilmektedir. Metastazı olmayan lokalize karsinomlar sıklıkla cerrahi işlemlerle tedavi edilmektedir. Lokal lenf düğümlerine yayılmış daha ilerlemiş tümörler ek adjuvan kemoterapi gerektirmektedir. Kanser karaciğere, akciğere veya diğer organlara metastazlı vakaların çoğunda, ameliyat ve kemoterapi yalnızca hayatta kalma süresini uzatmaktadır ve semptomları hafifletilmektedir, ancak artık hastalığın tedavisi oldukça zordur (Jasperson, Tuohy, Neklason, & Burt, 2010; Jung, Hernandez-Illan, Moreira, Balaguer, & Goel, 2020; Schulz, 2023).

KRK gelişiminde 3 farklı genetik değişiklik meydana gelmektedir:

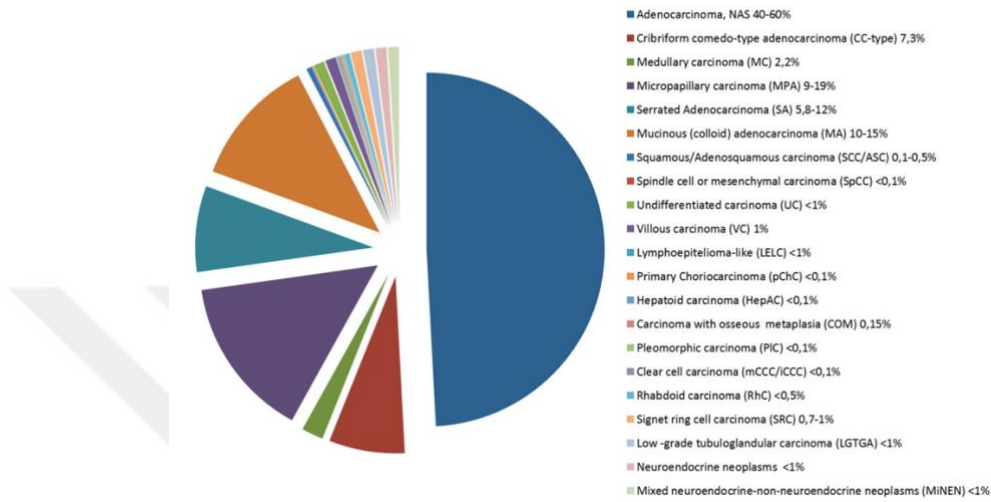
- i. CIN (Chromosomal Instability),
- ii. MSI (Microsatellite Instability),
- iii. CIMP (Pancione, Remo, & Colantuoni, 2012; Remo, Pancione, Zanella, & Vendraminelli, 2012).

Bu değişiklikler farklı moleküler yolları etkilemektedir. Bu moleküler yolların özellikleri aşağıda kısaca aktarılmıştır.

- i. Geleneksel yolak: APC ve KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene) mutasyonlarına (CIN değişiklikleriyle) dayanmaktadır. Bu neoplazmalar genellikle sol kolonda oluşmaktadır.
- ii. Alternatif yolak: CIMP-düşük fenotip, baskın KRAS ve bazen CIN içermeyen BRAF (B-Raf Proto-oncogene, Serine/Threonine Kinase) mutasyonları ile karakterize edilmektedir. Bu yolak ile oluşan KRK türleri daha agresiftir.
- iii. Tırtıklı yolak: BRAF mutasyonları ve epigenomik dengesizlik (CIMP-yüksek) ile karakterize edilmektedir. Bu lezyonlar esas olarak MSS (Microsatellite Stability) ile sağ kolonda bulunmaktadır (Pancione ve ark., 2012; Remo ve ark., 2019; Remo ve ark., 2012).

2019 yılında tamamlanan bir çalışmadaki sınıflandırmada kolorektal karsinomların bir dizi histolojik varyantı listelenmiştir (Şekil 6) (Remo ve ark., 2019). Rutin klinik uygulamalarında kolorektal tümörlerin %90-95'ine klasik adenokarsinom tanısı konulmaktadır, ancak bu grup aslında, genellikle eksik tanı konulan ve

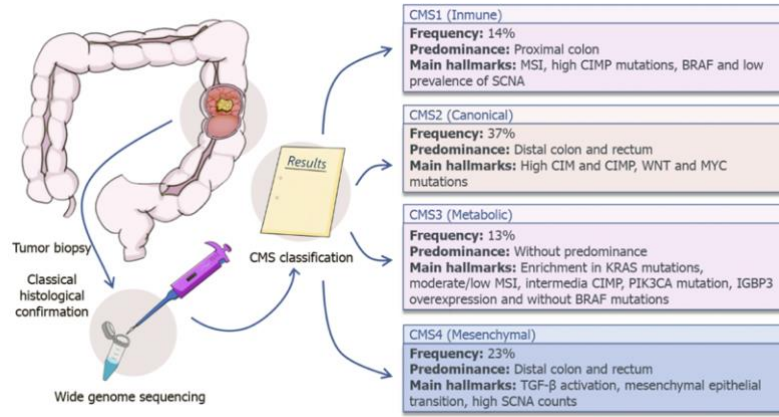
sınıflandırılmış KRK'lerin %50'sini oluşturan nadir histotipleri içeren heterojen bir popülasyondur (Remo ve ark., 2019). KRK'nın histolojik alt tiplerine göre en sık görülen 3 tür sırasıyla adenokarsinoma, mikropapiller karsinoma ve müsinöz (kolloid) adenokarsinomadır.



Şekil 6. Dünya genelinde histolojik tipe göre KRK alt tipleri ve insidansları (Remo ve ark., 2019).

2.1.2.2. Kolorektal kanserin moleküler sınıflandırması

KRK grubuna ait kohort farklılıkları için bir altın standart oluşturmaya yönelik tamamlanan bir çalışma sonucunda CMS (Consensus Molecular Subtypes) olarak bilinen 4 alt tipe ayrılmıştır: CMS1, CMS2, CMS3 ve CMS4. Alt tiplere özgü özellikler ve klinik önemleri Şekil 7'de verilmiştir (Guinney ve ark., 2015). KRK alt tiplendirilmesi yalnızca kanser gelişiminde rol oynayan yolları ve mekanizmaları tanımlamamaktadır. Bu alt tipler prognoz ve tedaviye yanıt açısından farklılık gösterme eğilimindedir. Bu nedenle, MSI ve CIN kökenli KRK alt türlerinin geleneksel kemoterapiye ve hedefe yönelik tedavilere verdikleri yanıtlarda farklılık görülmektedir. CIMP (+) kanserlerinin epigenetik inhibitörlere karşı özellikle duyarlı olduğu tahmin edilmektedir ancak bu fikir henüz klinik bir uygulama ile sonuçlanmamıştır (Schulz, 2023).



Şekil 7. KRK moleküler alt tiplerinin insidansları ve özellikleri (Cervena, Siskova, Buchler, Vodicka, & Vymetalkova, 2020).

2.1.3. Kolorektal kanserin tanısı

2.1.3.1. Kolorektal kanserin semptomları

Erken evrede KRK asemptomatiktir ve genellikle ileri evrelere kadar fark edilmemektedir. Bazı KRK semptomları kanser kökenli olmayan başka bir fizyolojik durumdan da IBS (Irritable Bowel Syndrome), gastrit, peptik ülser, gıda intoleransı veya IBD) kaynaklanabilmektedir. KRK'in olası semptomları:

- Dışkıda kan veya anal kanama,
- Anal mukus salgısı,
- Birkaç hafta içinde bağırsak hareketlerinde değişiklik (kabızlık veya ishal)
- Karında veya anüs çevresinde ağrı veya kramplar,
- İstenmeyen kilo kaybı,
- Yorgunluk ve fiziksel zayıflıktır (IQWiG, 2017).

mKRK semptomları ise tümörün/tümörlerin boyutuna ve kanserin kolon veya rektum dışında yayıldığı bölgeye bağlıdır. mKRK'in olası semptomlarında;

- Kemikler etkilenirse semptomlar arasında ağrı, kırıklar, kabızlık ve/veya yüksek Kalsiyum seviyesi,
- Akciğerler etkilenirse semptomlar arasında nefes darlığı, öksürük, ağrı ve/veya yorgunluk,
- Karaciğer etkilenirse belirtiler arasında mide bulantısı, yorgunluk, ayaklarda ve ellerde şişme, karın çevresinde artış ve/veya sarılık,

- Karındaki lenf düğümleri etkilenirse karın şişliğine ve/veya iştah kaybına,
- Beyin ve/veya omurilik etkilenirse belirtiler arasında ağrı, bilinç bulanıklığı, hafıza kaybı, baş ağrısı, bulanık veya çift görme, konuşma güçlüğü ve/veya nöbetler görülebilmektedir (Markman, 2022).

2.1.3.2. Kolorektal kanserin tanı yöntemleri

KRK tanısında kullanılan birçok yöntem vardır ve uygulanacak tanı yöntemi şüphelenilen kanser türüne, semptomlara, yaşa ve fiziksel duruma, aile öyküsüne ve daha önce gerçekleştirilen tıbbi testlerin sonuçlarına bağlı olarak değişmektedir (American Cancer Society, 2023). KRK tanısı için fiziksel muayenenin yanı sıra aşağıdaki tanı yöntemleri de kullanılmaktadır:

Kolonoskopi: Kolon ve rektum kontrolü, örnek almak veya polip gibi şüpheli görünen alanları çıkarmak için kullanılmaktadır.

Biyopsi: Kesin tanı için uygulanır ve kolonoskopi veya ameliyat sırasında çıkarılan herhangi bir dokudan yapılmaktadır.

Kan Testleri: Karsinoembriyonik Antijen (Carcinoembryonic Antigen, CEA) düzeyini tespit etmek için uygulanmaktadır.

Fekal İmmünokimyasal Test: Dışkıda gizli kan analizi kontrolünde başvurulmaktadır.

CT (Computed Tomography) Taraması: Genellikle ameliyattan önce diğer organlara yayılımını kontrol etmek için kullanılmaktadır.

Manyetik Rezonans Görüntüleme (Magnetic Resonance Imaging, MR): Tümör boyutunu ölçmek ve nerede geliştiğini saptamak için en iyi görüntüleme yöntemidir.

Ultrason: Kanser yayılıp yayılmadığını anlamak amacıyla iç organların bir resmini oluşturmak için ses dalgalarını kullanmaktadır.

PET (Positron Emission Tomography) veya PET-CT Taraması: Organ ve dokuların az miktarda radyoaktif şeker maddesi enjeksiyonu ile görüntüsünü oluşturarak kanserin yayılım sürecini kontrol etmektedir.

Anjiyografi: Kan damarlarına bakmak için ve tedavi planlanmasına da yardımcı kullanılan bir röntgen testidir. Kanser karaciğere yayılmışsa, tümörü besleyen arterleri gösterebilmektedir.

Göğüs Röntgeni: Kanserin akciğerlere yayılıp yayılmadığını görmek için uygulanmaktadır.

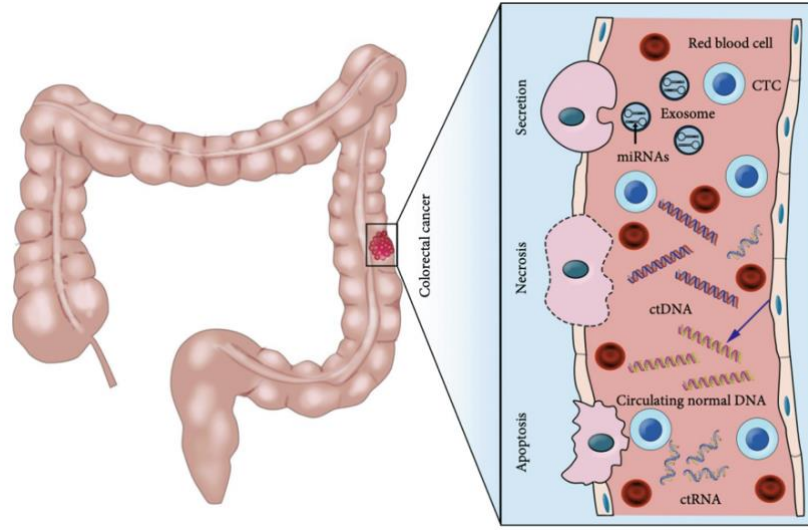
Tümörün Moleküler Testi (Tümör Biyobelirteçleri): Tümöre özgü spesifik genleri, proteinleri ve diğer faktörlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır (American Cancer Society, 2023). KRK için CEA ve CA19-9 (Carbohydrate Antigen 19-9, Cancer Antigen 19-9) prognoz takibini, tedavi cevabını ve yaşam süresine etkisini değerlendirmektedir (Lakemeyer ve ark., 2021). CA19-9, E-Selektinin bir ligandı olan monoklonal bir antikordur (Nakayama ve ark., 1997). Malign ve benign süreçlerde serum CA19-9'da bir artış bulunabilmektedir. Tümör belirteci olarak pankreas, mide, akciğer, safra yolları ve KRK gibi kanser türlerinde genellikle fazla üretilmektedir. Bununla birlikte, siroz, akut kolanjit, diyabet, endometriozis veya bronşektazi tanısı almış hastalarda CA19-9 seviyelerinde de artış görülmektedir (Kim ve ark., 2020). CEA, fetal bağırsak dokusunda ve epitelyal tümör hücreleri tarafından üretilen, anjiyogeneze yardımcı olan, yarılanma ömrü 1-3 gün olan hücre içi bir adezyon molekülüdür (Hammarstrom, 1999). Yüksek CEA seviyeleri, kanserin vücudun diğer bölgelerine yayıldığını gösterebilmektedir. CEA, mKRK hastalarının yalnızca %60'ında seviyeleri yüksek halde bulunduğu ve farklı fizyolojik durumlarda da artmasından dolayı hassasiyet ve özgüllük bakımından zayıftır (American Cancer Society, 2023). Kolorektal, meme, mide, akciğer, yumurtalık ve pankreas kanseri gibi malignitelerde serum CEA seviyesinde artış bulunmuştur (Sisik, Kaya, Bas, Basak, & Alimoglu, 2013). Bununla birlikte, sigara ve alkol kullanımı, kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı, pankreatit ve karaciğer hastalığı gibi malign olmayan birçok durumda da CEA seviyesinde bir yükselme görülebilmektedir (Lakemeyer ve ark., 2021). Çalışmalar, KRK hastalarında CEA için %65-74 arasında değişen bir duyarlılık seviyesi sunarken, CA19-9'un duyarlılığı yalnızca %26-48 arasında değişmektedir. CA19-9'un tek başına düşük duyarlılığına rağmen, çalışmalar CA19-9'un tümör belirteci CEA ile korele olduğunu ve dolayısıyla CEA'nın duyarlılığını artırabileceğini tespit etmiştir (Bagaria, Sood, Sharma, & Lalwani, 2013; Lakemeyer ve ark., 2021; Yakabe ve ark., 2010).

2.1.3.3. Kolorektal kanser tanısında kullanılan likit biyopsi temelli teknolojiler

Birincil tümör ve/veya metastaz bölgelerinden salınan tümör materyallerini tespit etmek için dolaşımdaki biyobelirteçlerin araştırılması likit biyopsi kavramını oluşturmuştur (Fernandez-Lazaro ve ark., 2020). Biyobelirteçler, normal biyolojik ve patojenik süreçlerin veya terapötik bir müdahaleye verilen farmakolojik yanıtların güvenilir bir göstergesi olarak objektif olarak ölçülen ve değerlendirilen moleküllerdir. Bu biyomoleküller, tümör tarafından veya vücut tarafından üretilir ve kanda, idrarda veya vücut sıvılarında veya dokularında normalden yüksek miktarlarda -omik temelli yöntemlerle analiz edilebilmektedir (Ghosh, & Srivastava, 2017).

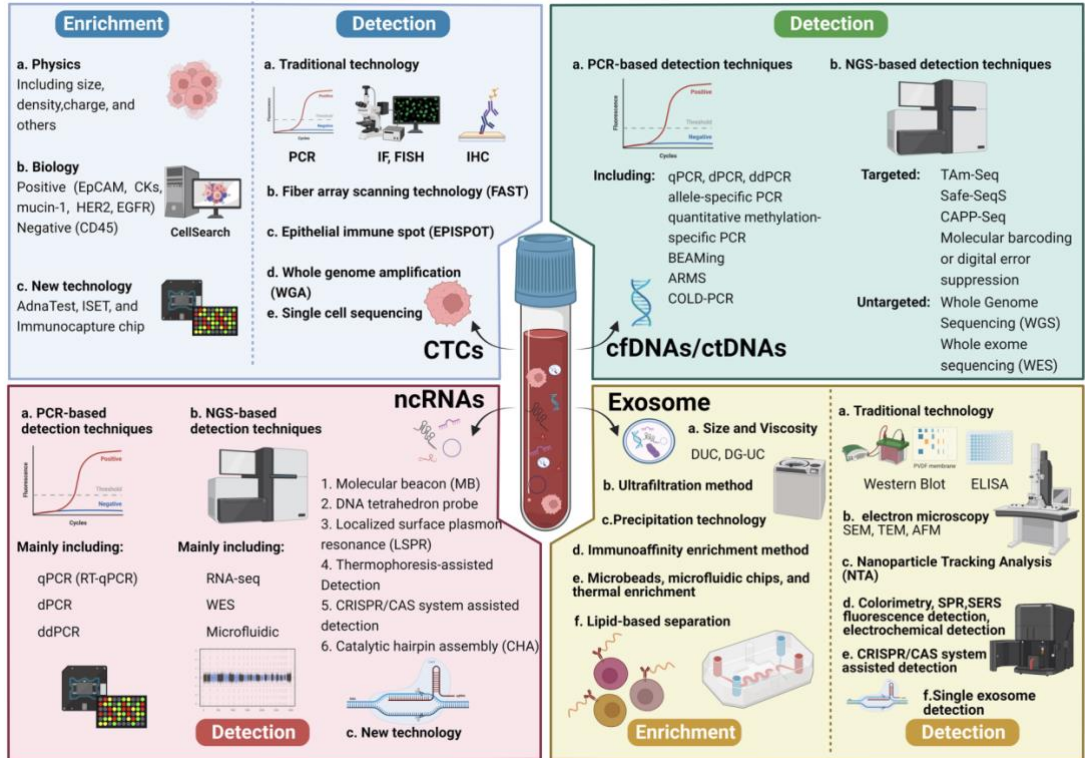
Likit biyopside hedeflenen primer tümör imzaları CTC, EVs (Extracellular Vesicles), ctDNA (circulating tumor DNA), ctRNA (circulating tumor RNA), ncRNAs (non-coding RNAs) moleküllerinden oluşmaktadır. Likit biyopsi non-invaziv, hızlı, maliyeti az ve gerçekleştirilmesi kolay bir yöntemdir. Doku biyopsisi yerine likit biyopsi yapılması hastalar için gereksiz sağlık risklerini önlemektedir (Fernandez-Lazaro ve ark., 2020).

KRK, intratümör heterojenitesi ile bilinmektedir (Schulz, 2023). Bu heterojenitenin invaziv doku biyopsi yöntemiyle tespit edilmesi zordur, fakat likit biyopsi yoluyla herhangi bir evrede KRK'nin moleküler durumu hakkında kapsamlı bilgi sağlayabilmektedir. KRK'ya yönelik likit biyopsi analizlerinde hedeflenen biyobelirteçler Şekil 8'de gösterilmiştir (Mazouji, Ouhajjou, Incitti, & Mansour, 2021). Çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin, KRK tümörlerinde bazı hücrelerel sinyal yolları aktive edildiği gösterilmiştir. Likit biyopsi yöntemine tedavi sırasında meydana gelen değişiklikleri izlemek, tedavi stratejisini uyarlamak, ilerletmek veya değiştirmek amacıyla tümör nüksünün, ilaç direncinin veya metastazın erken bir göstergesi olarak tekrarlı şekilde başvurulmaktadır (Mazouji ve ark., 2021).



Şekil 8. Kolorektal kanseri hastalarında likit biyopsi temelli biyobelirteç türleri (Ding ve ark., 2020).

Likit biyopsi analizlerde yaygın olarak kullanılan yöntemler akış sitometrisi (flow cytometry), PCR (Polymerase Chain Reaction), NGS (Next Generation Sequencing), mikroarray ve BEAMing tekniklerinden (Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics) oluşmaktadır (Şekil 9) (Mazouji ve ark., 2021).



Şekil 9. Likit biyopsi temelli biyobelirteç analizlerinde kullanılan teknikler ve özellikleri (Ma ve ark., 2023).

2.1.3.4. Kolorektal kanserin moleküler tanısı

KRK, CIN, MSI ve CIMP dahil olmak üzere farklı moleküler yollarla gelişen kalıtsal veya sporadik olarak oluşabilmektedir. Hastalığın prognozunu belirlemek, belirli kemoterapötik ilaçlara verilen yanıtı tahmin etmek, hastalığı sınıflandırmak amacıyla KRK vakalarının tanısı için farklı moleküler teknikler uygulanmaktadır (Agrawal, Bhattacharya, Manhas, & Sen, 2019).

CIN, kromozomal kopya sayısındaki veya yapısındaki değişiklikler ile karakterize edilmektedir. Tüm KRK ve adenom vakalarının yaklaşık %80-85'inde bulunur. Bu değişiklikler *APC*, *TP53* gibi tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybına ya da *KRAS* gibi belirli onkogenlerin aktivasyonuna neden olmaktadır. Böylelikle, hücrelerin hayatta kalımı ve proliferasyonu indüklenmekte ve apoptozun inhibisyonu yol açmaktadır (Fearon, & Vogelstein, 1990). *CIN* genellikle KRK'nin kötü prognozu ile ilişkilidir. Bu moleküler yolağın analizleri için DNA temelli dizileme teknikleri ve alel spesifik PCR yöntemleri kullanılmaktadır (Agrawal ve ark., 2019).

MSI, DNA dizilerinde tekrarlayan mikrosatellit bölgelerindeki hatalı eşleşmeleri ifade etmektedir (Agrawal ve ark., 2019). MMR (Mismatch Repair) genlerindeki [*MLH1* (MutL Homolog 1), *MSH2* (mutS Homolog 2), *MSH6* (mutS Homolog 6) ve *PMS2* (PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component)] mutasyonlar, tekrarlanan DNA dizilerinde anormalliklerin birikmesine yol açmaktadır. *MSI*, Lynch sendromu olarak adlandırılan otozomal dominant kalıtılan kanser sendromunun veya MMR genindeki germ hattı mutasyonu ve ardından her iki alelin de kaybına yol açan somatik bir mutasyonla ilişkili olan HNPCC vakalarının çoğunda görülmektedir. *MSI* ayrıca sporadik KRK vakalarının %30'unda gözlenmektedir (Michael-Robinson ve ark., 2001). *MSI*, beş mononükleotid tekrarları (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ve MONO27) belirtecinden oluşan bir PCR paneli ile tanımlanmaktadır. PCR ile çoğaltıldıktan sonra kapiler elektroforez ile analizi veya immünohistokimya yöntemleri ile tespit edilmektedir. İki veya daha fazla belirtecin mutasyona uğradığı tespit edilirse tümör *MSI* yüksek (*MSI-H*) olarak, yalnızca biri mutasyona uğramışsa *MSI* düşük (*MSI-L*) olarak kabul edilmektedir. Hiçbir

mikrosatellit mutasyonu göstermeyen tümörler MSS olarak sınıflandırılmaktadır (Michael-Robinson ve ark., 2001).

CIMP ise genlerin inaktivasyonu ile kanser hücrelerinde gen ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumlu epigenetik temelli bir kontrol mekanizmasıdır. Çok sayıda gen promotorundaki anormal hipermetilasyonun derecesine göre KRK'ler iki gruba ayrılabilir: *CIMP (+)* ve *CIMP (-)*. Sporadik KRK vakalarının yaklaşık %35-40'lık kısmı *CIMP (+)*'tr (Kanwal, & Gupta, 2012; Legolvan, Taliano, & Resnick, 2012). Anormal *CIMP* hipermetilasyonu, *p16*, *p14*, *MGMT* (O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase) ve *MLH1* gibi bazı kritik tümör baskılayıcı genleri susturarak KRK ile sonuçlanmaktadır (Kanthan, Senger, & Kanthan, 2012). DNA'nın bisülfid konversiyonu ve metilasyon spesifik PCR yöntemleri ile tespit edilmektedir. KRK hastalarında *CIMP* analizi önemli bir tanı ve prognostik araçtır (Agrawal ve ark., 2019).

Moleküler tanı yöntemleri ile saptanan veya takip edilen biyobelirteçler, tanısal ve prognostik öneme sahip olmasının yanı sıra belirli bir tedaviye verilen yanıtı da tahmin edebilmektedir. Günümüzde, KRK için moleküler belirteçlerin geliştirilmesi için kapsamlı çalışmalar artarak devam etmektedir. Özellikle KRK'nin erken tanısı için mevcut tümör belirteçleri duyarlılık ve özgüllük açısından elverişli değildir. Kantitatif PCR, mikroarray, NGS ve MS (mass spectrometry) gibi genomik, transkriptomik ve proteomik tekniklerindeki ilerlemeler, yeni, non-invaziv, duyarlı ve spesifik belirteçlerin geliştirilmesini mümkün kılmaktadır (Agrawal ve ark., 2019).

2.1.4. Metastatik kolorektal kanser

mKRK, 5 yıllık sağkalım oranının yaklaşık %14 olduğu ölümcül bir hastalıktır. Erken evre KRK, adjuvan kemoterapiyle veya adjuvan kemoterapi olmadan ameliyatla tedavi edilebilirken; mKRK, tedaviye dirençli metastaz yeteneğine sahip yayılmış kanser hücresi yükü nedeniyle ortadan kaldırılamaz. Yapılan son çalışmalar kolorektal metastazın altında yatan moleküler mekanizmaları daha fazla açıklanmasına ve mevcut terapötik müdahalelerin sınırlamalarının tanımlanmasına odaklanmıştır. Özellikle, genetik mutasyonlar, metastaz başlatan hücreler (metastasis-initiating cells), EMT'nin (Epithelial Mesenchymal Transition) ve tümör mikroçevresi gibi

kavramların tanımlanması ile uzak organların kolonizasyon ve hücre invazyon süreçlerinin açıklanabileceği düşünülmektedir (Shin, Giaccotti, & Rustgi, 2023).

mKRK'e yönelik keşfedilen biyobelirteçlerin sayısı arttıkça, kanser gelişim sürecindeki değişiklikleri tanımlamak için uygun yöntemlerin anlaşılmasını giderek daha önemli hale gelmektedir. Lokalize KRK tedavisi cerrahi ve kemoterapiye dayanırken, metastatik durumda terapötik stratejiler, *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) inhibitörleri, *BRAF* inhibitörleri, *HER2* (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) inhibitörleri, immün kontrol noktası inhibitörleri veya *NTRK* (Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase) inhibitörleri gibi hedefe yönelik tedaviler uygulanmaktadır (Lee, & Loree, 2019).

mKRK için prediktif biyobelirteçler olarak *RAS* ve *BRAF* mutasyonları, MSI ve dMMR (mismatch repair deficiency) eksikliği, *HER2* amplifikasyonları ve *NTRK* füzyonları tespit edilmektedir (Cohen, Pudlarz, Delattre, Colle, & Andre, 2020). Bu biyobelirteçler, FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) ve immünohistokimya gibi geleneksel yöntemlerin yanı sıra NGS gibi likit biyopsi temelli yüksek kapasiteli teknikler ile analiz edilmektedir (Lee, & Loree, 2019).

2.2. Dolaşımda Bulunan Tümör Belirteçleri

Kanserin erken tespiti hastalığın tedavi sonuçlarını ve prognozunu önemli ölçüde iyileştirebilmektedir ancak erken evredeki tümörlerin geniş çaplı taranması için uygun tekniklerin bulunmaması nedeniyle halen mümkün değildir. Doku biyopsisi, tümör tespiti ve teşhisinde altın standart olmasına rağmen doku örneklerinin elde edilmesindeki zorluklar, düşük oranda hassasiyet ve doğruluk, yüksek işlem maliyetleri, heterojen tümör profillerinin mevcudiyeti ve invaziv olması nedeniyle sınırlıdır. Buna karşılık, likit biyopsi analizi ile son yıllarda erken kanser taraması, tümör ilerlemesinin izlenmesi, terapötik yanıtın ve klinik prognozun değerlendirilmesi ve tekrarlayan ve dirençli tümörlerin saptanması için büyük ilgi görmüştür (Wu ve ark., 2020). Dolaşımdaki tümör nükleik asitleri (ctDNA ve ctRNA), CTC'ler, tdEVs (tumor-derived Extracellular Vesicles) ve TEPs (Tumor Educated Platelets), CECs (Circulating Endothelial Cells), bağışıklık hücreleri, proteinler ve kanserle ilişkili fibroblastlar dahil olmak üzere likit biyopsi belirteçleri doğrudan veya dolaylı olarak

analitik ve analitik değişkenlerin eksikliği bu alanda önemli bir sınırlamadır ve likit biyopsilerin geniş ölçekli klinik uygulamalarını engellemektedir. Sonuç olarak, likit biyopsi kanser tanısı, takibi ve kişiselleştirilmiş tedavi için güçlü bir araç olabileceği ve mevcut kanser yönetimi paradigmasını tamamen değiştirebileceği düşünölmektedir. Bununla birlikte, dolaşımdaki biyobelirteçlerin izolasyonunu, zenginleştirilmesini ve analizini geliştirmek için halen çok sayıda araştırmaya ihtiyaç vardır (Wu ve ark., 2020).

2.2.1. Serbest nükleik asitler

Dolaşımdaki veya hücre dışı tümör nükleik asitleri, apoptoz veya nekroz sonrası primer veya metastatik kanser hücrelerinden salınmaktadır (Wu ve ark., 2020). Birçok çalışma, farklı kanser hastalarına ait serum ve plazma örneklerinde exDNA (extracellular DNA) tespit etmiştir (Valpione ve ark., 2018; Wu ve ark., 2020).

Kanser teşhisinde cfDNA'nın (cell free DNA) bir diğer önemli özelliği DNA metilasyon profilindeki değişikliklerdir. Tümörle ilişkili genlerin DNA metilasyon düzeyindeki değişikliği tümör oluşumunu önemli ölçüde etkilemektedir. Kana salınan cfDNA oranı, tümör boyutu, lokasyonu ve vasküleritesi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. cfDNA konsantrasyonu sağlıklı kişilerde 100ng/ml civarında, kanser hastalarında ise 1000ng/ml'ye eşit veya daha yüksek bulunmaktadır (Cheng, Su, & Qian, 2016; Elazezy, & Joosse, 2018). cfDNA ile tümör profili analizleri kolaydır çünkü güvenilir ve kolay erişilebilir bir biyobelirteçtir. Buna rağmen, cfDNA'nın en büyük sınırlaması, yarılanma ömrünün yaklaşık 16 dakika kadar kısa olmasıdır, bu nedenle cerrahi işlem sırasında hızla yok olmaktadır ve hassasiyet oranını düşürmektedir (Qin, Ljubimov, Zhou, Tong, & Liang, (2016). Bu nedenle, cfDNA tespiti için oldukça hassas ve doğru yöntemler gerektirmektedir.

Benzer şekilde, mRNA (messenger RNA), miRNA ve lncRNA (long non-coding RNA) dahil olmak üzere exRNA'nın (extracellular RNA) varlığı da son yıllarda potansiyel non-invaziv kanser biyobelirteçleri olarak dikkat çekmektedir (Wu ve ark., 2020). MiRNA'larla karşılaştırıldığında, dolaşımdaki mRNA'lar RNazlara karşı daha kırılgandır ancak RNA bağlayıcı proteinler ve lipidlerle kompleks olduklarında nispeten stabildir (Deligezer, Erten, Akisik, & Dalay, 2006). Dolaşımdaki mRNA'lar

hücresel protein mekanizmasında yer aldığından hücresel yollar hakkında bilgi vererek kanser için tanısal biyobelirteçler olarak hizmet edebilmektedir. Dolaşımdaki mRNA'lar yıllar önce keşfedilmiş olmasına rağmen, kanda az miktarda bulunması, instabilitesi ve mRNA seviyelerinin bireyler arası değişkenlikleri nedeniyle bu alandaki çalışmalar klinik uygulamalara geçememiştir (Junqueira-Neto, Batista, Costa, & Melo, 2019).

2.2.2. Hücre dışı veziküller

Hücre dışı veziküller, eksozomları (30-100nm), salınan mikrovezikülleri veya mikropartikülleri (100-1000nm) ve apoptotik vezikülleri (1000-5000nm) içeren membrana bağlı yapılardan oluşmaktadır. Bu veziküller biyogenezlerine, biyofiziksel özelliklerine, yüzey belirteçlerine ve işlevlerine göre sınıflandırılmaktadır (van der Pol, Boing, Harrison, Sturk, & Nieuwland, 2012).

Eksozomlar, her türlü hücreden membran kesecikleri olarak aktif salınan hücre dışı keseciklerdir. Boyutu 40-120nm'dir ve beyin omurilik sıvısı, idrar, kan, serum gibi biyolojik sıvıların çoğunda ve ayrıca anne sütünde bulunmaktadır (Yu, Cao, Shen, & Feng, 2015). DNA, RNA, lipitler, enzimler ve proteinler gibi farklı kargo moleküllerinin transferi ile hücreler arası iletişimde aracı olarak görev yapmaktadır (Al-Nedawi ve ark., 2008). Eksozomlar, kanser tespiti için non-invaziv biyobelirteçler olarak kullanılacak tüm spesifik kriterleri karşılamaktadır. Eksozomların büyük bir hacimden izolasyonu ve saflaştırılmasına yönelik geleneksel yöntem, hücrelerin ve diğer bileşenlerin kontaminasyonu olmadan eksozomların toplanmasına yardımcı olan ultrasantrifüjlemedir. Ayrıca, küçük bir hacimden belirli bir eksozom popülasyonunun izolasyonu, eksozomal belirteçlerine [Cluster of Differentiation 147 (CD147), Cluster of Differentiation 9 (CD9) ve Cluster of Differentiation 63 (CD63)] spesifik antikörlerle kaplanmış manyetik boncuklar kullanılarak elde edilebilmektedir (Jia ve ark., 2017). Eksozomların tespiti ve karakterizasyonu; ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), Western Blot, akış sitometrisi, MS, nanoparçacık izleme (tracking) analizi, tarama ve transmisyon elektron mikroskobu dahil olmak üzere çeşitli biyokimyasal tekniklerin kullanılması yoluyla gerçekleştirilmektedir (Lotvall ve ark., 2014). İzolasyon, saflaştırma ve eksozomların tespiti için az sayıda etkili ve

hassas yöntemler nedeniyle yalnızca birkaç eksozomal biyobelirteç, potansiyel kanser biyobelirteçleri olarak tanımlanmaktadır (Jia ve ark., 2017). Daha hassas yaklaşımların geliştirilmesi eksozomal biyobelirteçlerin rutin kliniğe uygulanabilirliğini sağlayacaktır.

2.2.3. Dolaşımdaki proteinler

Proteomik analizler, dolaşımdaki proteinleri bir biyobelirteç olarak değerlendirerek, non-invaziv bir şekilde tümörün prognozu ve tanısı için yeni bir alan açmıştır (Di Meo, Pasic, & Yousef, 2016). Dolaşımdaki protein belirteçleri kanser için en iyi bilinen tanı araçlarıdır. Prostat kanseri taramasında PSA (Prostate Specific Antigen) (Pinsky, Prorok, & Kramer, 2017), meme kanseri postoperatif takibinde CA 15-3 (Cancer Antigen 15-3), CA 19-9, intrahepatik kolanjiyokarsinom için CEA, AFP (α -fetoprotein) ve çoklu malignitelerin taranması için farklı karbonhidrat antijenlerini içermektedir (Feng ve ark., 2017; Qiu ve ark., 2018). Ancak, tekli protein belirteçleri duyarlılık ve özgüllük açısından önemli miktarda sınırlıdır ve yüksek yanlış pozitiflik oranlarıyla ilişkilendirilmiştir. Çoklu protein biyobelirteçlerinden oluşan bir panel hem yanlış pozitiflerin hem de yanlış negatiflerin sayısını azaltarak tanısız ve prognostik doğruluğu artırabileceği düşünülmektedir (Surinova ve ark., 2015). Ek olarak, son yıllarda kanser taraması için dolaşımda birden fazla protein belirtecini kullandığı tanı platformları oluşturulmuştur. MALDI-TOF MS (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-time of Flight Mass Spectrometry) tekniği yalnızca yeni tümöre özgü belirteçleri tanımlamakla kalmayıp aynı zamanda tümörlerin erken taranmasını ve teşhis edilmesini sağlayan yüksek verimli, son derece hassas bir proteomik platformudur (Long ve ark., 2019). Birlikte ele alındığında, dolaşımdaki belirteçlere dayalı teşhis platformları, çeşitli kanserler ve diğer hastalıklara yönelik etkili, yüksek verimli tarama için kullanılabilir. Bu yeni platformların daha fazla klinik örnek üzerinde test edilerek doğrulanması gerekmektedir (Wu ve ark., 2020).

2.2.4. Dolaşımdaki tümör hücreleri

CTC'ler, primer tümörden ve/veya metastatik tümör bölgelerinden salınan periferik kanda dolaşan metastaz sürecinde rol oynayan tümör hücreleridir. Bu nedenle, kanser metastazının güvenilir biyobelirteçleridir (Wu ve ark., 2020). Thomas Ashworth tarafından 1869 yılında kanser hastalarında CTC'lerin varlığı ilk kez tespit edilmiştir (Ashworth, 1869). CTC'ler, periferik kanda yaklaşık 10^8 kan hücresinde 1 CTC gibi bir oranda bulunan oldukça nadir saptanan hücrelerdir (Nelson, 2010). CTC'ler kanda nadir bulunmalarına rağmen kanser biyobelirteçleri olarak potansiyel kullanımı büyük ilgi görmektedir (Maltoni, Gallerani, Fici, Rocca, & Fabbri, 2016; Nagrath ve ark., 2007).

2.2.4.1. Dolaşımdaki tümör hücrelerin metastaz sürecindeki rolleri

CTC'ler, periferik dolaşımda birkaç yıl boyunca dormant halde kalabilmektedir. Ancak her gün kan dolaşımına giren 10^6 CTC'nin yaklaşık %85'i ilk 5 dakika içinde yok olurken, yalnızca %2,5'i mikrometastaza neden olmaktadır ve %0,01'i ise makroskopik metastaz oluşturmaktadır (Park, Kitahara, Urita, Yoshida, & Kato, 2011).

CTC'ler bir dizi biyolojik süreçle metastatik sürecini tetiklemektedir. Başlangıçta CTC birincil tümörden ayrılarak kan ve lenf dolaşımına salınmaktadır ve kayma gerilimine (shear stress) maruz kalmaktadır. Daha sonra, CTC'nin periferik kanda dolaşıp uzaktaki bir dokunun mikrodamarlarına sızarak uzak dokunun mikroçevresinde hayatta kalması gerekmektedir. Son aşama olarak, CTC'nin metastaz sürecini tamamlaması için kolonize olmaktadır (El-Kenawi, Hanggi, & Ruffell, 2020; Joshi, Kumar, Tuli, & Mittal, 2022). CTC'ler, potansiyel organlara giderken EMT sürecini tamamlamaktadır ve böylece damar invazyonunu kolaylaştıran gelişmiş hareketlilik ve göç yeteneği kazanmaktadır. Uygun bir nişe ulaştıktan sonra, CTC'ler, MET (Mesenchymal Epithelial Transition) sürecine uğrayarak ardından kök hücre özelliklerini yeniden kazanmaktadır. Daha sonra metastatik bölgelerde kolonileşmek için proliferatif yeteneği yeniden etkinleştirmektedir (Ocana ve ark., 2012; Tam, & Weinberg, 2013).

CTC'lerin dolaşımında sağ kalabilmesi ve uzak dokulara ulaşip lokalize olabilmeleri, dolaşımdaki kan mikroçevresinde bulunan birçok faktör ve mekanizmanın etkileşimleri ile gerçekleşmektedir. Primer tümör dokusundan ayrılan hücrelerin büyük bir çoğunluğu dolaşımda anoikis etkisiyle yok olmaktadır veya kayma gerilimi etkisiyle mekanik parçalanmaya uğramaktadırlar (Heeke ve ark., 2019; Wang ve ark., 2018). Anoikise direnç gösteren ve immün faktörlerden kaçan CTC'ler, biyolojik karakteristik özelliklerine ve bulundukları kan mikroçevresinin özelliğine göre uzak dokulara yayılmaktadırlar (Heeke ve ark., 2019). Dolayısıyla, dolaşımda sağ kalan CTC'ler metastaz sürecinde kilit bir role sahiptir.

CTC'ler meme, prostat, akciğer, mesane, mide ve diğer kanser türleri dahil olmak üzere çoğu solid tümöre sahip hastalarda saptanmaktadır. Güncel birçok çalışma, CTC'lerin kanser olmayan bireylerde de gözlemlenebileceğini bildirmiştir. Ancak sayısı son derece nadirdir ve kullanılan CTC tespit yöntemlerinin yanlış pozitif olabileceği düşünülmektedir (Yap ve ark., 2019). Metastaz sürecinin gerçekleşmesi CTC'lerin hedef dokularda uyum sağlama, hayatta kalma ve neoanjiyogenezi tetikleme yeteneğine bağlıdır (Bulfony ve ark., 2016). CTC araştırmalarında fenotipik heterojenitesi ve dolaşımında nadir bulunmaları nedeniyle hassas ve spesifik yöntemlerin kullanılmasını gerektirmektedir (Tayoun ve ark., 2019). CTC'ler hastaların çoğunda tespit edilememektedir veya tespit edildiğinde sayısı genellikle düşüktür (7,5ml başına <5 hücre) (Bidard ve ark., 2021). CTC heterojenliğine ilişkin sonuçlar göz önüne alındığında, genellikle en agresif tümörlere sahip olan hastalardan en fazla sayıda CTC elde edilmektedir (Menyailo, Tretyakova, & Denisov, 2020).

Tümör heterojenitesi, bir primer tümör ve ilgili metastazları kapsayan veya aynı histopatolojik alt tipteki tümörler arasında (intratümör ve intertümör) farklı biyolojik davranış özellikleri gösteren genotiplere ve fenotiplere sahip hücre alt popülasyonlarını ifade etmektedir (Martelotto, Ng, Piscuoglio, Weigelt, & Reis-Filho, 2014). Bu popülasyon içerisinde CTC'ler tek başına ya da farklı kombinasyonlar halinde bulunabilmektedir. Genel olarak, CTC'ler epitelyal kökenli, mezenkimal kökenli ve köklülük (stemness) benzeri olmak üzere 3 sınıfa kategorize edilmektedir. CTC'lerde tek başına veya farklı kombinasyonlarda bulunabilen ve antijen özellikleri en iyi bilinen üç belirteç sınıf epitelyal, mezenkimal ve köklülük benzeri belirteçlerdir (Barriere ve ark., 2014).

Epitelyal kökenli CTC'ler, primer tümörden veya metastatik bölgeden dolaşıma katılan hücrelerden oluşmaktadırlar. Bu kategorideki CTC'ler epitelyal özelliklerini kaybetmedikleri için "metastaz başlatıcı hücreler" olarak bilinmektedirler (Barriere ve ark., 2014).

Mezenkimal kökenli CTC'ler, EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) ve CK gibi hücre yüzey belirteçleri dışında EMT belirteçlerini eksprese eden EMT geçiren hücrelerdir. Bu belirteçler biyokimyasal yolların aktivasyonu ve değişmiş metabolizmanın düzenlenmesinde görev almaktadırlar (Barriere ve ark., 2014).

Köklülük benzeri CTC'ler, kanser oluşumunu başlatan veya nüks etmesine neden olan progenitor hücrelerdir ve metastazda önemli rol oynamaktadırlar. Dolaşımdaki bu hücrelerin kökenini anlamak için iki hipotez önerilmektedir. EMT geçiren kanserli somatik kök hücreler birincil tümörden kana göç etmektedirler ve mezenkimal CTC'ler olarak adlandırılabilir. İkinci olasılık ise EMT yollarının gelişmesiyle göç özelliği kazanan tam farklılaşmış kanser hücrelerinden kaynaklanabilmeleridir (Barriere ve ark., 2014).

Yukarıda bahsedilen 3 tipteki CTC'lerin tespitinde ve karakterizasyonunda kullanılabilecek belirteçler ve rolleri Tablo 2'de anlatılmıştır.

Tek halde bulunan CTC'lerin yanı sıra, çeşitli malign neoplazmaları olan hastaların kanında, 2-50 hücreden oluşan grupları veya mikroembolileri (sferoidler) temsil eden CTC kümeleri (CTC cluster) de bulunabilmektedir (Aceto ve ark., 2014). CTC'lere benzer şekilde, birincil tümörden kaynaklanan bu kümeler orijinal bölgeye dönebilmektedir veya diğer organlara (potansiyel metastatik bölgelere) yerleşebilmektedir. Metastazlardan kaynaklanan kümeler aynı zamanda primer tümöre, orijinal metastatik bölgeye geri dönebilmektedir veya diğer doku ve organlarda "self-seed" özelliği göstermektedir (Giuliano ve ark., 2018). CTC kümelerinin oluşumunda, tümör hücrelerinin birbirine bağlı gruplarının kolektif invazyonu, bozulmuş endotel bölgelerinde tümör kümelerinin pasif olarak dökülmesi (passive sheeding, hücrenin hipoksi, asidite, tümörün aşırı büyümesi, besin eksikliği vb. nedeniyle anabiyoya girdiği pasif bir süreç olarak tanımlanabilir) veya invazyon ve dolaşımda tekli tümör hücrelerinin toplanmasıyla ilişkili olduğu varsayılmaktadır (Aceto ve ark., 2014; Giuliano ve ark., 2018). CTC kümelerinin dolaşımda kalmaları otokrin pro-migrasyon faktörleri, *MMPs* (Matrix Metalloproteinases) fazla sentezi ve

immün kaçış ile ilgili olduğu düşünülmektedir. CTC kümelerinin metastatik potansiyeli, tekli CTC'ler ile karşılaştırıldığında 23-50 kat daha yüksektir (Aceto ve ark., 2014; Menyailo ve ark., 2020).

Tablo 2. Kökenlerine göre dolaşımdaki tümör hücrelerin belirteçleri ve rolleri (Barriere ve ark., 2014).

Epitelyal Belirteçler	
EpCAM	Epitelyal kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen bir hücre yüzeyi glikoproteinidir. Kandaki bir hücrenin yüzeyinde bulunması, yabancı kökenli olduğunun kanıtıdır ve hücrel özelliklerine göre kanser hücresi olarak kabul edilebilmektedir.
E-Cadherin	Hücrelerdeki adherens junctions bileşenidir. Epitel hücrelerinin ayırt edici özelliklerinden biridir. Bu molekül, aktin ile iş birliği içinde çalışmaktadır ve hücre göçüne neden olan kuvvetlere karşı direnç sağlamaktadır. Epitelyal doku mimarisini desteklediği belirtilen proteinlerden biridir ve EMT ilerlemesinde önemli bir rolü vardır.
Sitokeratinler	Hücre iskeleti bileşenleri olan ara filamentlerin en büyük ve en çeşitli sınıfıdır. Normal epitelyal farklılaşmasının belirteçleridir, ancak dolaşımdaki farklı karsinom hücrelerini tespit etmek için teşhis aracı olarak kullanılabilirler.
ZO (Zonula Occludens)	ZO sıkı bağlantı proteinleridir (ZO-1, ZO-2 ve ZO-3) ve epitelyal doku mimarisinin korunmasında rol oynamaktadırlar.
ESPR1 (Epithelial Splicing Regulator 1)	EMT sürecinin ana düzenleyicisidir ve en önemli epitelyal spesifik genler arasındadır. Kanser gibi patofizyolojik durumlarda, artan <i>ESPR1</i> ekspresyonu epitelyal fenotipin ayırt edici özelliğidir.
Mezenkimal Belirteçler	
N-Cadherin	Adherens junction proteinlerinde bulunmaktadır ve birçok hücrede ve özellikle mezenkimal hücrelerde eksprese edilmektedir. EMT'nin bir belirteci olarak kullanılmaktadır. EMT sırasında E-Cadherin baskılanırken N-cadherin promote edilmektedir.
Vimentin	Vimentin, mezenkimal hücrelerde eksprese edilen ve genellikle EMT'nin bir belirteci olarak kabul edilen bir proteindir. Hücrelerin mezenkimal şeklini indüklemekte ve hareketliliğini artırmaktadır.
Twist1	Twist1, embriyogenezde yer alan ve EMT'ye yol açan kanserlerde yeniden etkinleştirilen temel bir helix-loop-helix transkripsiyon faktörüdür. Tümör gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynamaktadır. Bu transkripsiyon faktörü, E-Cadherinin E kutusu üzerinde olumsuz etki göstermektedir.
AKT ve PI3K	Çok sayıda sinyal iletim yolağı, EMT için E-Cadherinin temel düzenlemesini etkileyebilmektedir. PI3K'nın downstream efektörü olan onkogenik serin/treonin kinaz AKT, E-Cadherin geninin bir transkripsiyon baskılayıcısıdır. Kanser hücrelerinin hareketliliğinde önemli rol oynayan PI3K/AKT/mTOR yolağının bir parçasıdır.
Zeb1 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1)	ZEB1, DNA bağlayıcı bir transkripsiyon faktörüdür. E-Cadherinin doğrudan transkripsiyonel baskılayıcısıdır. Bu protein, EMT'nin bir aktivatörüdür.
Alternatif Splicing Proteinleri (FGFR2IIIc, Mena, p120 Katenin)	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2 (<i>FGFR2</i>), transmembran reseptör tirozin kinaz ailesine aittir. mRNA seviyesindeki alternatif splicing olayı, <i>FGFR2 IIIb</i> (epitel) veya <i>IIIc</i> izoformunu (mezenkimal) üretmektedir. Mena ise aktin düzenleyici bir proteindir. hMENAΔv6, hMENA alternatif splicing sonucu türetilen izoformdur. Bu protein, EMT özellikleri ve göç davranışı sergileyen kanser hücrelerinde eksprese edilmektedir. Kateninler, transmembran kadeninlerin sitoplazmik alanına bağlı proteinlerdir. Splice varyantlar mezenkimal hücrelere karşı epitelyal hücrelerde baskındır. Mezenkimal p120 katenin izoformu EMT sırasında indüklenmektedir.
PLS3 (Plastin-3)	PLS3, KRK hücrelerinde EMT sürecini indükleyebilmektedir ve karışık profile sahip epitelyal mezenkimal hücrelerini tanımlamada kullanılabilir.
Köklülük Benzeri Belirteçler	
ALDH1 (Aldehyde dehydrogenase-1)	ALDH1 normal meme epitel hücrelerinin %1-2'sinde tanımlanmıştır. ALDH1'in in vivo ve in vitro meme kanser kök hücre özelliklerini tanımladığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar ALDH1 pozitif CTC'lerin metastaz yapma kapasitesini ortaya koymaktadır.
CD44	CD44, hücre göçü ve metastazında rol oynayan bir hücre yüzeyi glikoproteinidir. Bu proteinin kök hücrelerin epitelyal ve mezenkimal özelliklerini tespit edebildiği ileri sürülmüştür.
Gangliosides (GD2, GD3 ve GD1a)	Bazı glikosfingolipidler hücre büyümesinde ve hareketliliğinde rol oynamaktadır. Bu tür gangliositler, CTC köklülük belirteçleri olarak kullanılabilir.
ABC Proteinleri (Xenobiotic Extrusion Pump Proteins)	Kök hücre fenotipinin ABCG2 taşıyıcısının yüksek düzeyde ekspresyonuyla bağlantılı olduğunu ileri sürülmüştür. Birçok ksenobiyotiği ve özellikle kemoterapi ilaçlarını dışarı atabilen bir sistem olarak işlev görmektedir ve kemorezistans ile yakın bir bağlantı olduğunu bilinmektedir.

CTC kümeleri trombositler ve bağışıklık hücreleri içerebilmektedir (Menyailo ve ark., 2020). Bu tür bir iş birliği, tümör hücrelerinin kan dolaşımındaki hayatta kalma

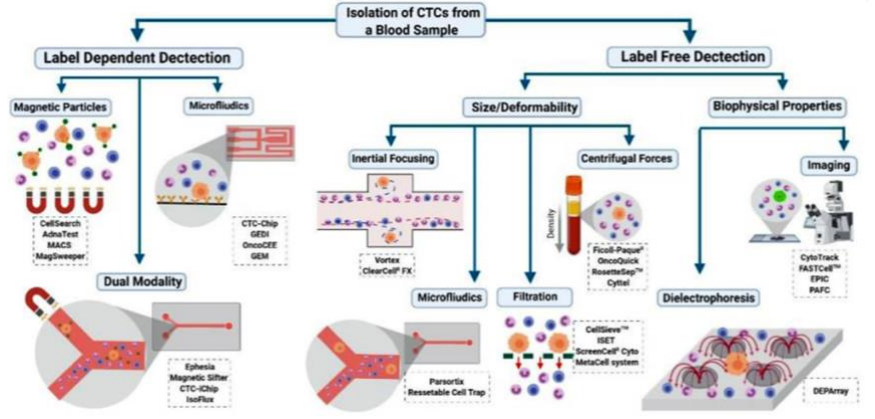
şanslarını arttırmaktadır (Giuliano ve ark., 2018). Nötrofiller, hücre döngüsünün ve DNA replikasyon genlerinin aşırı ekspresyonu ile tümör hücrelerinin metastatik potansiyelini arttırmaktadır. Her 7,5ml kanda en az bir nötrofil içeren CTC kümesi bulunan hastalar, aynı kan hacminde beş veya daha fazla tekli halde CTC'ye sahip hastalara kıyasla önemli ölçüde daha kötü PFS (progression-free survival) göstermiştir (Szczerba ve ark., 2019).

Metastazlı karsinomun gelişimini önlemek ve gözlemek için, CTC'lerin tespiti ve karakterizasyonu bilim insanlarının büyük ilgisini çekmektedir. Buna rağmen, CTC biyolojisi, CTC salınımı, dolaşımda stabilizasyonları, bağışıklık sistemden kaçışları ve metastaz süreci henüz açıklığa kavuşturulmamıştır (Joshi ve ark., 2022).

2.2.4.2. Dolaşımdaki tümör hücreleri belirleme teknolojileri

Son yıllarda yapılan güncel çalışmalarla CTC'lerin tespiti ve zenginleştirilmesi için farklı teknikler geliştirilmiştir. Bu izolasyon ve tespit yöntemleri hedef CTC'ler ile kan hücreleri arasındaki farklılıklara dayanmaktadır. Bu farklılıklar arasında fiziksel özellikler (boyut, yoğunluk, elektrik yükü ve deformasyon) ve spesifik biyolojik özellikler (yüzey protein belirteçlerinin anlatımı ve viyabilite) yer almaktadır (Petrik ve ark., 2022).

CTC tespit ve analiz metodolojilerin odak noktası CTC'lerin klinik, hızlı ve yüksek hassasiyet, seçicilik ve özgüllükle minimal invaziv olarak saptanmasıdır. CTC ile normal kan hücreleri arasındaki gen/protein ekspresyonu, morfoloji, hacim ve biyofiziksel özellikler arasındaki farkların belirlenmesi geçtiğimiz on yılda çeşitli CTC saptama ve sayım cihazlarının oluşturulmasına ve ticarileştirilmesine yol açmıştır. Bu ticarileştirilmiş teknolojiler, CTC tanımlama yöntemine dayalı olarak etikete bağlı (afinite temelli) veya etiketten bağımsız olarak kategorize edilebilmektedir. Buna ek olarak, her kategori fonksiyonel tespit yaklaşımına göre farklı sınıflara ayrılmıştır (Habli ve ark., 2020) (Şekil 11).



Şekil 11. Dolaşımdaki tümör hücrelerinin tespit yöntemleri (Habli ve ark., 2020).

CTC'ler için en sık kullanılan izolasyon prensibi immünoafinite dir. İmmünoafinite yöntemleri, hücre yüzeyindeki spesifik antijenlerin tespitini içermektedir. Kandaki CTC'lerin sayısı, metastatik meme, prostat ve KRK hastalarında OS (overall survival) ve PFS belirleyicisidir (Petrik ve ark., 2022). CellSearch® teknolojisinin geliştirilmesi ile CTC çalışmaları umut verici hale gelmiştir. CellSearch®, periferik kandan CTC analizinin gerçekleştirilmesi için klinik olarak doğrulanmış ve onaylanmış ilk likit biyopsi teknolojisidir. Bu teknoloji immünomanyetik analiz prensibini ve floresan görüntüleme teknolojisini kullanarak örnek toplanmasını, hazırlanmasını ve analizini içermektedir. Bu yöntem, 2004 yılında metastatik meme kanseri, 2007 yılında KRK ve 2008 yılında metastatik prostat kanserinin izlenmesi için FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır. CellSearch® sistemi yarı otomatik bir cihaz ve ilgili bileşenlerden oluşmaktadır. Teknoloji, EpCAM (+) hücrelerin santrifüjlemeden sonra diğer kan bileşenlerinden manyetik olarak ayrılmasını sağlayan EpCAM antikorlarıyla işlevselleştirilmiş ferroakışkan nanopartikülleri kullanılmaktadır. Daha sonra CTC'lerin immünofloresan etiketlemesi, tümör epitel hücrelerine özgü sitokeratinlere (CK 8, 18 ve 19) karşı antikorlar ve ortak bir lökosit antijeni olan CD45'e (Lymphocyte Common Antigen) karşı antikorlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Son olarak, hücre çekirdekleri DAPI (4',2'-diamidino-2-fenilindol dihidroklorür) ile boyanmaktadır. Manyetik alan hücrelerin ayrılmasını sağlanmaktadır, böylece her hücre bir floresans sinyal detektöründen ayrı ayrı geçmektedir. Sistem, potansiyel CTC adayları olarak EpCAM (+)/CK (+)/CD45 (-)/DAPI (+) hücrelerini seçmektedir. Sonuçlar CTC sayısı/7,5ml total kan olarak kaydedilmektedir (Swennenhuis, Dalum,

Zeune, & Terstappen, 2016). Bu teknoloji, CTC canlılığını, çoğalma ve invazyon potansiyellerini korumaktadır. Böylece, CTC alt popülasyonlarının genişletilmesine ve ex vivo karakterizasyonuna olanak sağlamaktadır (Petrik ve ark., 2022).

Bu izolasyon teknolojisine ek olarak, tümörle ilişkili proteinlerin tespitine dayalı olarak canlı CTC'leri seçen EPISPOT (Epithelial ImmunoSPOT) adı verilen fonksiyonel bir test kullanılabilmektedir (Mazard ve ark., 2021). EPISPOT analizi, EpCAM anlatımından bağımsız olarak yalnızca canlı CTC'leri analiz ederek, lökosit depleasyonu ile birleştirilmiş bir teknolojidir (Soler, Cayrefourcq, Mazel, & Alix-Panabieres, 2017). Ayrıca, metastatik olmayan KRK'de, CK19-EPISPOT testi daha önce tedavi edilmemiş tümörleri olan hastaların kan örneklerinde CellSearch® sisteminden daha fazla CTC tespit etmiştir (Deneve ve ark., 2013). Son olarak, EPISPOT testi mKRK'li hastalarda dolaşımdaki hayatta kalan tümör hücrelerinin klinik önemini başarılı bir şekilde izlemek için de kullanılabilmektedir (Mazard ve ark., 2021).

CTC tespiti için kullanılan yöntemlerden biri de AdnaTest'dir. AdnaTest immünomanyetik temelli yöntemle, tümör ile ilişkili antijenlere spesifik tasarlanmış antikorlarla işaretlenmiş manyetik boncukları kullanarak CTC'leri zenginleştiren bir teknolojidir. Yalnızca anti-EpCAM antikorunu kullanan CellSearch yöntemine göre AdnaTest bir antikor kokteyli kullanmaktadır. Farklı kanser türlerine (meme, prostat, yumurtalık, akciğer veya kolon kanseri) spesifik antikorlarla yakalanan CTC'ler elde edilmektedir (Ferreira, Ramani, & Jeffrey, 2016; Raimondi ve ark., 2014).

Bir immünomanyetik izolasyon ve zenginleştirme teknolojisi olan MagSweeper CTC'leri yüksek saflıkta izole edebilmektedir. Cihazın işlevsel kısmı, CTC'leri izole eden ve robotik olarak kontrol edilen bir manyetik çubuktur. Numune, tümör antikorlarıyla kaplı manyetik parçacıklarla karıştırılmaktadır. Manyetik çubuk numunelerin üzerinden dairesel hareketlerle geçerek, manyetik olarak etiketlenmiş CTC'leri izole etmektedir. İzolasyon prosedürü, istenen etiketli tümör hücrelerinin yakalanmasını, diğer hücrelerin ise serbest bırakılmasını ve yıkanmasını içermektedir. Yüksek saflıkta CTC'ler elde edilene kadar işlem tekrarlanmaktadır (Talasaz ve ark., 2009).

CTC'ler ayrıca CTC Chip, GEDI (Geometrically Enhanced Differential Immunocapture) ve OncoCEE gibi platformlar ile analiz edilebilmektedir. Analitik

"ip üzerinde laboratuvar" sistemleri olan mikroakışkan cihazlar, numune analizi için gerekli tüm bileşenler entegre edilmiştir. CTC izolasyonu için tasarlanan ilk CTC-Chip mikroakışkan cihazı 2007 yılında geliştirilmiştir. Anti-EpCAM antikorları ile kimyasal olarak işlevselleştirilmiş bir mikroarray sisteminden oluşmaktadır. Cihaz yüzeyinde etkili CTC yakalama için cihaz yüzeyinin geometrik düzeni ve sıvı akış kontrolü optimize edilmiştir. Bu teknoloji ile CTC'ler akciğer, meme, prostat, kolon ve pankreas gibi kanser hastalarının periferik kanından başarıyla izole edilmiştir (Ferreira ve ark., 2016).

Kandaki düşük CTC konsantrasyonuna ek olarak, hastalarda CTC analizinin zorluğu, yetersiz CTC tespiti veya yetersiz kan hacmi de olabilir. Bu nedenle, GILUPI nanodetektr gibi CTC'lerin doğrudan in vivo izolasyonuna yönelik cihazlar geliştirilmiştir. Cihazın n kol toplardamarına 30 dakika süreyle uygulanması sırasında cihazdan büyük miktarda kan geçmektedir. Cihazın içinde, EpCAM antikorlarıyla kaplı "tarama" alanından 1,5 litreye kadar kan geçebilmektedir ve bu da CTC'lerin başarılı bir şekilde bağlanmasıyla sonuçlanmaktadır. Nanodetektrn yüzeyi spesifik tümör antikorları ile kaplanabilmektedir ve CTC'ler, immnositokimyasal veya moleküler analiz için elde edilebilmektedir. Cihaz biyoyumlu olup uygulama sonrası bilinen yan etkisi bulunmamaktadır (Saucedo-Zeni ve ark., 2012).

CTC izolasyonundan sonra lökositleri ortadan kaldırmak ve hücresel düzeyde CTC validasyonu için çeşitli CTC saptama stratejileri bulunmaktadır. CTC'lerin tespiti ve karakterizasyonu için iki temel yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar; protein bazlı ve nükleik asit bazlı yöntemlerdir. İmmünofloresan ve akış sitometrisi, protein bazlı CTC saptama ve karakterizasyon yöntemleridir. CTC'lerin protein bazlı tespitine yönelik en yaygın yöntem, antikor bazlı immnofloresandır. İmmnofloresansın avantajları, protein ekspresyonunun ve lokalizasyonunun görsel olarak doğrulanması, birden fazla proteinin eşzamanlı analizinin mümkün olması ve protein ekspresyonunun miktarının belirlenmesidir. Dezavantajları ise CTC'lere yönelik spesifik antikorların düşük hassasiyeti ve ticari olarak bulunabilirliğinin düşük olmasıdır. Akış sitometrisinde ise, floresan etiketli CTC'ler bir lazer ışığı ışınından geçirilerek hücrenin şekli, boyutu ve ayrımı ışık dağılımı ve floresana bağlı olarak tek bir hücre hakkında bilgi elde edilmektedir. Akış sitometrisinin avantajları, tek hücre düzeyinde çoklu belirteç

analizi, CTC'leri alt popülasyonlara ayırma olanağı ve yöntemin kullanılabilirliğidir. Öte yandan dezavantajları ise nadir CTC popülasyonlarına yönelik duyarlılığın düşük olması ve CTC'ler ile lökositler arasında ayırım yapılamamasıdır (Lowes, & Allan, 2018; Petrik ve ark., 2022).

Dizileme, RT-PCR, FISH tekniklerini içeren nükleik asitlere dayalı yöntemler, Moleküler Biyoloji alanında standarttır. Bu yöntemler, kanda CTC'lerin varlığını doğrulayabilen spesifik tümör transkriptlerini tespit etmeyi amaçlamaktadır. RT-PCR, hedef transkriptleri tespit etmek ve CTC'leri karakterize etmek için kullanılmaktadır. Örnek olarak, meme kanserinde HER2, ER (Estrogen Receptor) ve PR (Progesterone Receptor) durumunun belirlenmesi verilebilir. Bu yöntemlerin avantajı, CTC araştırması için gerekli olan düşük örnek miktarından birkaç genin aynı anda analiz edilebilmesidir. FISH, genlerdeki veya kromozomlardaki değişiklikleri analiz ederek CTC'leri tespiti ve karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Krebs ve ark., 2015). Dizileme, CTC karakterizasyonu için ideal bir yöntem olarak kabul edilmektedir çünkü genomik DNA ve cfDNA'yı kullanabilmektedir ve aynı anda çok sayıda hedef geni analiz edebilmektedir. Buna ek olarak, tek nükleotid seviyesindeki değişikliklerini de tespit edebilmektedir. Bu tür mutasyonlar farklı hastalık fenotiplerine yol açabilmektedir ve tedaviye verilen yanıtı değiştirebilmektedir. Dizilemenin dezavantajı, geçerli bir sonuç için en az 50 CTC olması gereklidir (Lowes, & Allan, 2018; Petrik ve ark., 2022).

2.2.4.3. Metastatik kolorektal kanser ve dolaşımdaki tümör hücreleri

CTC'lerin tümör metastazında önemli roller oynadığı iyi bilinmektedir (Gao ve ark., 2021). SK, non-metastatik KRK (nmKRK) ve mKRK hastalarını içeren çok kohortlu bir çalışmada, CTC'leri tespit etmek ve sayısını belirlemek için antikorla konjuge mikrokışkan cihaz ile neoplazmin ilerlemesi ve CTC arasındaki korelasyonu araştırılmıştır. Bu çalışmada yüksek CTC sayısının, nmKRK hastalarında tümörün ilerlemesi ve uzak bölgelere metastaz oluşumu ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Tsai ve ark., 2016).

Güncel literatürde CTC pozitiflik oranındaki farklılıklar çalışmalara dahil edilen hastaların klinik karakteristiklerine, uygulanan tedavi türüne ve basamağına göre değişmektedir (Tablo 3).

Çalışmalarda KRK'lı hastalarda CTC durumu ve tedavi basamağı ile ilişkisi tartışılmaktadır (Gorges ve ark., 2016; Lankiewicz, Zimmermann, Hollmann, Hillemann, & Greten, 2008). Tedaviye direnç durumunda ileri tedavi basamaklarında CTC pozitiflik oranları yüksek olmasına rağmen tedaviye cevap gösteren hastalarda ilk tedavi basamaklarında ise CTC tespit edilme oranları düşüktür. Gorges ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, KRK'lı hastaların ileri tedavi basamaklarında (>4. Basamak) CTC pozitiflik oranlarının, tedavinin ilk basamaklarında olan hastalara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Gorges ve ark., 2016).

Tablo 3. KRK hasta gruplarında AdnaTest yöntemi ile CTC analizi yapılan araştırmalar.

Referans	Hasta Sayısı	CTC Pozitiflik Oranı (%)	Tedavi Durumu (n)
Raimondi ve ark., 2014	40 mKRK	%81	Tedavi almamış (n=6) 1. Basamak (n=20); 2. Basamak (n=10); 3. Basamak (n=4)
Lankiewicz ve ark., 2008	34 mKRK	%59 %31	Kemoterapi öncesi Kemoterapi sonrası (3 ay)
Musella ve ark., 2015	38 mKRK	%47,4	Anti-EGFR tedavisi (n=38)
Gorges ve ark., 2016	47 mKRK	%30	1. Basamak (n=4); 2. Basamak (n=9); 3. Basamak (n=9); 4. Basamak (n=6); 5. Basamak (n=9); 6. Basamak (n=4); 7. Basamak (n=2); 8. Basamak (n=1)
Mourtzikou ve ark., 2012	8 mKRK ve 42 nmKRK	%38	Çalışmada kan örnekleri tedavi öncesi veya sonrası alınmıştır. Belirli bir oran ve detay verilmemiştir.
Vojtechova ve ark., 2016	9 mKRK ve 21 nmKRK	%11	Son medikal tedavinin tamamlanmasından en az 5 gün sonra ve cerrahi uygulama öncesi kan alınmıştır.

2.2.5. MiRNA'lar

Kısa ncRNAs sınıfı içinde en çok incelenen sınıfı miRNA'lardır. Bitkilerden hayvanlara kadar çeşitli organizmaların genomlarında kodlanmaktadır. MiRNA'lar, hedef mRNA'lara bağlanarak gen susturma ve translasyonel baskılamada rol oynayan kısa kodlama yapmayan RNA molekülleridir. Gen regülasyonundaki rolleri nedeniyle hücrel farklılaşma, proliferasyon, apoptoz ve gelişme gibi birçok fizyolojik süreçte yer almaktadırlar (Catalanotto, Cogoni, & Zardo, 2016; Vishnoi, & Rani, 2023; Wang, Young, & Srivastava, 2017).

İnsan genomu yaklaşık 2000 anote edilmiş miRNA genine sahiptir ve genomun %1-5'ini oluşturmaktadır (Kozomara, & Griffiths-Jones, 2011). İnsan miRNA'larının,

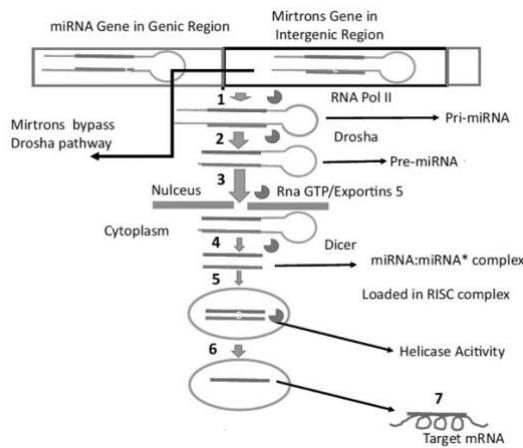
insan genomunda kodlama yapan genlerin yaklaşık %60'lık kısmının epigenetik olarak regüle ettiği bilinmektedir. Birden fazla miRNA aynı mRNA'yı hedeflediğinden, miRNA ile mRNA ekspresyonları arasında doğrusal bir korelasyon bulunmamaktadır (Saetrom ve ark., 2007).

MiRNA'ların gen anlatımını düzenlenmesi, biyolojik süreçlerdeki rollerinin yanı sıra kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarının gelişimi ve ilerlemesindeki rolleri açısından kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Vishnoi, & Rani, 2023). MiRNA'lar moleküler biyobelirteçlerin en umut verici sınıfını temsil etmektedir ve çeşitli hastalık modellerinde potansiyel terapötik ve prognostik öneme sahiptir (Catalanotto ve ark., 2016; Vishnoi, & Rani, 2023).

MiRNA'lar, yaklaşık 18-25 nt (nükleotid) uzunluğundadır. MiRNA'ların 5' ucunda bir üridin bulunur ve mRNA'ların 3' UTR (Untranslated Regions) bölgelerine kısmen tamamlayıcıdır. MiRNA'lar, Argonaute (AGO) proteinleri oluşturdukları kompleks ile tamamlayıcı bölgesine bağlanarak hedef mRNA'nın translasyonunun baskılanmasına, degradasyonu veya deadenilasyonuna yol açmaktadırlar (Wu, Fan, & Belasco, 2006).

2.2.5.1 MiRNA biyogenezi

İnsanlarda miRNA biyogenezi, nükleer ve sitoplazmik bölünmeden (clivage) oluşan iki aşamalı bir süreçtir (Şekil 12).



Şekil 12. İnsanlarda miRNA biyogenezi (Vishnoi, & Rani, 2023).

Çekirdekte miRNA'lar ya kendi promotörleri tarafından ya da konakçı genlerinin promotörlerini paylaşarak primary miRNA (pri-miRNA) adı verilen uzun bir transkript olarak kopyalanmaktadır (Lee, Jeon, Lee, Kim, & Kim, 2002). Transkripsiyon faktörleri, transkripsiyon başlangıç bölgesine (transcription start site) bağlanmaktadır ve gen transkripsiyonu hızlandırıcılar (enhancer), RNA polimerazın bağlanmasını kolaylaştırmaktadır (Dexheimer, & Cochella, 2020). Çoğu miRNA için RNA pol II'nin pri-miRNA transkripsiyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bunun nedeni, pri-miRNA'nın 1 kb'den (kilobase) uzun transkriptidir. Bu transkript, RNA pol III'den oldukça uzundur ve RNA pol III transkripsiyonunu sonlandıran üridin kalıntıları (residue) dizilerini içermektedir (Chen, Li, Lodish, & Bartel, 2004). Belirtilen özelliklere ek olarak, transkripsiyon başlangıç bölgesi genlerden uzakta yer almaktadır ve promotörler, RNA pol II'ye özgü özellikler içermektedir (Monteys ve ark., 2010). Pri-miRNA yaklaşık 3-4 kb boyutundadır ve 3' poli (A) kuyruğuna ve 5' şapka yapısına sahiptir. MiRNA'ların transkripsiyonel regülasyonu, bazen miRNA'nın pozitif veya negatif regülasyonunun kendi ekspresyonunu regüle ettiği kısaca geri bildirim döngüsü ile gerçekleştiği bilinmektedir (Martinez ve ark., 2008).

Pri-miRNA'nın nükleer bölünmesi Drosha Rnaz III endonükleaz tarafından gerçekleştirilmektedir. RNAaz III ailesi üyesi olan Drosha, endonükleaz aktivitesi ile pri-miRNA'yı keserek ~60-70 nt uzunluğunda öncül miRNA'ya (pre-miRNA) dönüştürmektedir (Lee ve ark., 2002). Rnaz III endonükleaz aktivitesine Drosha ve Pasha olarak da bilinen çift sarmallı RNA bağlayıcı protein DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Protein) aracılık etmektedir. Drosha enzimi pri-miRNA için katalitik bileşen olarak rol oynarken, DGCR8 proteini RNA molekülünü tanımaktadır (Romero-Cordoba, Salido-Guadarrama, Rodriguez-Dorantes, & Hidalgo-Miranda, 2014). Pre-miRNA, 5' fosfat ve 3' ucunda 2 nt çıkıntıya sahiptir (Lee ve ark., 2003). Pre-miRNA'lar, Exportin 5 ve Ran-GTP (Ras-related Nuclear Protein) etkileşimi yoluyla sitoplazmaya taşınmaktadır (Romero-Cordoba ve ark., 2014).

Sitoplazmadaki saç tokası (hairpin) şeklindeki pre-miRNA'lar ayrıca Rnaz III endonükleaz Dicer tarafından tekrar kesilmektedir. Kesim sonrası 22 nt uzunluğunda çift iplikli, kısa, olgun miRNA oluşmaktadır ve miRNA-miRNA kompleksi olarak bilinmektedir (Romero-Cordoba ve ark., 2014). Farklı biyolojik yollar, hücredeki miRNA miktarını düzenleyen Dicer enzimini düzenlemektedir. Birçok protein

etkileşimi aynı zamanda Dicer'in verimliliğini de etkilemektedir (Forman, Legesse-Miller, & Collier, 2008). TRBP (Human Immunodeficiency Virus Transactivating Response RNA Binding Protein) ve bir dsRNA bağlayıcı protein olan PACT (Protein Activator of Protein Kinase R), helikaz bağlanması yoluyla Dicer'in stabilitesini ve aktivitesini arttırmaktadır (Lee ve ark., 2003; Ma, MacRae, Kirsch, & Doudna, 2008; Romero-Cordoba ve ark., 2014). Ek olarak, Zc3h12a (Zinc-finger CCCH-type Containing 12A) olarak da bilinen MCP1P1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1-induced Protein 1), miRNA öncüsünü degrade etmektedir. MCP1P1, Dicer'in tersine çalışan, miRNA öncülünün loop bölgesini parçalayan ve bunun hızlı bozulmasına neden olan bir nükleazdır (Suzuki ve ark., 2011).

Çift iplikli pre-miRNA bir helikaz ile yaklaşık 20 nt uzunluğunda olgun tek zincirli miRNA'lara dönüşmektedir. Bu çift zincirden biri kılavuz zincir diğeri ise tamamlayıcı (komplementer) zincir olarak adlandırılmaktadır. Kılavuz zincir, çift iplikli RNA'ya bağlanan proteinlerin yardımıyla ATP bağımlı şekilde RISC (RNA-Induced Silencing Complex) kompleksine bağlanmaktadır (Romero-Cordoba ve ark., 2014; Sanghvi, & Steel, 2011). RICS yapısı Dicer, TRBP, Argonaute 2 proteini (Ago2) ve GW182 proteininden oluşmaktadır. GW182, Argonaute kararlılığını düzenlerken, Ago2 proteini ise endonükleaz aktivitesi ile hedef mRNA 3' UTR ucunda RISC kompleksinin stabil olmasını sağlayarak hedef mRNA'nın degradasyonundan sorumlu olan katalitik enzimlerdir. Ek olarak, Ago2, Dicer tarafından işlenmeden önce miRNA'nın 3' ucunu ayırmaktadır. Bu da olgun miRNA zincirinin belirlenmesine yardımcı olabilmektedir (Diederichs, & Haber, 2007; Romero-Cordoba ve ark., 2014; Sanghvi, & Steel, 2011).

Ek olarak, miRNA'ların olgunlaşması RLC (RISC Loading Complex) tarafından gerçekleştirilmektedir (Sanghvi, & Steel, 2011). Kılavuz zincir ile RICS yapısının birleşmesiyle oluşan bu susturucu kompleks hedef geni anlatımını baskılamaktadır. Genellikle tamamlayıcı zincir bu yapıya katılmaz ve parçalanır, fakat bazı çalışmalar tamamlayıcı zincirin parçalanmadığını ve kılavuz zincirle aynı seviyede anlatım yaptığını göstermiştir (Romero-Cordoba ve ark., 2014).

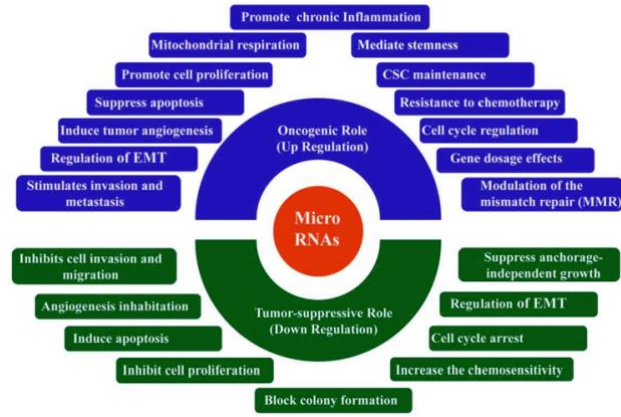
Hedef mRNA'nın miRNA tarafından tanınması, miRNA'nın korunmuş bölgesi tarafından belirlenmektedir. İnsan miRNA'lardaki gibi, bu korunmuş bölgedeki 2-8

kalıntı, transkripsiyon sonrası baskılamaya aracılık ettiği bilinen 3' UTR motiflerine tamamlayıcı olarak bağlanır (Romero-Cordoba ve ark., 2014; Vishnoi, & Rani, 2023).

2.2.5.2. MiRNA'ların fonksiyonu ve regülasyonu

MiRNA'lar hemen hemen tüm hücresel süreçlerde yer almaktadır. MiRBase veri tabanı güncel olarak *Homo sapiens* türüne ait 1917 pre-miRNA ve 2654 olgun miRNA'yı içermektedir (Gebert, & MacRae, 2019). Hücre proliferasyonu ve farklılaşması, hücre ölümü ve apoptoz, immün yanıt, viral replikasyon, homeostazis ve sirkadiyen ritim gibi önemli biyolojik yollarda rol oynamaktadır (Bartel, 2009; Chen, Liang, Zhang, Zen, & Zhang, 2012). MiRNA'lar, apoptoz ve doku hasarı durumunda hücreler arası iletişim amacıyla hücre dışına çıkmaktadırlar ve aktif veya pasif yolla dolaşıma geçmektedirler. Dolaşımdaki miRNA'lar; serbest, spesifik proteinlere bağımlı, lipoproteinlere ilişkili ve hücre dışı veziküllerde paketlenmiş halde olmak üzere 4 farklı formda bulunmaktadır. MiRNA'ların dolaşımda farklı proteinlerle ilişkili ya da hücre dışı veziküllerle taşınması, miRNA'ları endojen RNaz'ların parçalama etkisinden korumaktadır ve dolaşımdaki diğer biyobelirteçlere göre daha stabil kılmaktadır (Rapado-Gonzalez ve ark., 2019).

MiRNA'lar tümör gelişimi, ilerlemesi ve metastaz dahil olmak üzere çeşitli moleküler sürecin başlatılmasında ve geliştirilmesinde önemli ölçüde rol oynamaktadır (Ding ve ark., 2018; Vafaee ve ark., 2018). Kansere sürecinde yer alan miRNA'lar düzenleyici rollerine göre ,tümör baskılayıcı miRNA'lar ve onkomiR olarak iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 13). Bu kapsamda, dolaşımdaki miRNA ekspresyonları primer tümörün veya metastatik lezyonun miRNA profilini yansıtabilir ve girişimsel olmayan yaklaşımlarla farklı evrelerde tümör tespitine olanak sağlayabilmektedir (Ding ve ark., 2018; Dogan, Gumusoglu, Ulgen, Sezerman, & Gunel, 2022; Gumusoglu-Acar ve ark., 2023; Zhang, Hu, Du, & Du, 2021).



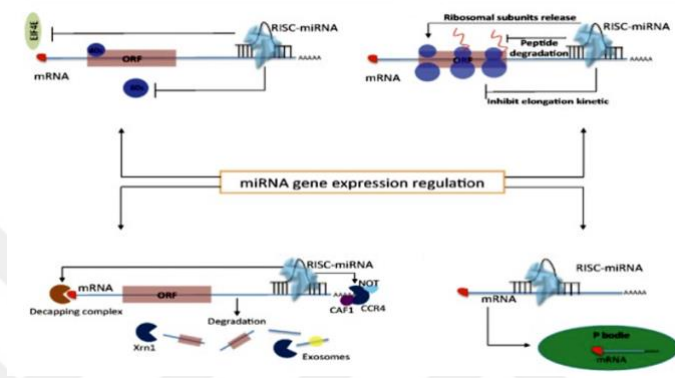
Şekil 13. Kanserle ilişkili miRNA'ların tümör baskılayıcı ve onkogenik rolleri (Ding ve ark., 2018).

Son zamanlarda, plazma ve kan hücreleri de dahil olmak üzere tam kandan elde edilen miRNA'ların, farklı kanser türlerinin erken tespiti için biyobelirteçler olduğu rapor edilmiştir (Wen ve ark., 2019; Gyoba, Shan, Roa, & Bedard, 2016). Beyaz kan hücreleri (nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, monositler ve lenfositler) dahil olmak üzere tam kanda bulunan hücrelerden kaynaklanan miRNA'ların, bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hastaların fizyolojik ve patolojik durumunu izleme potansiyelleri yüksektir (Frampton ve ark., 2013). Tam kan miRNA analizinin avantajları şunlardır: Yüksek miRNA verimi elde edilmesi, metodolojik olarak serum veya plazma örneklerine göre daha az hata oranı ile saptanması ve ekstrasellüler sıvı, kan hücreleri, CTC'ler ve tümör dokuları gibi çeşitli kaynaklara özel miRNA profillerinin tespit edilebilir olmasıdır. Bu nedenle, tam kandaki miRNA'lar serum, plazma veya beyaz kan hücrelerindeki miRNA'lardan daha kapsamlı bilgi sağlamaktadır (We ve ark., 2019).

MiRNA'ların hedef mRNA'ları regüle etme mekanizmaları farklı şekillerde olabilmektedir. miRISC yapısı hedef mRNA'ları negatif olarak düzenlemek için tamamlayıcılık (complementarity) kurallarına dayalı olarak mRNA hedeflerini tanımayaya yönelik bir kılavuz olarak işlev görmektedir. Bu işlem sırasında, RNA klevaj (cleavage) aktivitesine sahip bir protein olan Ago2, PABP [Poly (A) – binding Protein], PAN2-PAN3 ve CCR4-NOT (Carbon Catabolite Repressor 4-Negative on TATA) deadenilaz ile etkileşime giren GW182 ile önemli bir rol oynamaktadır (Eulalio, Huntzinger, & Izaurralde, 2008; Hutvagner, & Simard, 2008; Romero-

Cordoba ve ark., 2014). MiRNA'ların gen ekspresyonunu baskılanmasına aracılık ettiği 4 farklı mekanizma bulunmaktadır (Şekil 14):

- i. Translasyon baskılanması ile regülasyon,
- ii. Ribozom alt ünitelerinin salınımı ile regülasyon,
- iii. mRNA degradasyonu ile regülasyon,
- iv. P cisimciği ile mRNA hedeflerinin bozulması veya P cisimciğinde depolanması ile regülasyon.



Şekil 14. MiRNA'ların post-transkripsiyonel mRNA düzenlenme mekanizmaları (Romero-Cordoba ve ark., 2014).

2.2.5.3. Metastatik kolorektal kanser ve miRNA'lar

MiRNA'lar, KRK proliferasyonu, metastaz, anjiyogenez, otofaji, apoptoz ve kemoradyoterapide sistematik bir rol oynamaktadır. Buna ek olarak, Wnt/ β -katenin, PI3K/AKT/mTOR, Notch, Hippo ve ERK-MAPK gibi biyolojik yolları düzenlemektedir (Zhang ve ark., 2021). Literatürde çeşitli miRNA'lar mKRK ile ilişkilendirilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. KRK metastazında rol oynayan çeşitli miRNA'lar ve anlatımları (Zhang ve ark., 2021).

MiRNA	Anlatım
hsa-miR-107, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-145, hsa-miR-148a, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-200, hsa-miR-204, hsa-miR-206, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-302a, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-330, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-520e, hsa-miR-708, hsa-miR-873-5p	Azalmış
hsa-miR-191, hsa-miR-20a/ hsa-miR-106a, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-32-5p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-6716-5p	Artmış

EMT, kanser hücrelerinde ektopik bölgelere göç ederken görülebilen temel bir gelişimsel düzenleme sürecidir ve miRNA'lar tarafından düzenlenebilmektedir (Zhang ve ark., 2021). MiRNA'lar, E-Cadherin, N-Cadherin, ZEB, SNAIL1 (Snail Family Transcriptional Repressor 1) ve TWIST1 gibi EMT transkripsiyon faktörlerini

düzenleyerek, KRK dahil olmak üzere invazyonu ve migrasyonu teşvik veya inhibe edebilmektedir. Hsa-miR-141-3p'nin *EGFR*'yi hedef alarak, E-Cadherin, N-adherin, SNAIL ve Vimentin seviyesini değiştirdiği saptanmıştır (Ning, Wang, Zhang, & Wang, 2019; Vu, & Datta, 2017). KRK metastazını ilerleten hsa-miR-6716-5p'nin, NAT10'u inhibe ederek E-Cadherini baskıladığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2019). *ZEB1*, kanser hücrelerinde EMT'yi indükleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Zhang ve ark., 2021; Zhang, Sun, & Ma, 2015). *ZEB1*, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-708 ve hsa-miR-873-5p'nin hedefidir ve bu miRNA'ların yakın zamanda KRK metastazında rol oynadığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2019; Li ve ark., 2018; Sun ve ark., 2019). Hsa-miR-708, AKT/mTOR yoluyla aracılığıyla *ZEB1*'i baskılayabilmektedir. Hsa-miR-708 ve hsa-miR-873-5p KRK'nin invazyonunu ve migrasyonunu engelleyebilmektedir. hsa-miR-186-5p, KRK dokularında normal dokulara kıyasla daha az eksprese olur ve anlatımının azalmasıyla, *ZEB1*'i hedef alarak KRK göçünü ve istilasını arttırmaktadır (Li ve ark., 2019; Li ve ark., 2018; Sun ve ark., 2019). MMP'ler, memelilerde 24 üyeli bir aile oluşturan çinko bağımlı endopeptidaz ailesidir ve uzun süredir kanser hücrelerinin göçü ve metastazı ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir (Vandenbroucke, & Libert, 2014; Zhang ve ark., 2021). MMP'ler ayrıca invazyonla ilişkili proteinler (invasion-associated protein) olarak da bilinmektedir. hsa-miR-139-5p'nin *MMP-9* (Matrix Metalloproteinase-9) ve *MMP-7*'yi (Matrix Metalloproteinase-7) baskıladığını ve hsa-miR-301a-3p'nin *MMP-2* (Matrix Metalloproteinase-2) ve *MMP-9*'un anlatımını arttırdığı saptanmıştır (L. Zhang ve ark., 2014; Zhang, ve ark., 2019; Zhu ve ark., 2019).

Özetle, güncel çalışmalar mKRK'nin klinik yönetiminde likit biyopsinin umut verici rollerini doğrulamıştır. Geçtiğimiz yıllarda, mKRK'de likit biyopsi ile tespit edilen çeşitli biyobelirteçlerin, metastaz tanısı, prognoz tahmini ve tedavi yanıtının izlenmesi dahil olmak üzere birçok alanda potansiyel olarak yararlı olduğu bulunmuştur. Ancak, bu biyobelirteçlerin mKRK'de ve diğer kanserlerde pratik klinik uygulamaları çok sınırlıdır. Bunun nedenlerinden biri, bu biyobelirteçlerin potansiyel uygulamalarına ilişkin çalışmaların çoğunun küçük gruplara sahip olmasıdır. Bu nedenle, bu likit biyopsi bazlı biyobelirteçlerin klinik senaryolarda uygulanması için kapsamlı, çok merkezli ve prospektif validasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır (Gao ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnekler

mKRK hastalarında CTC durumu ve miRNA ekspresyonları arasındaki ilişkinin araştırıldığı tez çalışmasının gerçekleştirilmesi için Bursa Uludağ Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (26.11.2021 tarihli Etik Kurul Karar No: 2011-KAEK-26/681) etik kurul onayı alınmıştır. Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından Öncelikli Alan Araştırma Projesi (Proje Kodu: FOA-2021-625) olarak "Metastatik Kolorektal Kanserde Dolaşımdaki Tümör Hücreleri Durumuyla İlişkili Aday Biyobelirteçlerin Araştırılması" başlıklı projemiz desteklenmiştir.

Tez çalışmasına destek veren ve araştırma kapsamında örnek toplama işlemleri Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalına ve İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. İlgili kliniklere başvuran mKRK hastaları ve SK arasında araştırmaya gönüllü olarak katılmak isteyen bireylerin kan örnekleri olmak üzere 2 araştırma grubuyla çalışılmıştır. Araştırmaya katılan tüm gönüllülere araştırmaya katılmaya razı olduklarını bildiren yazılı bilgilendirilmiş onam formları imzalatılmıştır. Ek olarak, örnek takip listesi oluşturularak tüm örneklerin gerekli klinik bilgileri kayıt altına alınmıştır.

Tez çalışmasında ilk olarak 48 mKRK'lı hasta örneğinde CTC analizi yapılmıştır. Daha sonra, bu hasta gönüllülerden CTC durumlarına göre belirlenmiş iki gruptan [(CTC (+), CTC (-)] 8 örnek ile SK olarak seçilmiş 8 gönüllüden kan örnekleri alınarak mikroarray yöntemi ile miRNA profillemesi gerçekleştirilmiştir. SK grubu herhangi bir kanser öyküsü, şüphesi ve şikayeti olmayan hasta gönüllülere yaş aralığıyla uyumlu 18 yaş üstü herhangi bir kronik hastalığa sahip olmayan bireylerden oluşmaktadır. Hasta grubu için ilgili kliniklere mKRK tanısı ile başvuran 18 yaş üstü gönüllüler dahil edilmiştir. Ek olarak, çalışmaya dahil edilen hastalardan örnek cerrahi tedavi uygulanmadan önce veya en son medikal tedavi üzerinden en az 5 gün geçmiş olma şartı ile alınmıştır.

SK'lerin yaş, boy, kilo, ailede kanser öyküsü, ek hastalık, sigara ve alkol kullanımı gibi gerekli bilgileri toplanmıştır. Hasta gönüllülerin ise yaş, boy, kilo, sigara ve alkol kullanımı, ilk tanı tarihi, örnek alınmadan öncesi aldığı kür sayısı, en son tedavi tarihi, tümör lokasyonu, tümör histolojik tipinin yanı sıra evre, metastaz yeri, CEA düzeyi, KRAS durumu, ek hastalık ve tedavi türü bilgileri de kayıt altına alınmıştır.

Araştırmamıza gönüllü olarak katılan SK'den Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)'lı kan toplama tüplerinde (10ml) kan örnekleri toplanmıştır. Hasta gönüllülerden ise çalışmamızda uygulanacak 2 farklı yöntemin hassasiyeti doğrultusunda BD Vacutainer ACD-A (Anticoagulant Citrate Dextrose Solution A) tüpünde 8,5ml ve EDTA'lı kan toplama tüplerinde yaklaşık 7-8ml olmak üzere her hastadan yaklaşık 16-17ml kan örneği toplanmıştır. Toplanan kan örnekleri ivedi bir şekilde soğuk zincir ile laboratuvara ulaştırılarak 4 saat içinde AdnaTest yöntemi için işleme alınmıştır veya üretici firmanın önerisi üzerine maksimum 30 saat 4°C'de muhafaza edilerek analiz edilmiştir. Örnekler, gerekli etiketleme işlemi yapılarak RNA izolasyonuna hazır şekilde -20°C'de saklanmıştır.

3.2. Total RNA İzolasyonu

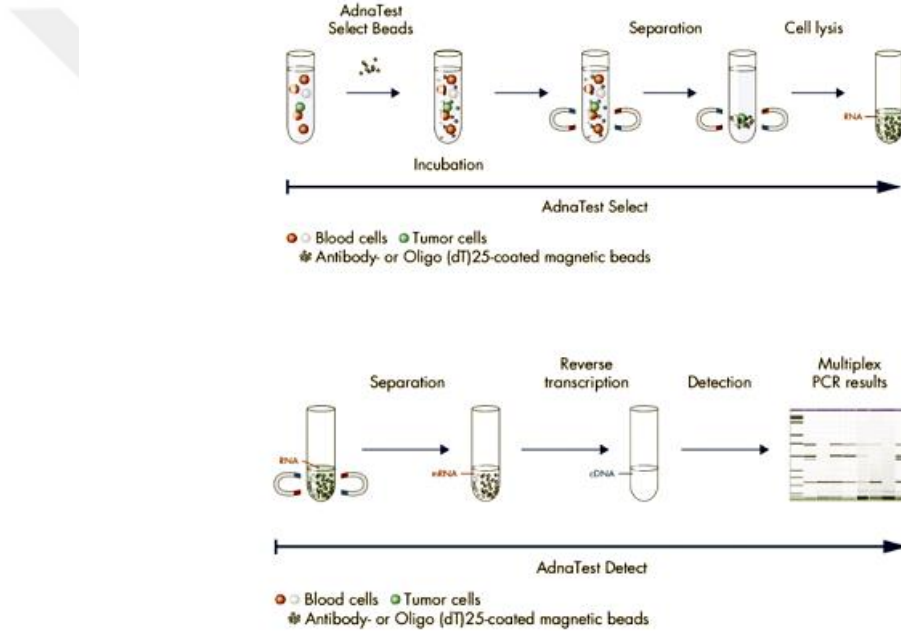
Kan örneklerinden total RNA izolasyonu miRNeasy Serum/Plazma Advanced kiti (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) ile firmanın önerdiği protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında başlangıç miktarı 600ul ve elue edilen RNA miktarı ise 30ul'dir

Sağlıklı ve hasta örneklerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyonunu ölçmek için her bir örnekten 2µl alınarak Qubit™ RNA High Sensitivity (HS) assay ile Qubit 4 Fluorometer cihazında ölçüm yapılmıştır ve sonuçlar kaydedilmiştir.

İkinci aşama olarak, total RNA'ların yoğunluk, saflık ve RIN değerleri (RNA Integrity Number) saptamak için Small RNA ve RNA 6000 Nano Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) kullanılmıştır. Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) cihazında Agilent 2100 Expert Software hesaplanmıştır. Bu analizlerden sonra mikroarray analizine uygun kalitedeki örneklerle mikroarray çalışması gerçekleştirilmiştir.

3.3. AdnaTest Protokolü

Tez kapsamında hasta bireylerden BD Vacutainer ACD-A tüplerinde toplanan periferik kan örneklerinde CTC analizi gerçekleştirilmiştir. Tümör hücrelerini immünomanyetik temelli ve kolon-spesifik belirteçlere göre tespit eden AdnaTest ColonCancer teknolojisi kullanılmıştır. AdnaTest yöntemi 2 aşamadan (periferik kandan CTC zenginleştirilmesi ve Multipleks PCR yöntemiyle tümör ile ilişkili mRNA analizi) oluşmaktadır. SK kan örneklerine bu işlem uygulanmamıştır. Şekil 15'te AdnaTest protokolü detaylı şekilde gösterilmiştir.



Şekil 15. Dolaşımdaki tümör hücrelerinin analizleri için gerçekleştirilen AdnaTest Select ve AdnaTest Detect protokollerinin aşamaları.

3.3.1. Tümör hücresi seçimi

Periferik kandan CTC zenginleştirilmesinde AdnaTest EMT-2/StemCell Select kiti kullanılarak CTC'lerin immünomanyetik temelli yöntemle zenginleştirilmesi sağlanmıştır. Bu kit, epitelyal ve tümör ile ilişkili antijenlere spesifik tasarlanmış antikorlarla işaretlenmiş manyetik boncukları (ColonSelect Beads) ve AdnaTest Lysis/Binding tamponunu içermektedir. AdnaTest EMT-2/StemCell Select kitinde

tümör hücrelerinin ayrımı için kullanılacak manyetik boncuklarla konjuge edilen antikolar; EpCAM, Her2 ve EGFR'dir. Örneklerde CTC zenginleştirme hassasiyetini arttırmak için ve kan hücresi kontaminasyonunu önlemek için literatürde de birçok AdnaTest çalışmasında kullanılan AdnaWash Leukocyte Reducer tamponu örneklerle uygulanmıştır. AdnaTest prosedürüne göre tümör hücreleri spesifik antikolarla işaretlenmiş manyetik boncuklarla inkübe edilmiş ve işaretlenmiştir. İşaretlenmiş hücreler manyetik boncuk ayırıcılar (AdnaMag-L ve AdnaMag-S) ile izole edilerek hücre lizatları oluşturulmuştur. Bu işlemin ardından hücre lizatları hemen veya üretici firmanın önerisine göre en fazla 2 hafta -20°C 'de muhafaza edilerek AdnaTest yönteminin sonraki aşamasında kullanılmıştır. Bu aşamadaki uygulanan prosedürler üretici firmanın önerdiği tümör hücrelerinin seçimi ve zenginleştirme protokollerinin aşamaları gerçekleştirilmiştir.

AdnaTest EMT-2/StemCell Select kiti ile hazırlanan hücre lizatlarından Oligo(dT)₂₅ boncuklar aracılığıyla mRNA izolasyonu sağlanmıştır. Elde edilen mRNA'lardan üretici firmanın önerdiği protokol takip edilerek Sensiscript RT (Reverse Transcription) kiti (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) ile PCR cihazında cDNA (complementary DNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda negatif kontrol (RT Kontrol) için RNaz içermeyen su kullanılmıştır. Elde edilen cDNA'ları içeren reaksiyon tüpleri buzda muhafaza edilerek veya üretici firmanın önerisine göre en fazla 4 hafta -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Sensiscript RT Kit ile RT aşamasının reaksiyon koşulları Tablo 5'teki gibidir. Daha sonra moleküler karakterizasyon için Multiplex PCR protokolüne geçilmiştir.

Tablo 5. Sensiscript Reverse Transcription kiti ile gerçekleştirilen ters transkripsiyon reaksiyon koşulları.

Aşama	Süre	Sıcaklık
RT	60 dakika	37°C
Denatürasyon	5 dakika	93°C
Soğuma	∞	4°C

3.3.2. Tümör hücresi ayrımı

İkinci aşama olan Multiplex PCR yöntemi ile tümör ile ilişkili mRNA analizinde ise AdnaTest ColonCancer Detect kiti kullanılarak kolon kanseri spesifik CTC'ler tespit edilmiştir. Bu kit Oligo(dT)₂₅ boncukları, AdnaTest Lysis/Binding

tamponu, RNA saflaştırma solüsyonları, Tris-HCL tamponu (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) ile PCR reaksiyonu için AdnaTest PrimerMix ve AdnaTest pozitif kontrolünü içermektedir. AdnaTest PrimerMix içeriğinde kolon-spesifik mRNA belirteçlerine (*CEA*, *EGFR*, *EpCAM*) ve internal PCR kontrolü olarak kullanılacak olan β -*Aktin* genine ait primerler bulunmaktadır.

Multipleks PCR aşaması tümör ilişkili gen ekspresyonlarının analizi için yapılmıştır. Bu aşamada, AdnaTest PrimerMix, β -*Aktin* geni primeri, HotStarTaq Master Mix ve cDNA örneklerimiz kullanılarak bu aşama gerçekleştirilmiştir. Multipleks PCR aşamasının reaksiyon koşulları Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6. Kolon kanseri spesifik mRNA analizleri için gerçekleştirilen Multipleks PCR reaksiyon koşulları.

Aşama	Süre	Sıcaklık
Aktivasyon	15 dakika	95°C
Denatürasyon	45 saniye (38 döngü)	94°C
Bağlanma	45 saniye (38 döngü)	58°C
Uzama	45 saniye (38 döngü)	72°C
Son Uzama	10 dakika	72°C
Soğuma	∞	4°C

Multipleks PCR yöntemi ile elde edilen PCR ürünleri %3'lük Etidyum bromür ile boyanmış, SYBR Safe boya kullanılmış agaroz jel elektroforezinde yürütülerek fragman analizi yapılmıştır. Bu aşamadaki uygulanan prosedürler üretici firmanın önerdiği protokol takip edilmiştir.

Jel elektroforez sonuçlarında *CEA*, *EGFR* ve *EpCAM* genlerinden en az birine ait fragman tespit edildiğinde örnekler CTC pozitif [CTC (+)], hiçbir fragman tespit edilmeyen örnekler ise CTC negatif [CTC (-)] olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, CTC ayrımı ve moleküler karakterizasyonun başarılı bir şekilde yapıldığının değerlendirilmesinde;

- Jel elektroforezinde, internal kontrol olan β -*Aktin* geninin tüm örneklerde saptanması örneklerden hücre izolasyonunun başarılı olduğunu göstermektedir.
- Jel elektroforezinde AdnaTest pozitif kontrolünde 4 gene (*CEA*, *EGFR*, *EpCAM* ve β -*Aktin*) ait bandın gözlenmesi, Multipleks PCR aşamasının başarılı gerçekleştiğini göstermektedir.
- Negatif kontrol ve RT kontrolünün 80 bazdan büyük (primer dimerleri dışında) bandın gözlenmemesi ve genomik DNA kontaminasyonunu işaret edebilecek 1 kb'dan büyük bantların gözlenmemesi ölçütleri de göz önüne alınmaktadır.

3.4. MiRNA Mikroarray Yöntemi

Tez çalışması kapsamında SK ve AdnaTest sonuçlarına göre CTC (+) mKRK ve CTC (-) mKRK olarak hasta grupları olmak üzere 3 grup mikroarray uygulamasına dahil edilmiştir. MiRNA mikroarray uygulaması araştırma kapsamında, her bir gruptan 8 örnek olmak üzere toplamda 24 örneğe Agilent miRNA mikroarray platformu (SurePrint Human G3 Unrestricted miRNA 8x60K) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) ile miRNA profillemesi yapılmıştır. Örneklerde SureScan Microarray Scanner (Agilent, Santa Clara, CA, USA) ile miRNA taraması yapılarak bilinen tüm miRNA transkriptlerinin anlatım seviyeleri incelenmiştir. MiRNA Complete Labeling & Hybridization Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) mikroarray protokolü takip edilmiştir. Bu protokolde başlangıç materyali olarak 100ng total RNA kullanılmaktadır ve RNA molekülünün 3' ucuna bir Siyanin 3-pCp molekülünün eklenmesiyle floresan işaretli miRNA üretilmektedir. Mikroarray aşamaları Şekil 16'da gösterilmiştir. MiRNA mikroarray basamakları aşağıdaki gibidir:

1. Örnek Hazırlığı ve Etiketleme

Bu aşama spike-in solüsyonu hazırlama, örneklerin defosforillemesi, örneklerin denatürasyonu, ligasyon, etiketlenmiş RNA'ların pürifikasyonu ve örneklerin kurutulması basamaklarından oluşmaktadır.

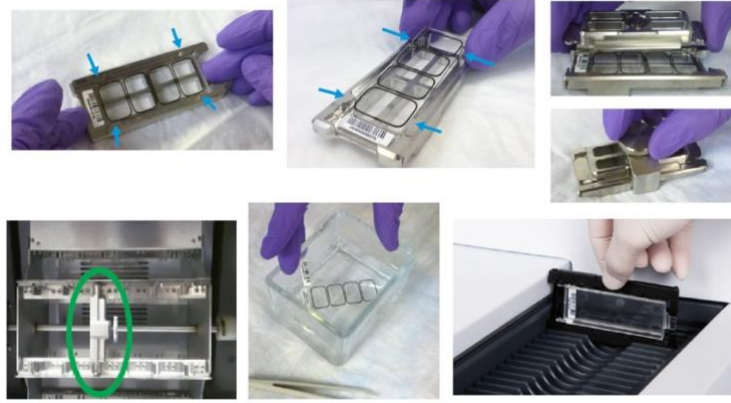
2. Mikroarray Hibridizasyonu

Bu basamak 10x Blocking Agent hazırlanması, hibridize edilecek örneklerin hazırlanması, hibridizasyon için kurulum ve hibridizasyon kısımlarından oluşmaktadır.

3. Yıkama

4. Tarama ve Verileri Analiz Etme

Oluşturulan ham veri Agilent Feature Extraction (v.12.2.0.7) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) yazılımı ile kalite kontrol aşamasından geçirilip ve GeneSpring GX (v.14.9) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) yazılımı ile veri analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 16. Agilent miRNA mikroarray platformu ile miRNA mikroarray yönteminin farklı aşamaları.

3.5. Veri Analizi

3.5.1. DEM analizi

Mikroarray veri analizi GeneSpring GX (v.14.9) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda karşılaştırılan gruplar arasında [Fold Change (FC)] ≥ 2 veya ≤ -2 , ve $p < 0,05$ olan miRNA'lar istatistiksel olarak anlamlı DEM olarak kabul edilmiştir. Tüm gruplar önce ikişerli ardından üçerli olmak üzere 5 farklı şekilde miRNA'ların ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir:

- CTC (+) ve CTC (-)
- CTC (+) ve SK
- CTC (-) ve SK
- mKRRK [CTC (+)&CTC (-)] ve SK
- CTC (+) ve CTC (-) ve SK (Üçlü Analiz)

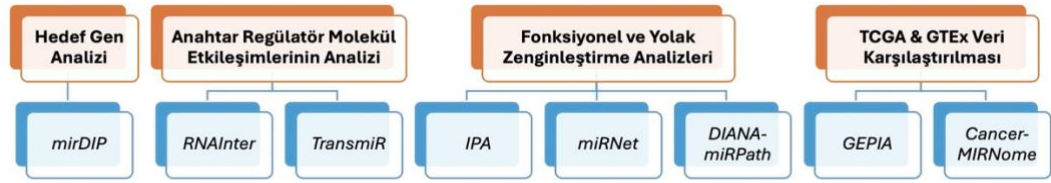
3.5.2. İstatistiksel analizler

Mikroarray çalışmasına dahil edilen iki grubu karşılaştırırken; istatistiksel analizlerinden Moderate t Test ve Multiple Testing Correction Method: No Correction ($p < 0,05$ ve $FC \geq 2$ veya ≤ -2) testini geçen anlamlı DEM'ler belirlenmiştir. Yapılan analizlerde her bir grup için heatmap, clustering yanı sıra volcano plot, box-plot, mVa (Missing Value Analysis) plot, scatter plot gibi farklı raporlamalar yapılmıştır. Üçlü grup değerlendirilmelerinde ise ANOVA (Analysis of Variance) testi uygulanmıştır.

Post-Hoc olarak herhangi bir seçim yapılmamıştır. Yapılan üçlü grup analizinde sadece heatmap ve clustering raporları oluşturulmuştur. Yapılan tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.5.3. Biyoinformatik analizler

Araştırmamızda mikroarray sonucu anlamlı bulunan DEM'lerin biyoinformatik analizlerinde farklı veri tabanları ve lisanslı bir yazılım kullanılmıştır (Şekil 17). Potansiyel biyobelirteç özelliği gösteren DEM'lerin hedef genleri, biyolojik yolları, regülatör transkripsiyon faktörleri, ilişkili olduğu lncRNA'lar tespit edilmiş ve fonksiyonel analizleri yapılmıştır. Ek olarak, tüm DEM grubunda yer alan miRNA'lar ve hedef genleri The Cancer Genome Atlas (TCGA) ve (Genotype-Tissue Expression) GTEx veri tabanları ile kıyaslanmıştır.



Şekil 17. Diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA'ların biyoinformatik analizleri ve kullanılan araçlar.

3.5.3.1. Hedef gen analizleri

DEM'lerin hedef genleri mirDIP (MicroRNA Data Integration Portal) veri tabanında araştırılmıştır (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>). mirDIP, 30 farklı algoritma değerlendirilerek yaklaşık 152 milyon insan miRNA-hedef etkileşimini belirli bir skorlama yöntemi ile kullanıcılara sağlamaktadır. Ayrıca, ilgili veri tabanı 200'den fazla miRNA'nın aynı anda analizini sağlamaktadır (Tokar ve ark., 2018). Ek olarak, DEM gruplarına ait ortak hedeflenen genlere ait TCGA ve GTEx verilerinde ekspresyon analizi GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (<http://gepia.cancer-pku.cn/>). GEPIA, RNA dizileme verilerinde standart bir pipeline ile TCGA ve GTEx veri tabanlarından alınan 9736 tümör ve 8587 kontrol örneğine dayanan gen ekspresyonu analizine yönelik bir web aracıdır (Tang ve ark., 2017). Ek olarak, veri setlerinde ekspresyon analizlerinde

anlamli bulunan hedef genlerin patolojik evre (pathological stage plot) ve OS analizleri de tamamlanmifstir.

3.5.3.2. DEM'lerin ileri analizleri

DEM'lerin TF (transcription factors) ile arasindaki regulator iliskileri TransmiR veritabanı (v.2.0) ile belirlenmistir (<https://www.cuilab.cn/transmir>). TransmiR, literatürde derlenmis kaynaklardan veri alarak UCSC (University of California, Santa Cruz) genom tarayicisindan TF baglama motiflerini cikarmaktadir. Ek olarak, ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing) ve transkriptom calismalarindan elde edilen deneysel verileri içermektedir (Tong, Cui, Wang, & Zhou, 2019). TransmiR'deki analizler, en guclu filtreleme kullanilarak hipergeometrik testle gerceklestirilmistir ve p degeri Bonferroni ve Benjamini-Hochberg yontemi (False Discovery Rate, FDR) kullanilarak hesaplanmistir.

DEM'lerin iliskili olduğu lncRNA'lar ise RNAInter (RNA Interactome Database) (v.4.0) veritabanı ile tespit edilmiştir (<http://www.rnainter.org>). RNAInter veri tabanının son versiyonunda literatürdeki güncel verilerin yanı sıra doku/hücre türlerini de entegre edilerek yeni bir puanlama sistemi oluşturulmuştur (Kang ve ark., 2022).

3.5.3.3. DEM'lerin yolak, fonksiyonel ve zenginleştirme analizleri

DEM'lerin moleküler yollardaki rolleri miRNet (v.2.0) veri tabanı ile arastirilmistir (<https://www.mirnet.ca>). miRNet, miRNA'ların KEGG ve GO moleküler yolak kategorilerine göre zenginleştirme analizlerini saglamaktadir (Chang, Zhou, Soufan, & Xia, 2020). BP (Biological Process), CC (Cellular Component) ve MF (Molecular Function) alt kategorileri ile GO, DEM'lerin zenginlestirilme analizini saglamaktadir.

Bununla birlikte, DEM gruplarında yer alan miRNA'ların KEGG yolak zenginleştirme analizlerinde DIANA-miRPath (v.3.0) veri tabanı kullanılmıştır (<http://www.microrna.gr/miRPathv3>). Güncellenmiş miRPath web sunucusu hipergeometrik dagilimleri, tarafsiz ampirik dagilimleri ve/veya meta-analiz

istatistiklerini kullanarak bir veya daha fazla miRNA'nın işlevsel açıklamasını mümkün kılmaktadır (Vlachos ve ark., 2015).

Ek olarak, miRNA'ların fonksiyonel zenginleştirme analizleri lisanslı bir yazılım olan IPA (Ingenuity Pathway Analysis) yazılımı (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) ile tamamlanmıştır. IPA biyomoleküllerin downstream etkilerinin tahmin edilmesini ve görselleştirilmesini, yeni hedef veya aday biyobelirteçlerin belirlenmesini sağlayarak karmaşık-omik verilerinin anlaşılmasını kolaylaştıran bir yazılımdır. Tez çalışması kapsamında "Disease & Functions" analiz seçeneği ile ilişkili olduğu hastalıklar ve fonksiyonel rolleri belirlenmiştir.

3.5.3.4. DEM'lerin TCGA verileri ile karşılaştırılması

DEM gruplarına ait miRNA'ların TCGA veri tabanına ait COAD (Colon Adenocarcinoma) (hasta dokusu n=444, normal doku n=8) ve READ (Rectum Adenocarcinoma) (hasta dokusu n=161, normal doku n=3) veri setlerindeki RNA dizileme verileri ile CancerMIRNome veri tabanında karşılaştırılmıştır (<http://bioinfo.jialab-ucr.org/CancerMIRNome>). CancerMIRNome, 33 TCGA projesinden 10.554 örneğe ve 40 miRNome veri kümesinden 28.633 örneğe dayanan miRNA anlatım profillerinin etkileşimli analizi ve görselleştirilmesi için kapsamlı bir veri tabanıdır. CancerMIRNome veri tabanı birden fazla kanser türünde ilgilenilen bir miRNA'nın pan-kanser analizi ve tanısal veya prognostik potansiyellerini belirlemek için miRNome profillerinin kapsamlı analizi için biyoinformatik araçları ve makine öğrenmesi algoritmalarını kullanmaktadır (Li ve ark., 2022).

4. BULGULAR

4.1. Örnekler

Araştırma kapsamında uygun örneklerin belirlenmesi ve kan alım işlemleri Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı ve Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda 48 mKRK hasta ve 50 SK grubuna ait kan örnekleri toplanmıştır. Tez çalışmasında kullanılan mKRK ve SK örnek gruplarının klinik özellikleri Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Tez çalışmasına dahil edilen örnek gruplarının klinik özellikleri.

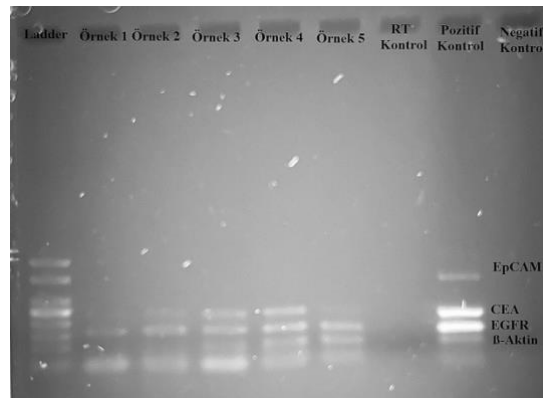
Klinik Özellikler	mKRK (n=48)	SK (n=50)
Cinsiyet	34 Erkek (%70,8)	17 Erkek (%34)
Yaş Ortalaması	59,375 (37-74)	34,04 (21-56)
BMI (kg/m ²)	26,6	22,9
Sigara	30 (+) (%62,5)	17 (+) (%34)
Alkol	-	16 (+) (%32)
Histolojik Tip		
Kolon Adenokarsinoma	34 (%70,8)	
Rektum Adenokarsinoma	10 (%20,8)	
Diğer	4 (%8,4)	
Lokasyon		
Sigmoid Kolon	20 (%41,7)	
Rektosigmoid Kolon	12 (%25)	
Rektum	8 (%16,7)	
Sağ Kolon	4 (%8,3)	
Diğer	4 (%8,3)	
Metastaz Bölgesi		
Karaciğer	39 (%81,25)	
Karaciğer + Akciğer	3 (%6,25)	
Akciğer	2 (%4,2)	
Diğer	4 (%8,3)	
KRAS Durumu		
Wild Tip	24 (%50)	
Mutant Tip	20 (%41,7)	
Belirlenmeyen	4 (%8,3)	
Kür Sayısı		
0	3 (%6,25)	
1-5	23 (%48)	
6-10	10 (%21)	
11-20	3 (%6,25)	
21-30	1 (%2)	
31-40	3 (%6,25)	
41-50	5 (%10,25)	

4.2. Örneklerin Kalite Kontrolü

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonunu ölçmek için Qubit 4 Fluorometer cihazı ve kalite kontrolü için Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı kullanılmıştır. İlk olarak, Qubit ölçümü örneklerden 2ul alınarak yapılmıştır ve örneklerde konsantrasyon aralığı 16ng/ul–Too High (>100ng/ul) şeklinde bulunmuştur. Daha sonra, Small RNA kit ile total RNA'ların konsantrasyonları değerlendirilmiş, miRNA bölgesinde istenilen pik görülen örnekler daha sonra RNA 6000 Nano kit ile RIN değerleri belirlenmiştir. Analizi yapılan örnekler yurtdışında ilgili firma ile görüşülerek mikroarray çalışması için seçilmiştir.

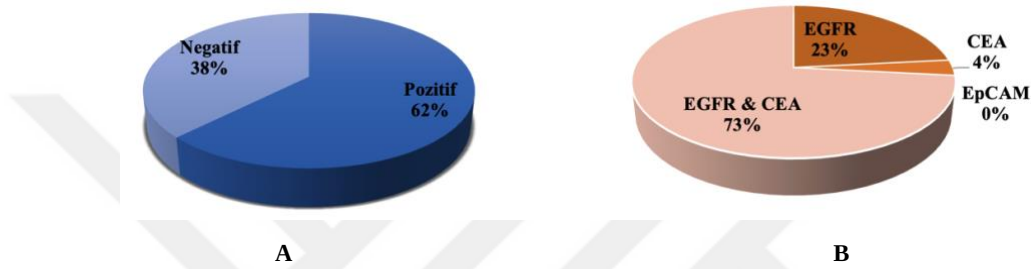
4.3. AdnaTest Protokolünün Sonuçları

Tez kapsamında hasta bireylerden toplanan periferik kan örneklerinde CTC analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm örneklerde beklenildiği gibi β -Aktin bandı gözlenmiştir. Ayrıca örneklerle birlikte yürütülen negatif kontrol ve pozitif kontrol örneklerinde de beklenen sonuçlar alınmıştır. Ek olarak, AdnaTest protokolünde yer alan Multipleks PCR aşaması öncesi adımların kontrolü için RT kontrolü de yürütülmüştür ve herhangi bir bant gözlenmemiştir. Jel elektroforez sonuçlarında KRK ile ilişkili *CEA*, *EGFR* ve *EpCAM* genlerinden en az birine ait fragman tespit edildiğinde örnekler CTC (+), hiçbir fragman tespit edilmeyen örnekler ise CTC (-) olarak kabul edilmiştir. Şekil 18'de örneklerden elde edilen jel görüntüsü verilmiştir



Şekil 18. AdnaTest sonucu amplifiye edilmiş fragmanların %3'lük jel görüntüsü. Örnek 1 negatif ve örnek 5 ise *EGFR* pozitif; örnek 2, örnek 3, örnek 4 *EGFR* ve *CEA* pozitifdir. β -Aktin tüm örneklerde tespit edilmiştir. DNA Ladder (50 bp) ilk şeritte, gösterilmiştir. En alt kısımda primer dimerleri gözükmemektedir.

Tez kapsamında dahil edilen 48 hastanın *CEA*, *EGFR* ve *EpCAM* belirteç dağılımı Şekil 19'da verilmiştir. AdnaTest yöntemi sonucunda 18 örnek negatif, 30 örnek ise pozitif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bu sonuçlarla pozitiflik oranımız %62 olarak saptanmıştır. CTC (+) olarak belirlenen örneklerde sadece *EGFR* belirtecine ait bant gözlemlenen örnek sayısı 7 iken, sadece *CEA* belirtecine ait bant gözlemlenen örnek sayısı 1'dir. *CEA* ve *EGFR* belirteçlerine ait bantların birlikte gözlemlendiği örnek sayısı 22 olmasına rağmen çalışma kapsamında hiçbir örnekte *EpCAM* belirtecine ait bant gözlenmemiştir.



Şekil 19. AdnaTest sonuçları (A) mKRK hastalarında CTC pozitiflik oranı (B) CTC (+) olan örneklerde KRK ilişkili belirteçlerin tespit oranı.

Tez çalışmasına dahil edilen tüm hastaların sağkalım bilgileri ilgili kliniklerden Mart 2024 itibarıyla alınmıştır. CTC (+) ve CTC (-) olarak bulunan hastaların klinik özellikleri ile biyobelirteçlerin dağılımı Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Hasta örneklerinin klinik özellikleri ile KRK ile ilişkili belirteçlerin dağılımı.

Klinik Özellik		EGFR (+) (n=7)	CEA (+) (n=1)	EGFR&CEA (+) (n=22)	CTC (-) (n=18)
Histolojik Tip					
Kolon Adenokarsinoma	34 (%70,8)	4 (%57)	1 (%100)	15 (%68,2)	13 (%72,2)
Rektum Adenokarsinoma	10 (%20,8)	2 (%28,5)	-	7 (%31,8)	2 (%11,1)
Diğer	4 (%8,4)	1 (%14,5)	-	-	3 (%16,6)
KRAS Durumu					
Pozitif, n (%)	20 (%41,7)	2 (%28,5)	1 (%100)	10 (%45,5)	7 (%38,9)
Negatif, n (%)	24 (%50)	4 (%57)	-	10 (%45,5)	10 (%55,5)
Bilinmeyen	4 (%8,3)	1 (%14,5)	-	2 (%9)	1 (%5,5)
Metastaz					
Karaciğer, n (%)	39 (%81,25)	7 (%100)	-	17 (%77,4)	11 (%61,2)
Karaciğer + Akciğer, n (%)	3 (%6,25)	-	1 (%100)	2 (%9)	1 (%5,5)
Akciğer, n (%)	2 (%4,2)	-	-	1 (%4,5)	1 (%5,5)
Diğer, n (%)	4 (%8,3)	-	-	2 (%9)	5 (%27,8)
Lokasyon					
Sigmoid, n (%)	20 (%41,7)	2 (%28,5)	1 (%100)	11 (%50)	6 (%33,4)
Rektosigmoid Kolon, n (%)	12 (%25)	2 (%28,5)	-	6 (%27,2)	4 (%22,2)
Rektum, n (%)	8 (%16,7)	2 (%28,5)	-	4 (%18,2)	2 (%11,1)
Sağ Kolon, n (%)	4 (%8,3)	-	-	-	4 (%22,2)
Diğer, n (%)	4 (%8,3)	1 (%14,5)	-	1 (%4,5)	2 (%11,1)
Sağkalım					
Hayatta, n (%)	32 (%66,7)	5 (%71,5)	-	16 (%72,8)	11 (%61,1)
Hayatını Kaybeden, n (%)	16 (%33,3)	2 (%28,5)	1 (%100)	6 (%27,2)	7 (%38,9)

4.4. Veri Analizi

MiRNA mikroarray analizinde CTC (+) ve CTC (-) gruplarından seçilen 8'er örneğe ait klinik bilgileri Tablo 9'da özetlenmiştir.

Tablo 9. MikroRNA mikroarray analizinde hasta örneklerinden seçilen alt grupların klinik bilgileri.

Klinik Özellikler	CTC (+) (n=8)	CTC (-) (n=8)
Cinsiyet	5 Erkek, 3 Kadın	5 Erkek, 3 Kadın
Yaş Ortalaması	59,375 (55-79)	54,75 (40-74)
BMI (kg/m ²)	24,5	30,2
Sigara	4 (%50)	5 (%62,5)
Histolojik Tip		
Kolon Adenokarsinoma	4 (%50)	5 (%62,5)
Rektum Adenokarsinoma	3 (%37,5)	2 (%25)
Diğer	1 (%12,5)	1 (%12,5)
Lokasyon		
Sigmoid Kolon	3 (%37,5)	4 (%50)
Rektosigmoid Kolon	3 (%37,5)	1 (%12,5)
Rektum	2 (%25)	2 (%25)
Sağ Kolon	-	1 (%12,5)
Metastaz Bölgesi		
Karaciğer	7 (%87,5)	7 (%87,5)
Karaciğer + Akciğer	1 (%12,5)	-
Akciğer	-	1 (%12,5)
KRAS Durumu		
Wild Tip	5 (%62,5)	6 (%75)
Mutant Tip	2 (%25)	2 (%25)
Belirlenmeyen	1 (%12,5)	-
CTC Belirteci		
EGFR	3 (%37,5)	-
CEA	1 (%12,5)	-
EGFR & CEA	4 (%50)	-

SK grubundan mikroarray için seçilen 8 örneğin cinsiyet dağılımı eşit iken, yaş ortalaması 43,25; boy ortalaması 167,8; kilo ortalaması 73,625; sigara ve alkol kullanım oranı sırasıyla %37,25 ve %25'tir.

4.4.1. DEM analizi

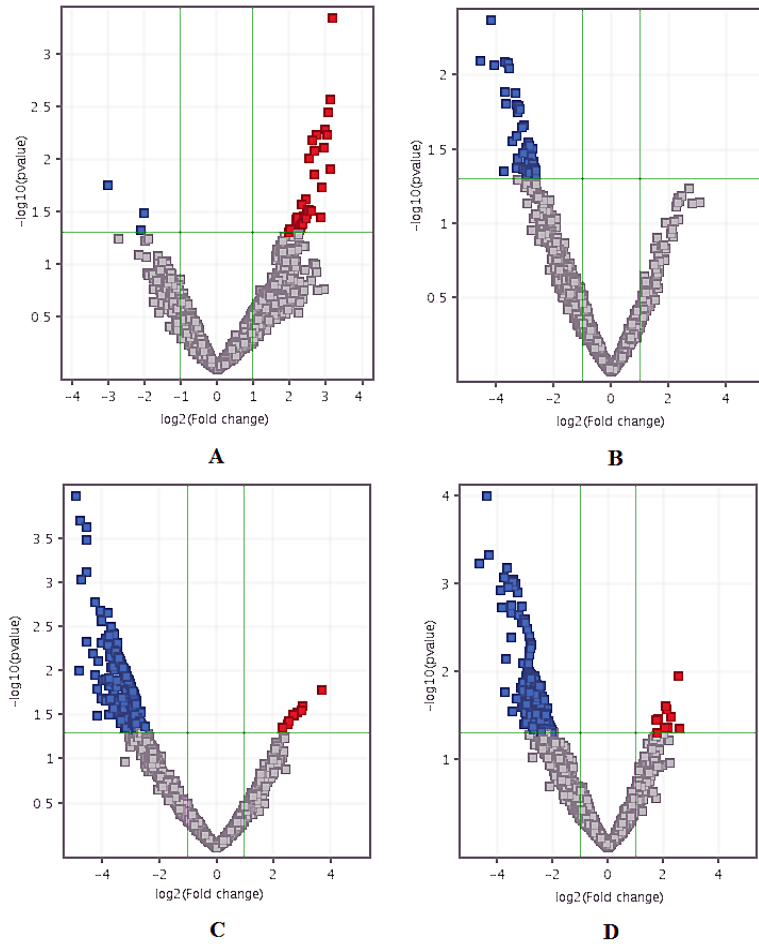
Analize uygun DEM'ler, Agilent SureScan Scanner cihazı ile Agilent Feature Extraction (v.12.2.0.7) yazılımı kullanılarak taranmıştır. Kullanılan SurePrint G3 Human miRNA r21 8x60K isimli çip üzerine 60.000 adet insana ait farklı miRNA'yı hedefleyen proplar sabitlenmiştir. GeneSpring GX (v.14.9) yazılımında istatistiksel analizlerden önce kalite kontrollerden toplam 2570 miRNA geçmiştir ve tüm istatistiksel analizler bu miRNA'lar ile yapılmıştır. İstatistiksel analizlerde ikili grup

kıyaslamaları CTC (+)/SK, CTC (-)/SK, CTC (+)/CTC (-) ve mKRK/SK şeklinde olmak üzere 4 farklı gruplandırma ile tamamlanmıştır. Üçlü grup kıyaslamasında ise CTC (+)/CTC (-)/SK şeklinde olmak üzere birbiri ile kıyaslanmıştır. Yapılan istatistiksel analizlerde her bir grup kıyaslamalarında farklı p değerlerine göre belirlenen istatistiksel olarak anlamlı DEM sayıları aşağıdaki tabloda aktarılmıştır (Tablo 10).

Tablo 10. Deney gruplarının ikili ve üçlü şekilde değerlendirilmesiyle elde edilen diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA sayıları.

Moderate T Test					
CTC (+)/CTC (-)		p<0,05	p<0,01	p<0,005	p<0,001
Kat Değişimi	FC $\geq$ 2	34	10	3	1
	FC $\leq$ -2	3	0	0	0
CTC (+)/SK		p<0,05	p<0,01	p<0,005	p<0,001
Kat Değişimi	FC $\geq$ 2	0	0	0	0
	FC $\leq$ -2	41	6	1	0
CTC (-)/SK		p<0,05	p<0,01	p<0,005	p<0,001
Kat Değişimi	FC $\geq$ 2	9	0	0	0
	FC $\leq$ -2	317	84	20	6
mKRK [CTC (+)&CTC (-)]/SK		p<0,05	p<0,01	p<0,005	p<0,001
Kat Değişimi	FC $\geq$ 2	252	36	27	8
	FC $\leq$ -2	10	0	0	0
CTC (+)/CTC (-)/SK		p<0,05	p<0,01	p<0,005	p<0,001
Kat Değişimi	FC $\geq$ 2	113	22	9	1
	FC $\leq$ -2	18	0	0	0

Yapılan ikili grup analizlerinde en fazla sayıda DEM (n=328) saptanan grup CTC (-)/SK olurken en az sayıda DEM (n=37) tespit edilen grup ise CTC (+)/CTC (-) olmuştur. CTC (+)/SK ve CTC (-)/SK gruplarında ise DEM sayıları sırasıyla (n=41) ve (n=262) olarak bulunmuştur. Grup kıyaslamalarında kesişen ve farklılık gösteren DEM'ler Şekil 20'de gösterilmiştir.



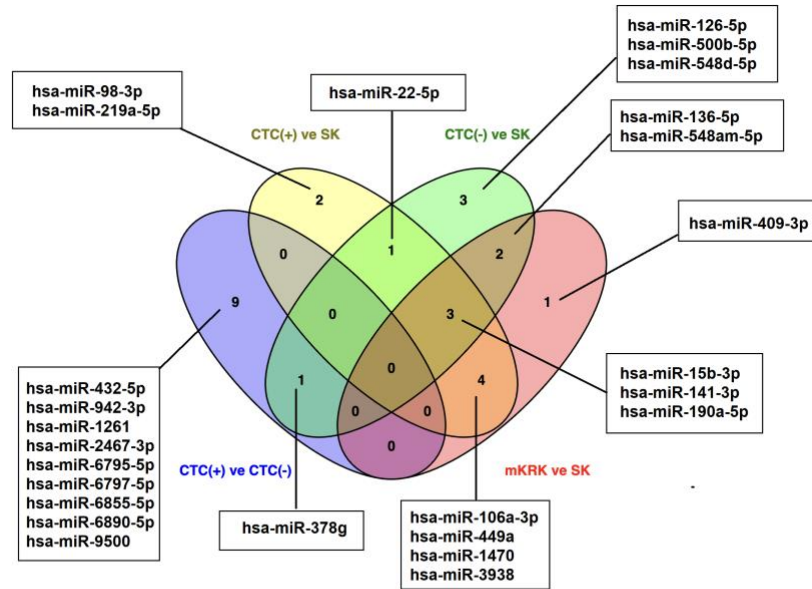
Şekil 21. Dört grubun ikili karşılaştırmaları ile $p < 0,05$ ve $FC \geq 2$ veya ≤ -2 olan DEM'lerin anlatım oranlarını gösteren volcano plot görüntüleri (A) CTC (+)/CTC (-) (B) CTC (+)/SK (C) CTC (-)/SK (D) mKRK/SK.

Mikroarray veri analizlerinde 4 grupta tespit edilen ilk 10 DEM'e ait miRNA bilgisi, p değerleri, FC ve logFC değerleri Tablo 11'de gösterilmiştir. İlgili tablodaki gruplar arasında yer alan bazı DEM'ler kesişmektedir. Her grupta istatistiksel olarak p değeri en anlamlı olan DEM'ler koyu renkle gösterilmiştir. mKRK/SK ve CTC (+)/SK gruplarında kesişen en anlamlı ve ilk sırada yer alan miRNA hsa-miR-141-3p olarak tespit edilmiştir. Üç grupta ilk 10 DEM arasında bulunan ve en fazla kesişen DEM'ler ise hsa-miR-15b-3p, hsa-miR-141-3p ve hsa-miR-190a-5p olarak belirlenmiştir.

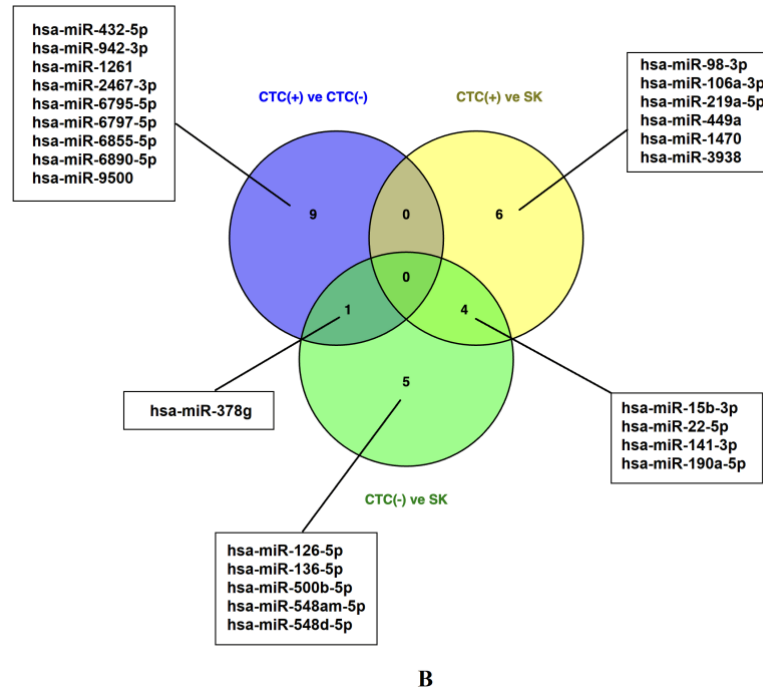
Tablo 11. Dört grup için tespit edilen ilk 10 DEM'e ait p değerleri, FC değişimleri ve logFC değerleri.

DEM	miRBase ID	CTC (+)/CTC (-)			CTC (+)/SK			CTC (-)/SK			mKRK/SK		
		p Değeri	FC	LogFC	p Değeri	FC	LogFC	p Değeri	FC	LogFC	p Değeri	FC	LogFC
hsa-miR-15b-3p	MIMAT0004586				8,50E-03	-17,120	-4,098	7,52E-04	-23,605	-4,561	4,79E-04	-20,103	-4,329
hsa-miR-22-5p	MIMAT0004495				1,29E-02	-13,081	-3,709	2,06E-03	-16,990	-4,087			
hsa-miR-98-3p	MIMAT0022842				1,31E-02	-10,039	-3,327						
hsa-miR-106a-3p	MIMAT0004517				8,11E-03	-13,212	-3,724				9,74E-04	-12,183	-3,607
hsa-miR-126-5p	MIMAT0000444							1,67E-03	-19,242	-4,266			
hsa-miR-136-5p	MIMAT0000448							1,97E-04	-27,460	-4,779	8,56E-04	-13,603	-3,766
hsa-miR-141-3p	MIMAT0000432				4,21E-03	-18,579	-4,216	3,26E-04	-23,847	-4,576	9,79E-05	-21,049	-4,396
hsa-miR-190a-5p	MIMAT0000458				8,07E-03	-24,023	-4,586	9,24E-04	-26,717	-4,740	5,98E-04	-25,334	-4,663
hsa-miR-219a-5p	MIMAT0000276				1,57E-02	-12,753	-3,673						
hsa-miR-378g	MIMAT0018937	2,69E-03	8,663	3,115				2,69E-03	-16,454	-4,040			
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639										1,07E-03	-10,766	-3,428
hsa-miR-432-5p	MIMAT0002814	5,28E-03	7,832	2,969									
hsa-miR-449a	MIMAT0001541				1,57E-02	-10,029	-3,326				9,66E-04	-10,990	-3,458
hsa-miR-500b-5p	MIMAT0016925							1,03E-04	-30,922	-4,951			
hsa-miR-548am-5p	MIMAT0022740							2,34E-04	-23,789	-4,572	6,62E-04	-12,637	-3,660
hsa-miR-548d-5p	MIMAT0004812							2,19E-03	-14,217	-3,830			
hsa-miR-942-3p	MIMAT0026734	8,44E-03	6,286	2,652									
hsa-miR-1261	MIMAT0005913	9,76E-03	5,680	2,506									
hsa-miR-1470	MIMAT0007348				8,31E-03	-12,148	-3,603				8,95E-04	-10,695	-3,419
hsa-miR-2467-3p	MIMAT0019953	5,91E-03	6,592	2,721									
hsa-miR-3938	MIMAT0018353				9,01E-03	-11,724	-3,551				1,02E-03	-10,322	-3,368
hsa-miR-6795-5p	MIMAT0027490	5,88E-03	8,081	3,015									
hsa-miR-6797-5p	MIMAT0027494	6,62E-03	6,139	2,618									
hsa-miR-6855-5p	MIMAT0027610	3,55E-03	8,227	3,040									
hsa-miR-6890-5p	MIMAT0027518	4,47E-04	9,024	3,174									
hsa-miR-9500	MIMAT0035542	7,78E-03	7,692	2,943									

Farklı şekilde yapılan grup analizlerinde belirlenen ilk 10 DEM'e ait kesişimler ve farklılıklar Şekil 22'de gösterilmiştir. DEM'ler CTC (+)/CTC (-) grubuna ait 9 DEM hiçbir grupta kesişmemiştir, bu yüzden CTC (+)/CTC (-) grubu en az DEM kesişimi gösteren gruptur. Birbiriyle en fazla DEM kesişimi (n=7) gösteren gruplar ise mKRK/SK ve CTC (+)/SK olmuştur.



A



Şekil 22. Mikroarray analizinde 4 grup için tespit edilen ilk 10 DEM'in ve kesişen DEM'lerin ($FC \geq 2$ veya ≤ -2 ve $p < 0,05$) Venn diyagramı ile gösterilmesi (A) CTC (+)/CTC (-), CTC (+)/SK, CTC (-)/SK ve mKRR/SK gruplarının kıyaslaması (B) CTC (+)/CTC (-), CTC (+)/SK ve CTC (-)/SK gruplarının kıyaslaması.

4.4.1.1. KEGG ve GO yolak zenginleştirme analizi

CTC (+) ve CTC (-) grup kıyaslanmalarında $p < 0,05$ altında ve $FC \geq 2$ veya ≤ -2 aralığında ve anlamlı bulunan DEM'lerin hedef genleri ile KEGG ve GO zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir. Kesişen DEM'lerin ($n=37$) kümelandikleri istatistiksel olarak anlamlı ilk 10 KEGG yolağı Tablo 12'de ve ilk 10 GO:BP, GO:MF ve GO:CC terimleri Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 12. CTC (+) ve CTC (-) gruplarında kesişen DEM'lerin ($n=37$) kümelandikleri istatistiksel olarak anlamlı ilk 10 KEGG terimi ($p < 0,05$).

KEGG Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Cell cycle	98	7,75E-12	7,75E-10
Focal adhesion	143	1,07E-10	5,35E-09
Pathways in cancer	206	4,32E-10	1,44E-08
HTLV-I infection	140	1,06E-09	2,65E-08
RNA transport	95	1,78E-09	3,56E-08
Small cell lung cancer	65	3,54E-09	5,90E-08
Protein processing in ER	96	4,81E-09	6,87E-08
Chronic myeloid leukemia	60	6,14E-09	7,68E-08
ErbB signaling pathway	69	8,16E-09	9,07E-08
Prostate cancer	68	3,15E-08	3,15E-07

Tablo 13. CTC (+) ve CTC (-) gruplarında kesişen DEM'lerin (n=37) kümelendiği istatistiksel olarak anlamlı ilk 10 GO:BP, GO:MF ve GO:CC terimleri (p<0,05).

GO:BP Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Interphase of mitotic cell cycle	292	2,78E-13	2,27E-11
Interphase	296	4,54E-13	2,27E-11
Viral reproductive process	378	2,57E-11	8,57E-10
Interaction with host	279	6,40E-11	1,60E-09
G1/S transition of mitotic cell cycle	148	7,95E-10	1,59E-08
S phase	113	1,54E-09	2,57E-08
Golgi vesicle transport	145	2,30E-09	2,91E-08
S phase of mitotic cell cycle	107	2,33E-09	2,91E-08
Protein transport	806	3,39E-09	3,77E-08
Intracellular protein transport	476	5,92E-09	5,64E-08
GO:MF Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Nucleotide binding	1450	2,09E-29	2,09E-27
ATP binding	921	1,08E-28	5,40E-27
Adenyl ribonucleotide binding	934	1,05E-26	2,88E-25
Adenyl nucleotide binding	936	1,15E-26	2,88E-25
Purine ribonucleotide binding	1110	9,09E-23	1,64E-21
Purine nucleotide binding	1120	9,86E-23	1,64E-21
Enzyme binding	734	6,35E-21	9,07E-20
RNA binding	583	9,52E-14	1,16E-12
Chromatin binding	230	1,04E-13	1,16E-12
Protein kinase binding	250	4,95E-13	4,95E-12
GO:CC Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Cytosol	1540	3,60E-35	3,60E-33
Nucleoplasm part	567	4,92E-22	2,46E-20
Nucleoplasm	1030	8,56E-19	2,85E-17
Cell leading edge	198	1,96E-15	4,20E-14
Nucleolus	404	2,10E-15	4,20E-14
Nuclear body	203	1,33E-14	2,22E-13
Centrosome	265	4,10E-13	5,86E-12
Spindle	179	7,77E-13	9,71E-10
Nuclear membrane	145	9,74E-12	9,90E-11
Organelle lumen	1760	9,90E-12	9,90E-11

CTC (+) ve SK grup kıyaslanmalarında $p < 0,05$ altında ve $FC \geq 2$ veya ≤ -2 aralığında anlamlı bulunan DEM'lerin hedef genleri ile KEGG ve GO zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir. Kesişen DEM'lerin (n=41) kümelendikleri istatistiksel olarak anlamlı ilk 10 KEGG yolağı Tablo 14'te ve ilk 10 GO:BP, GO:MF ve GO:CC terimleri Tablo 15'te gösterilmiştir.

Tablo 14. CTC (+) ve SK gruplarında kesişen DEM'lerin (n=41) kümelendikleri istatistiksel olarak anlamlı ilk 10 KEGG terimi (p<0,05).

KEGG Terimi	Molekül Sayısı	p değeri	Adjusted p değeri
Pathways in cancer	248	1,21E-15	1,21E-13
Small cell lung cancer	77	1,47E-14	7,35E-13
Cell cycle	109	1,62E-12	5,40E-11
Protein processing in ER	112	5,08E-12	1,27E-10
Chronic myeloid leukemia	68	5,73E-11	1,15E-09
HTLV-I infection	160	9,35E-11	1,56E-09
Renal cell carcinoma	56	2,59E-09	3,70E-08
Neurotrophin signaling pathway	103	3,35E-09	4,19E-08
Bacterial invasion of epithelial cells	52	1,63E-08	1,67E-07
Pancreatic cancer	62	1,78E-08	1,67E-07

Tablo 15. CTC (+) ve SK gruplarında kesişen DEM'lerin (n=41) kümelendiği istatistiksel olarak anlamlı ilk 10 GO:BP, GO:MF ve GO:CC terimleri (p<0,05).

GO:BP Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Interphase of mitotic cell cycle	334	9,82E-13	9,82E-11
Interphase	338	3,10E-12	1,55E-10
Viral reproductive process	441	9,73E-12	3,24E-10
S phase of mitotic cell cycle	124	2,64E-11	6,60E-10
Interaction with host	323	3,64E-11	7,28E-10
Cell division	377	7,72E-11	1,29E-09
S phase	129	2,35E-10	3,36E-09
G1/S transition of mitotic cell cycle	167	2,90E-09	3,62E-08
G2/M transition of mitotic cell cycle	124	6,63E-09	7,37E-08
Protein polyubiquitination	143	1,01E-08	1,01E-07
GO:MF Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Nucleotide binding	1720	5,60E-33	5,60E-31
ATP binding	1070	1,78E-27	8,90E-26
Purine nucleotide binding	1320	5,26E-26	1,72E-24
Adenyl nucleotide binding	1090	7,95E-26	1,72E-24
Purine ribonucleotide binding	1320	1,00E-25	1,72E-24
Adenyl ribonucleotide binding	1080	1,03E-25	1,72E-24
Zinc ion binding	1340	2,44E-15	3,49E-14
Enzyme binding	824	1,41E-13	1,76E-12
Chromatin binding	260	1,27E-12	1,41E-11
RNA binding	667	1,82E-10	1,82E-09
GO:CC Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Cytosol	1780	6,71E-29	6,71E-27
Nucleoplasm part	647	2,09E-19	1,04E-17
Nuclear body	231	9,35E-15	3,12E-13
Nucleolus	464	2,62E-14	6,55E-13
Spindle	202	3,45E-12	6,90E-11
Nuclear speck	126	8,93E-12	1,49E-10
Perinuclear region of cytoplasm	340	2,52E-11	3,60E-10
Nucleoplasm	1170	3,07E-11	3,84E-10
Cell leading edge	212	2,33E-10	2,59E-09
Ubiquitin ligase complex	132	3,71E-10	3,71E-09

CTC (-) ve SK grup kıyaslanmalarında p<0,05 altında ve FC≥2 veya ≤-2 aralığında ve anlamlı bulunan DEM'lerin hedef genleri ile KEGG ve GO zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir. Kesişen DEM'lerin (n=328) kümelendikleri istatistiksel olarak anlamlı ilk 10 KEGG yolağı Tablo 16'da ve ilk 10 GO:BP, GO:MF ve GO:CC terimleri Tablo 17'de gösterilmiştir.

Tablo 16. CTC (-) ve SK gruplarında kesişen DEM'lerin (n=328) kümelendikleri istatistiksel olarak anlamlı ilk 10 KEGG terimi (p<0,05).

KEGG Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Transforming Growth β signaling pathway	85	0	0
Chagas disease (<i>American trypanosomiasis</i>)	90	0	0
Pathways in cancer	305	6,27E-14	2,09E-12
MAPK signaling pathway	258	1,05E-09	2,63E-08
HTLV-I infection	194	1,01E-07	2,02E-06
Protein processing in ER	128	2,06E-07	3,43E-06
Focal adhesion	194	4,77E-07	6,81E-06
Wnt signaling pathway	141	2,36E-06	2,95E-05
ErbB signaling pathway	87	4,20E-06	4,20E-05
Prostate cancer	87	4,20E-06	4,20E-05

Tablo 17. CTC (-) ve SK gruplarında kesişen DEM'lerin (n=328) kümелendiği istatistiksel olarak anlamlı ilk 10 GO:BP, GO:MF ve GO:CC terimleri (p<0,05).

GO:BP Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Positive regulation of cell cycle	112	1,10E-04	1,10E-02
Post-translational protein modification	189	8,04E-04	4,02E-02
Interaction with host	401	2,17E-03	7,23E-02
Regulation of cell shape	103	5,66E-03	1,16E-01
G1/S transition of mitotic cell cycle	199	5,82E-03	1,16E-01
Activation of MAPK activity	126	8,84E-03	1,23E-01
Cellular protein complex disassembly	153	8,87E-03	1,23E-01
S phase of mitotic cell cycle	138	9,87E-03	1,23E-01
Post-Golgi vesicle-mediated transport	77	1,31E-02	1,37E-01
S phase	146	1,37E-02	1,37E-01
GO:MF Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Transmembrane receptor protein phosphatase activity	19	0	0
β-tubulin binding	27	0	0
ATP binding	1390	1,03E-13	3,43E-12
Adenyl nucleotide binding	1420	3,19E-12	7,98E-11
Adenyl ribonucleotide binding	1420	4,14E-12	8,28E-11
Nucleotide binding	2260	1,47E-11	2,45E-10
Purine nucleotide binding	1740	4,00E-09	5,71E-08
Purine ribonucleotide binding	1730	5,44E-09	6,80E-08
Zinc ion binding	1830	1,65E-06	1,83E-05
Protein domain specific binding	523	5,06E-06	5,06E-05
GO:CC Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Perinuclear region of cytoplasm	449	1,53E-08	1,53E-06
Nuclear speck	149	8,94E-07	4,47E-05
Nucleolus	601	6,06E-06	2,02E-04
Nuclear body	276	1,16E-04	2,90E-03
Transcription factor complex	282	3,02E-04	6,03E-03
Lamellipodium	122	3,92E-04	6,03E-03
Nuclear matrix	85	4,22E-04	6,03E-03
Focal adhesion	125	2,38E-03	2,98E-02
Cell body	267	2,92E-03	3,08E-02
RNA polymerase complex	101	3,34E-03	3,08E-02

mKRK [CTC (+)&CTC (-)] ve SK grup kıyaslanmalarında p<0,05 altında ve FC≥2 veya ≤-2 aralığında ve anlamlı bulunan DEM'lerin hedef genleri ile KEGG ve GO zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir. Kesişen DEM'lerin (n=262) kümелendikleri istatistiksel olarak anlamlı ilk 10 KEGG yolağı Tablo 18'de ve ilk 10 GO:BP, GO:MF ve GO:CC terimleri Tablo 19'da gösterilmiştir.

Tablo 18. mKRK ve SK gruplarında kesişen DEM'lerin (n=262) kümелendikleri istatistiksel olarak anlamlı ilk 10 KEGG terimi (p<0,05).

KEGG Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Pathways in cancer	301	8,11E-15	8,11E-13
HTLV-I infection	192	7,04E-09	3,52E-07
MAPK signaling pathway	251	1,74E-08	5,80E-07
Neurotrophin signaling pathway	121	7,44E-08	1,86E-06
Protein processing in ER	125	1,59E-06	2,62E-05
Focal adhesion	189	1,98E-06	2,62E-05
Chronic myeloid leukemia	73	2,04E-06	2,62E-05
Chagas disease (<i>American trypanosomiasis</i>)	88	2,10E-06	2,62E-05
Endocytosis	99	2,81E-06	3,12E-05
Pancreatic cancer	69	4,21E-06	4,21E-05

Tablo 19. mKRK ve SK gruplarında kesişen DEM'lerin (n=262) kümelendiği istatistiksel olarak en anlamlı ilk 10 GO:BP, GO:MF ve GO:CC terimleri (p<0,05).

GO:BP Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Teraction with host	394	6,81E-05	2,96E-03
Positive regulation of cell cycle	110	8,29E-05	2,96E-03
G1/S transition of mitotic cell cycle	198	8,87E-05	2,96E-03
S phase of mitotic cell cycle	138	1,89E-04	4,72E-03
S phase	146	2,52E-04	4,92E-03
Post-translational protein modification	185	2,95E-04	4,92E-03
G2/M transition of mitotic cell cycle	142	1,02E-03	1,46E-02
Activation of MAPK activity	124	2,17E-03	2,71E-02
Cellular protein complex disassembly	150	2,77E-03	3,08E-02
Macromolecular complex disassembly	176	3,08E-03	3,08E-02
GO:MF Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
MAPK activity	20	0	0
Transmembrane receptor protein phosphatase activity	19	0	0
ATP binding	1370	4,31E-22	1,44E-20
Adenyl ribonucleotide binding	1400	1,71E-20	4,28E-19
Adenyl nucleotide binding	1400	2,58E-20	5,16E-19
Nucleotide binding	2220	1,70E-19	2,83E-18
Purine ribonucleotide binding	1700	4,28E-16	6,09E-15
Purine nucleotide binding	1710	4,87E-16	6,09E-15
Zinc ion binding	1770	7,92E-08	8,80E-07
Chromatin binding	315	2,49E-07	2,49E-06
GO:CC Terimi	Molekül Sayısı	p Değeri	Adjusted p Değeri
Nucleolus	588	3,63E-08	3,63E-06
Perinuclear region of cytoplasm	431	4,16E-07	1,59E-05
Nuclear speck	146	4,78E-07	1,59E-05
Nuclear body	271	4,50E-06	1,12E-04
Transcription factor complex	277	1,05E-05	2,10E-04
Nucleoplasm part	797	2,64E-05	4,40E-04
Lamellipodium	120	7,39E-05	9,99E-04
Nuclear matrix	84	7,99E-05	9,99E-04
Focal adhesion	124	1,28E-04	1,42E-03

4.4.2. Biyoinformatik analizler

Tez çalışması kapsamında ikili grup kıyaslamalarında kesişen iki DEM grubuna ait miRNA'lar ile ileri biyoinformatik analizler tamamlanmıştır. CTC (+)/CTC, CTC (-)/SK ve mKRK/SK grup kıyaslamasında kesişen 5 farklı DEM tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar; hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-326, hsa-miR-378g, hsa-miR-500b-5p ve hsa-miR-4737'dir (Tablo 20).

Tablo 20. CTC (+)/CTC (-), CTC (-)/SK ve mKRK/SK grup kıyaslamasında kesişen ve CTC durumu ile ilişkili bulunan 5 DEM'in p değerleri, FC ve logFC değerleri.

Grup Kıyaslaması		CTC (+)/CTC (-)			CTC (-)/SK			mKRK/SK		
DEM	miRBase ID	p Değeri	FC	LogFC	p Değeri	FC	LogFC	p Değeri	FC	LogFC
hsa-miR-199a-5p	MIMAT0000231	1,84E-02	7,362	2,880	4,25E-03	-15,106	-3,917	2,92E-02	-5,567	-2,477
hsa-miR-326	MIMAT0000756	3,06E-02	5,693	2,509	8,08E-03	-11,763	-3,556	3,30E-02	-4,930	-2,302
hsa-miR-378g	MIMAT0018937	2,69E-03	8,663	3,115	2,69E-03	-16,454	-4,040	2,23E-02	-5,590	-2,483
hsa-miR-500b-5p	MIMAT0016925	1,39E-02	6,344	2,665	1,03E-04	-30,922	-4,951	1,10E-03	-12,276	-3,618
hsa-miR-4737	MIMAT0019863	3,56E-02	7,164	2,841	5,08E-03	-14,278	-3,836	4,93E-02	-5,334	-2,415

CTC (+)/SK ve mKRR/SK grup kıyaslamasında kesişen 6 farklı DEM olarak hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-4754 ve hsa-miR-5691 miRNA'ları saptanmıştır (Tablo 21). Grup kıyaslamalarında kesişen yukarıdaki iki DEM grubu CTC tespiti için aday miRNA'lar niteliğindedir ve ileri validasyon çalışmaları için öncelikli miRNA'lar olarak belirlenmiştir.

Tablo 21. CTC (+)/SK ve mKRR/SK grup kıyaslamasında kesişen ve CTC durumu ile ilişkili bulunan 6 DEM'in p değerleri, FC ve logFC değerleri.

Grup Kıyaslaması		CTC (+)/SK			mKRR/SK		
DEM	miRBase ID	p Değeri	FC	LogFC	p Değeri	FC	LogFC
hsa-miR-181c-5p	MIMAT0000258	2,78E-02	-10,979	-3,457	1,74E-02	-8,354	-3,063
hsa-miR-497-5p	MIMAT0002820	4,28E-02	-8,502	-3,088	1,08E-02	-7,485	-2,904
hsa-miR-520e	MIMAT0002825	2,26E-02	-8,684	-3,118	1,06E-02	-6,990	-2,805
hsa-miR-769-5p	MIMAT0003886	3,36E-02	-8,389	-3,069	1,75E-02	-7,264	-2,861
hsa-miR-4754	MIMAT0019894	4,94E-02	-6,831	-2,772	1,42E-02	-6,014	-2,588
hsa-miR-5691	MIMAT0022483	4,54E-02	-7,193	-2,847	1,24E-02	-6,332	-2,663

4.4.2.1. CTC durumuyla ilişkili DEM'lerin hedef gen analizleri

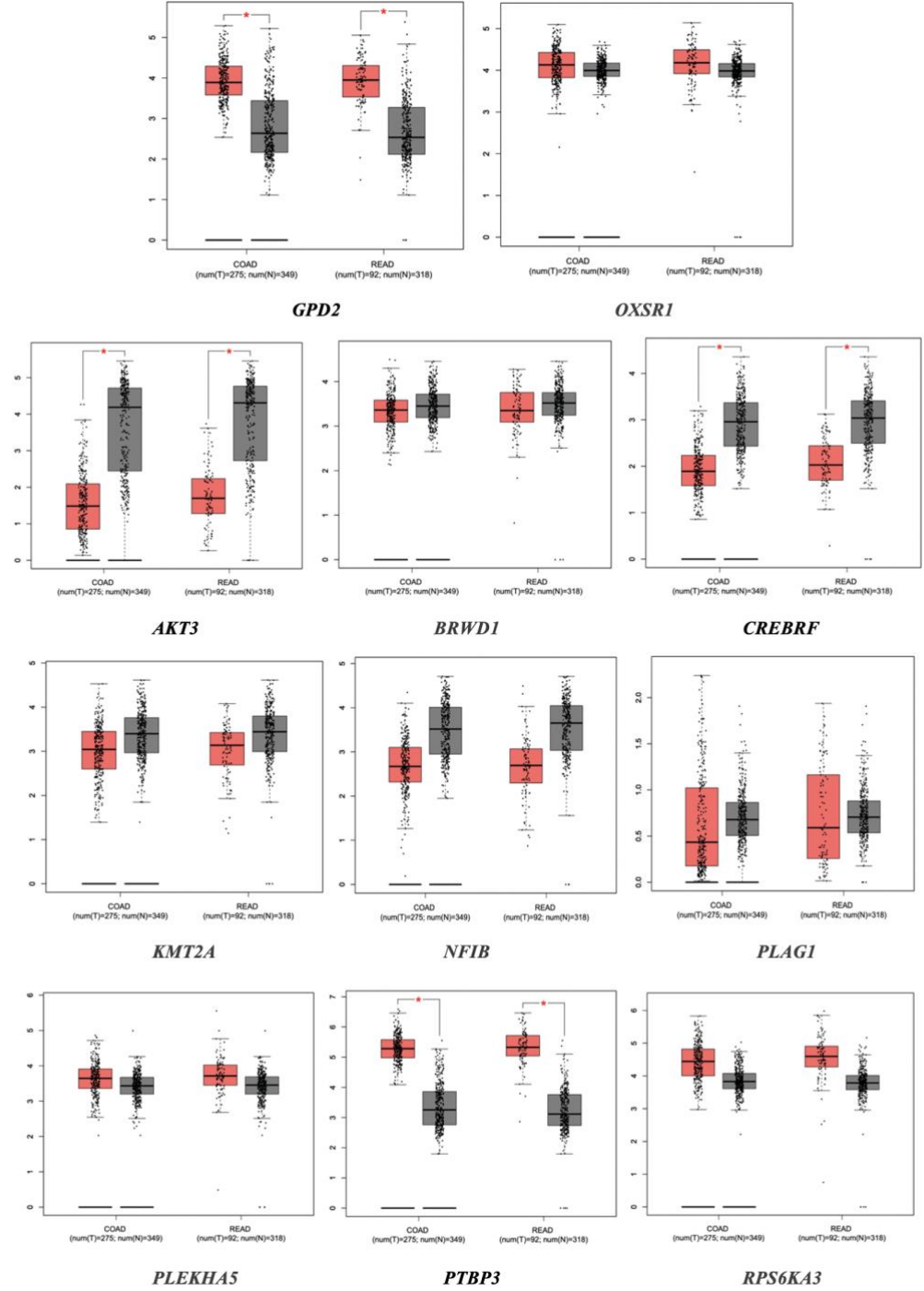
Tez çalışmasında CTC (+)/CTC, CTC (-)/SK ve mKRR/SK kıyaslamasında bulunan 5 farklı DEM ve CTC (+)/SK ve mKRR/SK kıyaslamasında 6 farklı DEM gruplarında yer alan miRNA'ların hedef mRNA'larının belirlenmesinde mirDIP veri tabanı kullanılmıştır. İlgili DEM gruplarında en az 3 miRNA tarafından hedeflenen genler Tablo 22'de gösterilmiştir. 5 DEM grubunda hsa-miR-199a-5p ve hsa-miR-326; 6 DEM grubunda hsa-miR-181c-5p en fazla geni hedefleyen miRNA'lar olarak bulunmuştur.

Tablo 22. CTC durumu ile ilişkili DEM'lerin ortak hedef gen analizleri.

Gen	Ortak DEM Sayısı	5 DEM Grubu
GP2	3	hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-326, hsa-miR-500b-5p
OXSRI	3	hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-326, hsa-miR-378g
Gen	Ortak DEM Sayısı	6 DEM Grubu
AKT3	3	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-769-5p
BRWD1, KMT2A	3	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-769-5p
CREBRF, NFIB	3	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-691
PLAG1	3	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-520e
PLEKHA5	3	hsa-miR-497-5p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-5691
PTBP3	3	hsa-miR-181c, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-5691
RPS6KA3	4	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-5691

Yukarıda iki ayrı DEM grubu için ortak hedef olarak bulunan genlerin TCGA ve GTEx veri tabanlarına ait COAD ve READ veri setlerinde sağlıklı kontrollerle

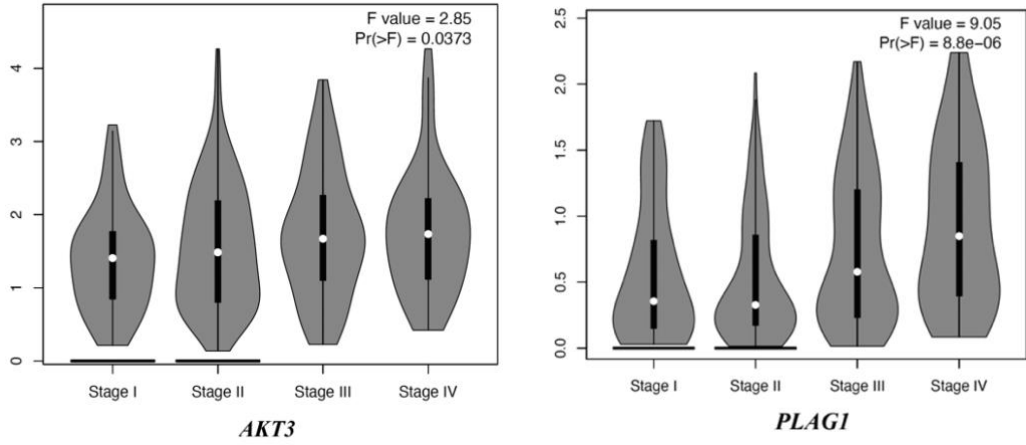
kıyaslanarak hasta grubunda ekspresyon profillerine yönelik analizleri yapılmıştır (Şekil 23).



Şekil 23. DEM gruplarına ait ortak hedeflenen genlerin TCGA ve GTEx verilerinde ekspresyon grafikleri. Kırmızı renk tümör örnek grubunu, gri renk ise sağlıklı örnek grubunu temsil etmektedir. İstatistiksel anlamlılık kırmızı yıldız ile gösterilmiştir ($p < 0,05$).

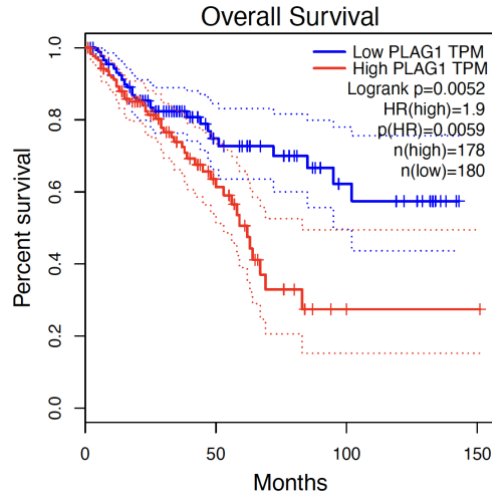
Altı DEM grubu içinde ortak hedeflenen genler arasında *AKT3* (AKT Serine/Threonine Kinase 3), *CREBRF* (CREB3 Regulatory Factor) ve *PTBP3* (Polypyrimidine Tract Binding Protein 3) genleri anlamlı bulunurken 5 DEM grubu içinde yalnızca *GPD2* (Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 2) geni anlamlı bulunmuştur.

Ek olarak, hastaların patolojik evrelerine dayalı olarak diferansiyel ekspresyonlarını hesaplayan patolojik evre analizlerinde 6 DEM grubu içinde hedeflenen *AKT3* ve *PLAG1* (Pleiomorphic Adenoma Gene 1) genlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. ($p < 0,05$) (Şekil 24).



Şekil 24. TCGA ve GTEx veri setlerinde anlamlı bulunan genlerin patolojik evre grafikleri (A) *AKT3* geni (B) *PLAG1* geni.

Son olarak, hastaların DEM grupları tarafından ortak hedeflenen genlerin TCGA ve GTEx veri tabalarına ait hastaların aylık sağkalım sürelerine göre OS analizi yapılmıştır. Yapılan OS analizlerinde 6 DEM grubu içinde hedeflenen *PLAG1* geni istatistiksel olarak anlamlı (log-rank $p = 0,0052$) olduğu gözlenmiştir (Şekil 25). Patolojik evre ve OS analizlerinde ortak istatistiksel olarak anlamlı bulunan tek gen *PLAG1* geni olarak saptanmıştır.



Şekil 25. *PLAG1* geninin TCGA ve GTEx veri tabalarına ait verilerle KKK'e yönelik sağkalım analizi.

4.4.2.2. DEM'lerin transkripsiyon faktörleri ile regülatör etkileşimleri

Belirlenen 2 DEM grubunun TF ile etkileşimlerinin belirlenmesinde TransmiR veri tabanı kullanılmıştır. TransmiR veri tabanında iki grupta yer alan miRNA'lar aynı anda analiz edilmiştir. İlgili DEM gruplarında hedeflenen TF'ler hipergeometrik test uygulanarak bulunan p değeri, Bonferroni ve FDR değerleri Tablo 23'te gösterilmiştir.

Tablo 23. CTC durumu ile ilişkili DEM'lerin transkripsiyon faktör etkileşimleri ve p değerleri, Bonferroni ve FDR analizi değerleri.

Transkripsiyon Faktörü	5 DEM Grubu	p Değeri	Bonferroni	FDR
<i>BRD2</i>	hsa-miR-326, hsa-miR-4737	3,65E-03	0,4485	0,409
<i>CBX5</i>	hsa-miR-4737	8,25E-03	1	0,409
<i>CRY1</i>	hsa-miR-4737	1,23E-02	1	0,409
<i>MBD2</i>	hsa-miR-4737	1,64E-02	1	0,409
<i>PRDM5</i>	hsa-miR-326	1,85E-02	1	0,409
<i>CLOCK</i>	hsa-miR-4737	2,46E-02	1	0,409
<i>BRD3</i>	hsa-miR-500b-5p, hsa-miR-326, hsa-miR-4737	2,59E-02	1	0,409
<i>NR1H4</i>	hsa-miR-199a-5p	2,66E-02	1	0,409
<i>TWIST1</i>	hsa-miR-199a-5p	4,87E-02	1	0,648
Transkripsiyon Faktörü	6 DEM Grubu	p Değeri	Bonferroni	FDR
<i>AKT1</i>	hsa-miR-181c-5p	1,54E-02	1	0,837
<i>RAD21</i>	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-4754	2,18E-02	1	0,837
<i>ZNF750</i>	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-4754	2,57E-02	1	0,837
<i>CEBPZ</i>	hsa-miR-769-5p	3,82E-02	1	0,837

4.4.2.3. DEM'lerin lncRNA analizleri

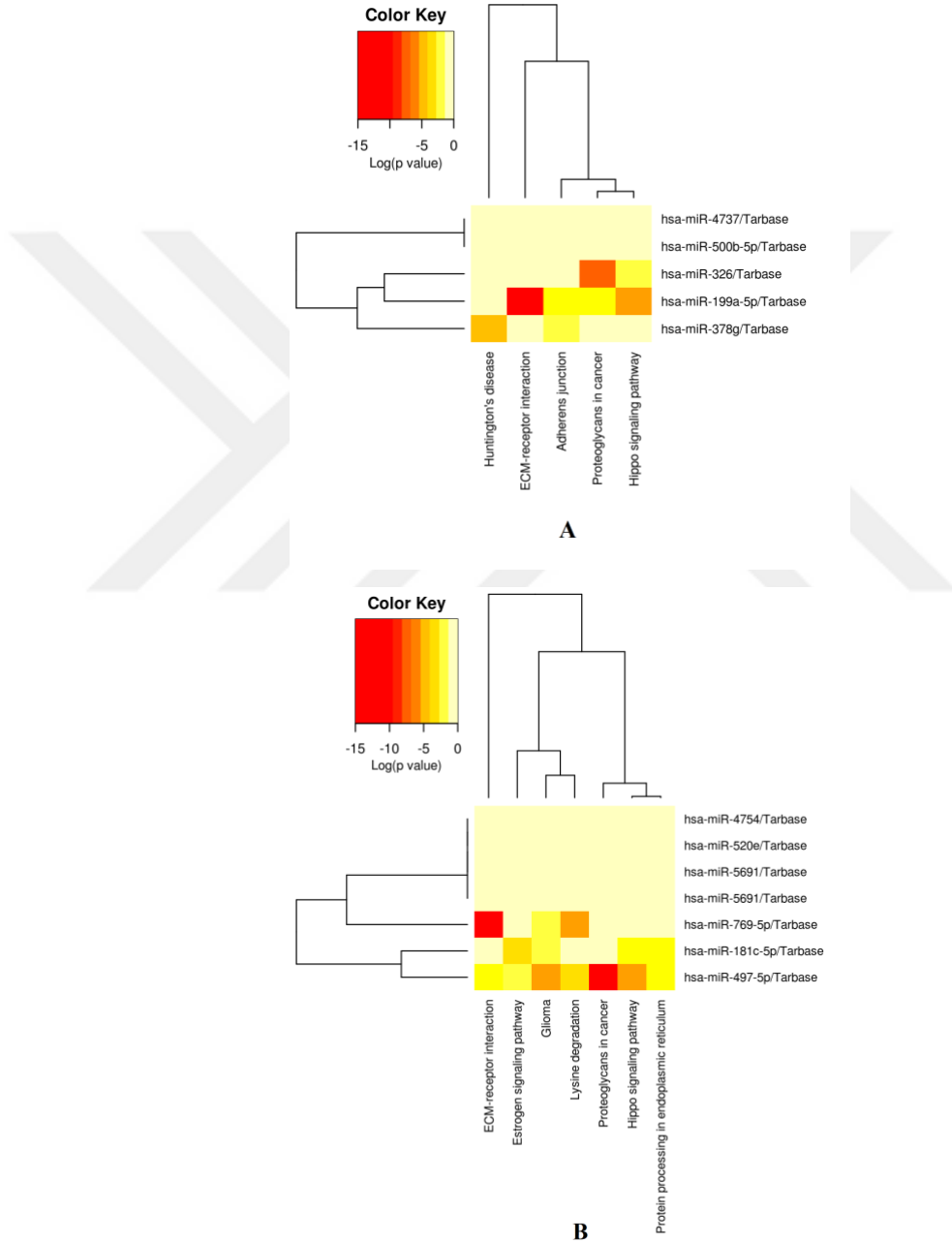
Grup kıyaslamaları ile elde edilen 5 DEM ve 6 DEM gruplarında yer alan miRNA'larla interaksyonu olan lncRNA'ların belirlenmesinde RNAInter veri tabanı kullanılmıştır. RNAInter veri tabanında miRNA'lar tekli olarak analiz edilmiştir. İlgili veri tabanında hedef lncRNA'ların belirlenmesinde güncel literatürde elde edilen güçlü ve zayıf deneysel verilere göre bir skor hesaplanmıştır. En fazla sayıda miRNA (n=4) tarafından hedeflenen lncRNA *SNHG16* (Small nuclear RNA host gene 12) olarak tespit edilmiştir. İlgili DEM'lerin lncRNA etkileşimleri ve skorları Tablo 24'te gösterilmiştir.

Tablo 24. CTC durumu ile ilişkili DEM'lerin lncRNA etkileşimleri ve filtrelenen deneysel kanıt türüne göre ilgili skorları. Skor 1 sayısına ne kadar yakınsa lncRNA-miRNA interaksyon tahmini o kadar güçlüdür.

MiRNA Grubu	MiRNA	Güçlü Deneysel Kanıt		Zayıf Deneysel Kanıt	
		lncRNA	Skor	lncRNA	Skor
5 DEM Grubu	hsa-miR-199a-5p	<i>CDKN2B-AS1</i>	0,5235	<i>SNHG29</i>	0,2129
		<i>CT70</i>	0,476	<i>MIR600HG</i>	0,2129
		<i>SNHG12</i>	0,4605	<i>RRN3P2</i>	0,2129
		<i>PVT1</i>	0,3829	<i>TUG1</i>	1E-10
		<i>DNM3OS</i>	0,3274	-	-
		<i>JPX</i>	0,2129	-	-
		<i>TUG1</i>	1E-10	-	-
	hsa-miR-326	<i>HOTAIR</i>	0,6343	<i>MRPL20-AS1</i>	0,2129
		<i>SNHG1</i>	0,5241	<i>SNHG29</i>	0,2129
		<i>EWSAT1</i>	0,5221	-	-
		<i>SNHG1</i>	0,4608	-	-
	hsa-miR-378g	<i>H19</i>	0,3878	-	-
		<i>HOXA10I</i>	0,1611	<i>C17orf102</i>	0,2136
	hsa-miR-500b-5p	<i>LINC00324</i>	0,1611	-	-
		<i>MEG3</i>	0,3126	<i>SNHG16</i>	0,3118
	hsa-miR-4737	<i>SNHG16</i>	0,3118	-	-
		-	-	<i>RAD51-AS1</i>	0,3024
MiRNA Grubu	MiRNA	Güçlü Deneysel Kanıt		Zayıf Deneysel Kanıt	
		lncRNA	Skor	lncRNA	Skor
6 DEM Grubu	hsa-miR-181c-5p	-	-	<i>RRN3P2</i>	0,2129
		-	-	<i>IPW</i>	0,2129
		<i>PVT1</i>	0,4648	<i>PVT1</i>	0,4648
	hsa-miR-497-5p	<i>XIST</i>	0,4613	<i>SNHG16</i>	0,4109
		<i>SNHG16</i>	0,4109	<i>EPB41L4A-AS1</i>	0,2129
		<i>GACAT3</i>	0,3688	<i>MCM3AP-AS1</i>	0,2129
		<i>MALAT1</i>	0,1611	<i>LINC00339</i>	0,2129
		-	-	<i>TEX41</i>	0,2129
		-	-	<i>LINC02035</i>	0,2129
		-	-	<i>CTBP1-DT</i>	0,2129
		-	-	<i>MRPL20-AS1</i>	0,2129
	hsa-miR-520e	<i>SNHG16</i>	0,5521	<i>SNHG16</i>	0,5521
		<i>MIR17HG</i>	0,4041	<i>MIR17HG</i>	0,4041
	hsa-miR-769-5p	-	-	<i>LINC00598</i>	0,2114
		<i>SNHG16</i>	0,2328	<i>SNHG16</i>	0,2328
	hsa-miR-4754	-	-	<i>NORAD</i>	0,3693
		-	-	<i>LINC01551</i>	0,1174
	hsa-miR-5691	-	-	-	-

4.4.2.4. DEM'lerin KEGG yolak zenginleştirme analizleri

Belirlenen 2 DEM grubunda yer alan miRNA'ların KEGG yolak zenginleştirme analizlerinde DIANA-miRPath (v.3.0) veri tabanı kullanılmıştır (Şekil 26).



Şekil 26. DEM gruplarının KEGG yolak zenginleştirme analizi (A) 5 DEM grubu (B) 6 DEM grubu.

4.4.2.5. DEM'lerin IPA ile fonksiyonel zenginleştirme analizi

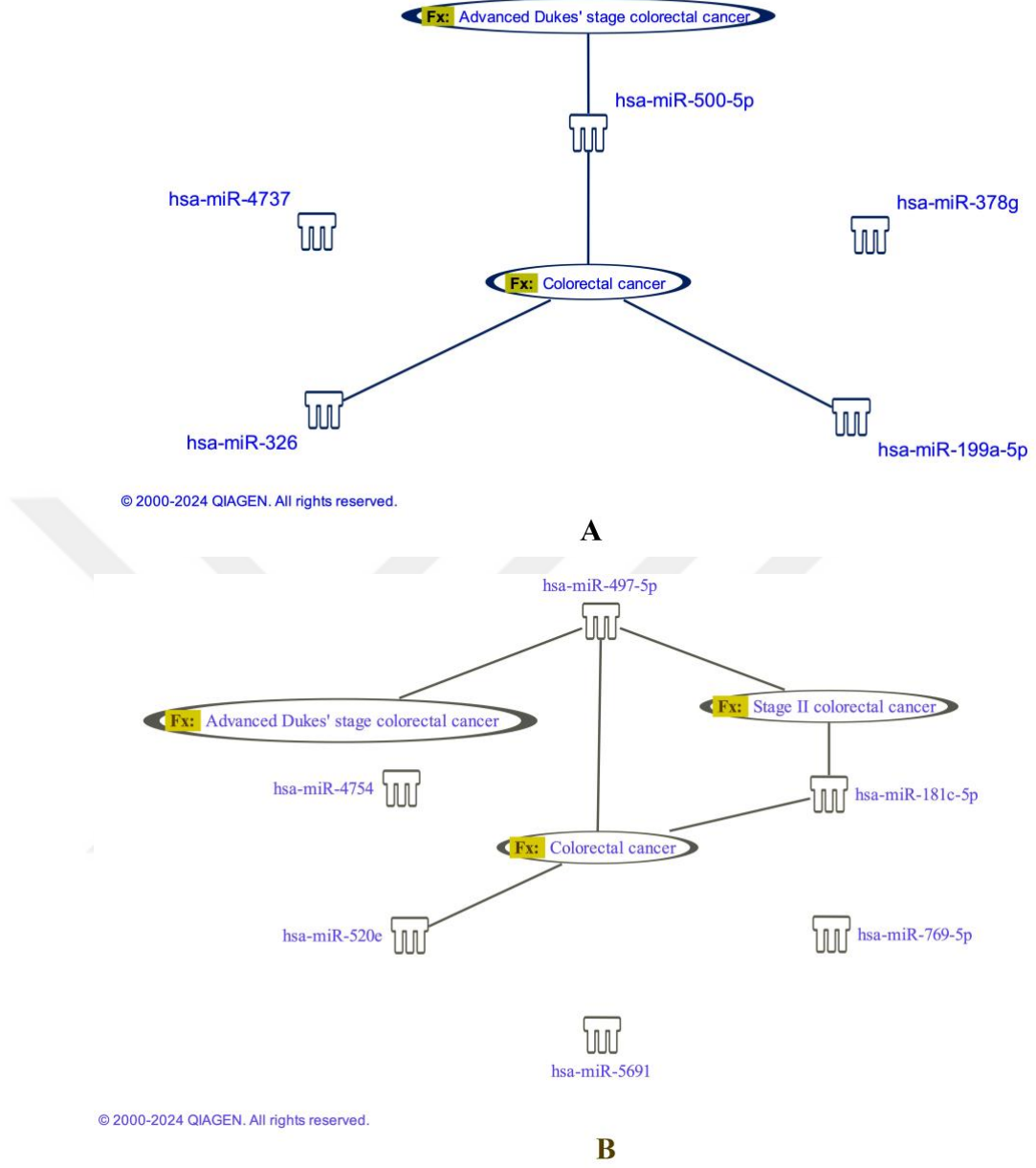
İki DEM grubunda yer alan miRNA'ların fonksiyonel zenginleştirme analizleri IPA yazılımı (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) ile tamamlanmıştır. İlgili DEM gruplarındaki en az 3 miRNA'nın dahil olduğu hastalık veya fonksiyon anotasyon sonuçları, p değerleri ve ilgili miRNA'lar Tablo 25'te verilmiştir. 6 DEM grubunda 3 miRNA'nın dahil olduğu hastalık yalnızca KRK olarak bulunmuştur ($p=4,03E-02$). Bununla birlikte, iki DEM grubunda kesişen tek hastalık "KRK" olarak saptanmıştır.

Tablo 25. CTC durumu ile ilişkili DEM'lerin IPA lisanslı yazılımı ile fonksiyonel analiz sonuçları.

DEM	Hastalık/Fonksiyonel Anotasyon	p Değeri	MiRNA
5 DEM	Colorectal cancer	1,22E-02	hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-326, hsa-miR-500-5p
	Cervical squamous cell carcinoma	2,42E-05	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-520e
	Cell proliferation of carcinoma cell lines	4,97E-04	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-520e
	Chronic inflammatory disorder	1,01E-03	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-769-5p
6 DEM	Apoptosis of tumor cell lines	3,96E-03	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-520e
	Inflammation of organ	4,26E-03	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-769-5p
	Inflammation of absolute anatomical region	6,87E-03	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-769-5p
	Prostate cancer	1,22E-02	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-520e
	Colorectal cancer	4,03E-02	hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-520e

Beş DEM grubundaki miRNA'lar için etkileşim sayısı 44 olarak bulunmuştur. Molekül sayısına göre sıraladığımızda 3 miRNA (hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-362-5p ve hsa-miR-500-5p) tarafından hedeflenen tek etkileşim "KRK" olarak bulunmuştur ($p=1,22E-02$) Buna ek olarak, hsa-miR-497-5p'nin Dukes evreleme sistemine göre ileri evre KRK ($p=1,95E-03$) ve evre II KRK ($p=1,48E-05$) ile anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir.

Altı DEM grubundaki miRNA'lar için etkileşim sayısı 122 olarak bulunmuştur. Molekül sayısına göre sıraladığımızda en az 3 miRNA tarafından hedeflenen kanserle ilişkili 8 farklı etkileşim bulunmuştur ($p<0,05$). Sekizinci sırada yer alan KRK ile etkileşimde yer alan 3 miRNA hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-520e'dir ($p=4,03E-02$). Ek olarak, hsa-miR-520e ile Dukes evreleme sistemine göre ileri evre KRK arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=1,46E-03$) (Şekil 27).



Şekil 27. IPA lisanslı yazılımı ile fonksiyonel zenginleştirme analizleri (A) 5 DEM grubu (B) 6 DEM grubu.

4.4.2.6. DEM'lerin TCGA verileri ile karşılaştırılması

Mikroarray veri analizlerinde tespit edilen 2 farklı DEM grubuna ait miRNA'ların ekspresyon profilleri TCGA veri tabanına ait COAD ve READ veri setlerindeki RNA-seq verileri ile CancerMIRNome veri tabanında karşılaştırılmıştır. Beş DEM grubuna ait hsa-miR-378g ve hsa-miR-4737 ve 6 DEM grubuna ait hsa-

miR-520e, hsa-miR-4754 ve hsa-miR-5691'in ilgili veri setlerinde ekspresyon değerlerine ulaşılammıştır. Diğer tüm miRNA'lara ait analiz sonuçları Tablo 26'da sunulmuştur. Beş DEM grubunda yer alan hsa-miR-199a-5p ve hsa-miR-500b-5p ve 6 DEM grubunda yer alan hsa-miR-181c-5p ve hsa-miR-769-5p COAD ve READ veri setleri ile karşılaştırıldığında sonuçlarımız ile uyumlu bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 26. DEM gruplarında yer alan miRNA'ların ekspresyon profillerinin TCGA veri setlerinde yer alan RNA-seq verileri ile karşılaştırılması.

DEM	MiRNA	Colon Adenocarcinoma (COAD)				
		logFC	p Değeri	Adj p Değeri	AUC	ROC p Değeri
5 DEM	hsa-miR-199a-5p	-0,812	1,23E-02	1,56E-02	0,79	9,51E-06
	hsa-miR-326	2,690	2,21E-06	3,75E-06	0,9	1,72E-08
	hsa-miR-500b-5p	-1,333	3,67E-03	4,87E-03	0,71	4,16E-25
6 DEM	hsa-miR-181c-5p	-0,025	9,40E-01	9,46E-01	0,52	4,12E-01
	hsa-miR-497-5p	0,467	1,84E-01	2,03E-01	0,66	1,54E-14
	hsa-miR-769-5p	-1,062	1,60E-06	2,74E-06	0,93	1,52E-104
DEM	MiRNA	Rectum Adenocarcinoma (READ)				
		logFC	p Değeri	Adj p Değeri	AUC	ROC p Değeri
5 DEM	hsa-miR-199a-5p	-0,641	2,68E-01	3,01E-01	0,72	1,10E-11
	hsa-miR-326	3,605	1,09E-06	2,46E-06	1	1,60E-57
	hsa-miR-500b-5p	-3,051	1,34E-06	2,98E-06	0,95	4,82E-46
6 DEM	hsa-miR-181c-5p	-0,594	2,35E-01	2,74E-01	0,74	1,95E-13
	hsa-miR-497-5p	0,714	1,31E-01	1,59E-01	0,79	5,56E-19
	hsa-miR-769-5p	-1,436	2,08E-04	3,62E-04	0,98	5,89E-54

$p<0,05$ değeri anlamlı olan sonuçlar tabloda **koyu** renkle gösterilmiştir (AUC: Area Under the Curve; ROC: Receiver Operating Characteristic).

Bununla beraber, veri setlerinde bulunan aynı miRNA'ların Kaplan Meier (KM) Survival Analysis analizleri tamamlanmıştır. Fakat, herhangi bir miRNA istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

KRK dünya genelinde kansere bağlı ölümler arasında ikinci ve en sık görülen üçüncü kanser türüdür (Sung ve ark., 2021). KRK gelişiminde, benign adenomlar aracılığıyla normal epitel hücrelerin malign karsinoma dönüşmesi ve metastazla sonuçlanması çok basamaklı bir süreçtir (Dekker ve ark., 2019).

Likit biyopsi, kanserin klinik yönetiminde son yıllarda tercih edilen önemli bir hassas tıp yaklaşımıdır (Imamura ve ark., 2016). Doku biyopsi yöntemine göre avantajları olan likit biyopsi yöntemi ile dolaşımdaki tümör belirteçlerinin analizleri kanser araştırmaları için önem kazanmıştır (Joshi, 2023).

Günümüzde, klinikte mKRK risk değerlendirilmesi ve buna bağlı olarak tedavi yönetimi için geliştirilen moleküler imzalarının saptanması, spesifik hasta alt gruplarına yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının belirlenmesini kolaylaştırmaktadır. Genetik ve epigenetik analizler ile kişiye özgü tedavi seçimine ve daha az sayıda hastanın etkisiz tedavilerden toksisiteye maruz kalmaması amaçlanmaktadır (Filip ve ark., 2020). Buna bağlı olarak, mKRK için önemli bir likit biyopsi belirteci olan CTC'lerin rutin kullanımlarının aşağıda bahsedilen ve klinikte boşluk bulunan önemli kısımları doldurma potansiyeli yüksektir (Petrik ve ark., 2022). Bu klinik uygulamalar;

- Hastalara uygulanacak tedavinin seçimi ve bu tedavi sürecinin izlenmesi,
- Kemoterapi yanıtının izlenmesi ve CTC sayısı ile kemoterapinin duyarlılığının tespiti,
- CTC'lerin *EGFR* ve *KRAS* durumları ile hedefe yönelik tedavilerin belirlenmesi,
- CTC (+) olan hastalarda daha kısa PFS'nin belirlendiği için hastanın takibi,
- Cerrahi rezeksiyondan sonra CTC (-) olan hastaların tedavi yanıtının izlenmesi,
- CTC'lerin tek veya CTC kümeleri olarak analizleri ile heterojenitenin belirlenmesi,
- CTC'lerin, ctDNA ve primer tümör dokusu ile genetik profillerinin karşılaştırılması ile heterojenitenin belirlenmesi şeklinde sıralanabilir.

Diğer bir likit biyopsi analiti olan dolaşımdaki miRNA ekspresyonlarının metastatik süreci predikte etme potansiyelleri gösterilmiş olsa da henüz KRK metastazını predikte edebilecek ve risk değerlendirmesinde kullanılabilecek hassas ve

özgül miRNA kombinasyonları geliştirilememiştir (Niu ve ark., 2021; Wen ve ark., 2020). Güncel literatürde KRK hastalarının serum örneklerinde hsa-miR-29, hsa-miR-200c, hsa-miR-203 gibi farklı miRNA ekspresyon seviyelerinin karaciğer metastazı ve ileri tümör evreleri ile anlamlı derecede ilişkilendirilmiştir (Hur ve ark., 2017; Toiyama ve ark., 2014; Wang, & Gu, 2012). Dolayısıyla, literatürdeki bu çalışmaların sayısı artarak mevcut eksiklikler tamamlandığında, KRK hastalarının miRNA analizleri ile mevcut klinik yaklaşımlara tamamlayıcı bir yaklaşım sağlanacaktır.

Tez çalışmasında CTC durumuna göre sınıflandırılmış mKRK'lı hasta gruplarının ve SK'lerin kan örneklerinde mikroarray analizi ile miRNA profillemesi gerçekleştirilmiş ve CTC varlığı/yokluğu ile dolaşımda ekspresyonu değişen miRNA imzaları araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 48 hastanın CTC durumları *CEA*, *EGFR* ve *EpCAM* belirteçlerine göre AdnaTest yöntemi ile tespit edilmiş ve 18 örnek CTC (-), 30 örnek ise CTC (+) olarak değerlendirilmiştir. CTC araştırmalarının en büyük zorluğu olarak bilinen CTC'lerin tespiti ve izolasyonu göz önüne alındığında, CTC varlığını işaret eden dolaşımdaki miRNA'ların tümör agresifliğini ve metastazı daha hassas bir şekilde predikte edebileceği düşünülmektedir. Araştırma kapsamında gruplandırma CTC (+) ve CTC (-) ve SK olmak üzere toplam 3 farklı şekilde tasarlanmıştır. Gruplar arası değerlendirmeler yapılarak DEM'ler belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen mikroarray verisinin istatistiksel analizlerinde CTC (+)/CTC (-), CTC (+)/SK, CTC (-)/SK ve mKRK/SK ikili grup ve CTC (+)/CTC (-)/SK üçlü grup olmak üzere 5 farklı şekilde birbiri ile kıyaslanmıştır. Yapılan analizlerde her bir grup kıyaslaması için ilk 10 DEM belirlenmiştir. CTC (+)/CTC (-) grubunda p değeri en anlamlı miRNA hsa-miR-6890-5p ($p=4,47E-04$) olarak bulunurken CTC (-)/SK grubunda ise hsa-miR-500b-5p ($p=1,03E-04$) olarak saptanmıştır. CTC (+)/SK ve mKRK/SK gruplarında kesişen p değeri (sırasıyla $p=4,21E-03$, $p=9,79E-05$) en anlamlı ve ilk sırada yer alan miRNA hsa-miR-141-3p olarak tespit edilmiştir. Üç farklı grupta ilk 10 DEM arasında en fazla kesişim gösteren DEM'ler ise hsa-miR-15b-3p, hsa-miR-141-3p ve hsa-miR-190a-5p olarak belirlenmiştir. İkili grup kıyaslanmalarında $p<0,05$ altında ve $FC\geq 2$ veya ≤ -2 aralığında ve anlamlı bulunan DEM'lerin hedef genleri ile KEGG ve GO zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiş ve anlamlı ilk 10 KEGG ve GO terimleri listelenmiştir. Tüm gruplarda ilk 10 KEGG terimi içinde yer alan 3 terim; "Pathways

in cancer", "HTLV-I (Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1) infection", "Protein processing in ER" olarak bulunmuştur. Bu yollar içinde HTLV-I enfeksiyonu gibi onkojenik viral enfeksiyonlar dünya çapında kanser türlerinin yaklaşık %10-15'inden sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu virüsler kronik inflamasyon, hücrel transformasyon ve immün baskılama gibi çeşitli mekanizmalarla karsinogenezi tetikleyebilmektedir (Koya ve ark., 2021).

İkili grup kıyaslamalarında kesişen iki DEM grubuna ait miRNA'lar ile ileri biyoinformatik analizler tamamlanmıştır. CTC (+)/CTC, CTC (-)/SK ve mKRK/SK kıyaslamasında 5 DEM olarak hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-326, hsa-miR-378g, hsa-miR-500b-5p ve hsa-miR-4737 tespit edilirken CTC (+)/SK ve mKRK/SK kıyaslamasında 6 DEM olarak hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-4754 ve hsa-miR-5691 saptanmıştır. Bu 2 DEM grubundaki miRNA'lar CTC tespiti için aday niteliğindedir ve ileri validasyon çalışmaları için öncelikli miRNA'lardır.

Bununla birlikte, belirlenen DEM gruplarında yer alan miRNA'ların hedef genleri in silico analizlerle belirlenmiştir. 6 DEM grubunda yer alan 4 miRNA tarafından hedeflenen ve en yüksek sayıda miRNA'nın hedeflediği gen *RPS6KA3* (Ribosomal Protein S6 Kinase A3) olarak bulunmuştur. Cai ve arkadaşları, KRK'de *RPS6KA6* geninin ekspresyonunun azaldığını ve bu değişikliğin klinik-patolojik özellikler ve genel sağkalım ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (J. Cai ve ark., 2014).

İki DEM grubu için ortak hedef olarak bulunan genlerin TCGA ve GTEx veri tabanlarına ait COAD ve READ veri setlerinde ekspresyon profilleri belirlenmiştir. Altı DEM grubu içinde ortak hedeflenen genler arasında *AKT3*, *CREBRF* ve *PTBP3* genleri anlamlı bulunurken 5 DEM grubu içinde yalnızca *GPD2* geni anlamlı bulunmuştur. İlgili veri setlerinde *GPD2* ve *PTBP3* ekspresyonları artarken; *AKT3* *CREBRF* genlerinin ekspresyonları azalmıştır.

Ek olarak, hedef genlerin patolojik evre analizlerinde *AKT3* ($\text{Pr}(> F) = 0,0373$) ve *PLAG1* ($\text{Pr}(> F) = 8,8E-06$) genlerinin diferansiyel ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). *AKT3* geni bir onkogen olarak fonksiyon göstermektedir ve *AKT3*'ün aşırı ekspresyonu, *p53*, *p21* ve *p27* regülasyonunun azalmasına ve *Cyclin D1*, *Bcl2* ve *XIAP* regülasyonunun artmasına yol açmaktadır (Li ve

ark., 2017). *PLAG1* geni, farklı kanser türleriyle ilişkili bir onkogen olarak bilinmektedir (Juma ve ark., 2016).

Hedef genlerle ilgili son olarak, TCGA ve GTEx veri tabalarına ait hastaların aylık sağkalım sürelerine göre OS analizi yapılmıştır. Yapılan OS analizlerinde 6 DEM grubu içinde hedeflenen *PLAG1* geni istatistiksel olarak anlamlı (log-rank $p=0,0052$) olduğu gözlenmiştir. Patolojik evre ve OS analizlerinde ortak istatistiksel olarak anlamlı bulunan tek gen *PLAG1* geni olarak saptanmıştır.

DEM gruplarında yer alan miRNA'ların transkripsiyon faktör etkileşimleri analiz edilmiştir. Sonuçta, 5 DEM grubuna ait 9 TF, 6 DEM grubuna ait 4 TF istatistiksel olarak anlamlı TF bulunmuştur ($p<0,05$). BET (Bromodomain and Extra-Terminal Domain) protein ailesinde yer alan *BRD2* (Bromodomain Containing 2) nükleozomal histonlardaki asetillenmiş lizin kalıntıları gibi epigenetik belirteçleri tanımaktadır ve çeşitli insan kanserlerinin oluşumu ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Doroshov, Eder, & LoRusso, 2017). Çeşitli çalışmalar BET proteinlerinin kromatini yeniden düzenlemesi ile hücre döngüsünü, proliferasyonu ve metastazı regüle ettiğini bildirmiştir (Tian ve ark., 2020).

Buna ek olarak, 5 DEM ve 6 DEM grubunda yer alan miRNA'larla interaksiyonu olan lncRNA'ların belirlenmiştir. En fazla sayıda miRNA ($n=4$) tarafından hedeflenen lncRNA *SNHG16* olarak bulunmuştur. Wang ve arkadaşları, *SNHG12*'nin KKK hücrelerinde hücre büyümesini arttırdığını ve hücre apoptozunu inhibe ettiğini keşfederek KKK için yararlı bir biyobelirteç olabileceğini göstermiştir (Wang, Xu, Wu, & Shen, 2017).

Gruplardaki miRNA'lara yönelik tamamlanan fonksiyonel zenginleştirme analizinde ECM-reseptör etkileşimi, kanserde proteoglikanlar, Hippo sinyal yolağı iki DEM grubu içinde ortak bulunmuştur. ECM-reseptör etkileşim yolağı, tümör sheeding, tümör adhezyonu, tümör degradasyonu, migrasyon ve hiperplazi süreçlerinde önemli rol oynamaktadır (Bao ve ark., 2019). Hücre yüzeyinin ve hücre mikroçevresinin temel moleküler efektörleri olan proteoglikanlar, neoplastik büyümeyi ve neovaskülarizasyonu düzenleyen ligandlar ve reseptörlerle etkileşime girme yetenekleri sayesinde kanserde ve anjiyogeneizde birçok işlevi yerine getirmektedir (Iozzo, & Sanderson, 2011). Hippo sinyal yolağı, proliferasyon ve apoptoz da dahil olmak üzere tümör oluşumunda görevli birçok hücresel süreci kontrol

ederek farklı kanser türlerinde sıklıkla disregüle olduğu bilinmektedir (Harvey, Zhang, & Thomas, 2013). Bununla birlikte, iki DEM grubunda yer alan miRNA'ların fonksiyonel zenginleştirme analizlerinde en az 3 miRNA'nın dahil olduğu kesişen tek hastalık KRK'dir. Tez çalışması kapsamında mKRK hasta örneklerinde mikroarray analizi tamamlandığı için miRNA fonksiyonel analizlerinde 2 DEM grubu için kesişen tek hastalığın KRK olması sonuçlarımızla uyumlu olduğunu göstermektedir.

Son olarak, tespit edilen 2 farklı DEM grubuna ait miRNA'ların TCGA veri tabanına ait COAD ve READ veri setlerindeki doku örneklerine ait RNA-seq verileri ile karşılaştırılmıştır. Beş DEM grubunda yer alan hsa-miR-199a-5p ve hsa-miR-500b-5p'in ekspresyonu veri setleri ile uyumlu iken hsa-miR-326'nın ekspresyonu veri setlerinde yer alan ekspresyon durumu ile zıt bulunmuştur. Altı DEM grubunda yer alan hsa-miR-181c-5p ve hsa-miR-769-5p'nin ekspresyonu veri setlerinde ile paralellik gösterirken hsa-miR-497-5p'nin ekspresyonu veri setlerinde ile ters olduğu saptanmıştır.

Mikroarray veri analizinde CTC (+)/CTC, CTC (-)/SK ve mKRK/SK kıyaslamasında belirlenen 5 DEM (hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-326, hsa-miR-378g, hsa-miR-500b-5p ve hsa-miR-4737) ve CTC (+)/SK ve mKRK/SK kıyaslamasında saptanan 6 DEM (hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-4754 ve hsa-miR-5691) gruplarında yer alan miRNA'ların ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiştir.

Beş DEM Grubundaki MiRNA'lar

hsa-miR-199a-5p ile ilgili yapılan çalışmalar farklı kanser türlerinde bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü göstermiştir. hsa-miR-199a-5p'nin, oral skuamöz hücreli karsinomda *IKBKB*'yi (Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta) hedefleyerek NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) yolağının düzenlenmesi ile bir tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı tespit edilmiştir (Wei ve ark., 2019). Pek çok çalışmada farklı kanser türünde hsa-miR-199a-5p'nin ekspresyonunu azaldığını ve buna bağlı olarak tümör baskılayıcı fonksiyonlarını tanımlamıştır (Q. Wang ve ark., 2019; Wei ve ark., 2019; Ye ve ark., 2015). Hu ve arkadaşları, KRK dokularında ve hücre hatlarında hsa-miR-199a-5p ekspresyonunun azaldığını ve tümör progresyonu ile ilişkili hedeflediği *DDR1*'in (Discoidin Domain Receptors 1) buna bağlı olarak ekspresyonun önemli miktarda arttığını tespit etmişlerdir. hsa-miR-199a-5p'nin aşırı

ekspresyonuyla DDR1'in inhibisyonu, KRK hücrelerinde hücre çoğalmasının, migrasyonun ve invazyonun azalmasıyla sonuçlanmıştır. Bu nedenle, *DDR1* ekspresyonu, EMT sürecini destekleyerek KRK ilerlemesine yol açabileceğini önermişlerdir (Hu ve ark., 2014). Bununla beraber, son yıllarda hsa-miR-199a-5p'nin KRK neoplazisi için umut verici bir biyobelirteç olduğu belirtilmiştir (Coleman, & Kuwada, 2024; Zhao ve ark., 2022). Tez çalışmasında tamamlanan mikroarray sonucunda mKRK/SK grup kıyaslamasında hsa-miR-199a-5p anlatımının azaldığı (logFC=-2,477) ve CTC (+)/CTC (-) grup kıyaslamasında ise CTC (+) grubunun ortalamasının CTC (-) grubunun ortalamasına göre anlatımın arttığı (logFC=2,88) bulunmuştur.

hsa-miR-326 ile ilgili yapılan araştırmalarda bu miRNA'nın düşük ekspresyonun kötü progresyon, tümör gelişimi, metastaz ile önemli ölçüde ilişkili olduğu raporlanmıştır (Pan, Wan, & Wang, 2019). Buna ek olarak, azalmış hsa-miR-326 ekspresyonunun, farklı kanser türlerinde metastaz riski ile pozitif bir ilişkisi olduğu belirtilmiştir (Pan ve ark., 2019). Literatürde hsa-miR-326'nın bir tümör baskılayıcı gen olarak görev yapabileceğine ve birçok kanser türünde tümör prognozu ile ilişkili olduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (Liang ve ark., 2018; Pan ve ark., 2019; Wu ve ark., 2015). Buna ek olarak, KRK'da hsa-miR-326'nın, *E2F1*'i (E2F Transcription Factor 1) doğrudan inhibe ederek KRK hücrelerinin çoğalmasını tersine çevirebildiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Bao ve ark., 2021). Tez çalışmasının mikroarray sonucunda mKRK/SK grup kıyaslamasında hsa-miR-326 anlatımının azaldığı (logFC=-2,302) ve CTC (+)/CTC (-) grup kıyaslamasında ise CTC (+) grubunun ortalamasının CTC (-) grubunun ortalamasına göre anlatımın arttığı (logFC=2,509) bulunmuştur.

hsa-miR-378g ile yapılan çalışmalarda miR-378 ailesine ait miRNA'ların anlatımının azalması ile hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi birçok hücreyel yolağı etkilediği gösterilmiştir (Cui, Dai, Liu, & Cao, 2021; W. Li ve ark., 2020; Zhang, Zhou, Xiao, Li, & Zhou, 2014). Bu miRNA'nın KRK dokusunda tanı ve tedavi için non-invaziv bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (G. J. Zhang ve ark., 2014). Bu aile üyelerinden biri olan hsa-miR-378g'nin larinks kanseri ve oral skuamöz hücreli karsinom dahil olmak üzere farklı türde kanserlerde tümör baskılayıcı bir rol oynayabileceği bildirmiştir (Cui ve ark., 2021; W. Li ve ark., 2020). Gungormez

ve arkadaşları, evre II KRK hastalarının doku örneklerinde yaptıkları miRNA mikroarray çalışmasında literatürde ilk kez KRK hasta grubunda hsa-miR-378g'in ekspresyonunun KRK hasta örneklerinde azaldığını tespit etmişlerdir (Gungormez, Gumushan Aktas, Dilsiz, & Borazan, 2019). Tez çalışmasının mikroarray sonucunda mKRK/SK grup kıyaslamasında hsa-miR-378g anlatımının azaldığı ($\log FC = -2,483$) ve CTC (+)/CTC (-) grup kıyaslamasında ise CTC (+) grubunun ortalamasının CTC (-) grubunun ortalamasına göre anlatımın arttığı ($\log FC = 3,115$) bulunmuştur. Bu kapsamda, Gungormez ve arkadaşlarının sonuçları ile araştırma sonuçlarımızın uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

hsa-miR-500b-5p ile ilgili yapılan kanser çalışmaları diğer miRNA'lara göre oldukça sınırlıdır. Rong ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada hsa-miR-500b-5p'nin oral skuamöz hücreli karsinom gelişimini inhibe ettiği ilk kez doğrulanmıştır (Rong ve ark., 2022). İlgili çalışmada hsa-miR-362-5p ve hsa-miR-500b-5p'nin oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde *RNF145*'i (Ring Finger Protein 145) doğrudan hedeflediği gösterilerek ve bu hücrelerde yüksek *RNF145* ekspresyon seviyesi doğrulanmıştır. Ayrıca, *RNF145* anlatımının azalmasının oral skuamöz hücreli karsinomu inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Rong ve ark., 2022). Tez çalışmasının mikroarray sonucunda mKRK/SK grup kıyaslamasında hsa-miR-500b-5p'nin anlatımının azaldığı ($\log FC = -3,618$) ve CTC (+)/CTC (-) grup kıyaslamasında ise CTC (+) grubunun ortalamasının CTC (-) grubunun ortalamasına göre anlatımın arttığı ($\log FC = 2,665$) bulunmuştur. Böylece, güncel literatüre göre hsa-miR-500b-5p'nin ilk kez bu çalışmada KRK ile ilişkili aday miRNA olduğu sunulmuştur. Ek olarak, mKRK/SK grup kıyaslamasında 5 DEM grubunda $\log FC$ değerlerine göre anlatımı en çok azalmış miRNA'dır.

hsa-miR-4737 ile ilgili yapılan araştırmalarda kanser türüne göre anlatım profili değişkenlik göstermiştir. Gaballah ve arkadaşları, prostat kanseri hücre hattından köken alan küçük hücre dışı veziküllerde hsa-miR-4737'nin anlatımın arttığını tespit etmiştir (Gaballah ve ark., 2022). 2021 yılında Stang ve arkadaşları KRK hasta grubuna ait kan örneklerinde miRNA mikroarray analizi gerçekleştirmiştir. İlgili çalışma kapsamında tamamlanan biyoinformatik analizlerde mKRK hasta grubunda hsa-miR-4737'nin anlatımının azaldığı tespit edilmiştir (Stang ve ark., 2021). Tez çalışmasının mikroarray sonucunda mKRK/SK grup kıyaslamasında hsa-miR-

4737'nin anlatımının azaldığı ($\log FC = -2,415$) ve CTC (+)/CTC (-) grup kıyaslamasında ise CTC (+) grubunun ortalamasının CTC (-) grubunun ortalamasına göre anlatımın arttığı ($\log FC = 2,841$) bulunmuştur. Buna bağlı olarak, Stang ve arkadaşlarının sonuçları ile araştırma sonuçlarımızın uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Beş DEM grubuna ait miRNA'larla ilgili güncel literatürde tamamlanan çalışmaların sonuçları ile tez çalışmasında anlatımı azalmış olarak bulunan DEM grubu sonuçları ile paralellik göstermektedir. mKRK/SK grup kıyaslamasında anlatımları azalmış olan bu miRNA'lar CTC (+)/CTC (-) grup kıyaslamasında ise CTC (+) grubunun CTC (-) grubuna göre ekspresyon değerlerinin göreceli olarak arttığı gözlenmiştir. Tez çalışması kapsamında tamamlanan biyoinformatik analizlerde hsa-miR-326'nın COAD ve READ veri setlerinde anlatımının arttığı gözlenmiş ($\log FC = 2,69$ ve $\log FC = 3,605$) ve 5 DEM grubu içinde anlatımı sonuçlarımız ile zıt olan tek miRNA olarak belirlenmiştir. Buna rağmen, literatürde hsa-miR-326'nın tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı ve sonuçlarımızın uyumlu olduğu bulunmuştur.

Altı DEM Grubundaki MiRNA'lar

hsa-miR-181c-5p ile ilgili yapılan araştırmalarda bu miRNA'nın miR-181 ailesinin bir üyesi olduğu ve çeşitli kanser türlerinde tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı saptanmıştır. Slattery ve arkadaşları, kolon adenokarsinoma ait doku örneklerinde hsa-miR-181c-5p'nin normal kolon dokusuna göre anlatımının anlamlı derecede azaldığını tespit etmişlerdir ($p < 0,001$) (Slattery ve ark., 2016). Abd ElAziz ve arkadaşları, hepatosellüler karsinomda in vitro ve in vivo olarak hsa-miR-181c-5p'nin anlatımın arttığını ve onkogenik özellik gösterdiğini bulmuşlardır. Buna rağmen, hsa-miR-181c'nin metastatik nöroblastom, meme kanseri, glioblastoma ve mide kanserinde anlatımının azaldığı ve bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü gösterilmiştir (Abd Elaziz, Mabrouk, Dahou, & Chelloug, 2022). Li ve arkadaşları, hsa-miR-181c-5p'nin, laringeal skuamöz hücreli karsinom hücre hatlarında *SERPINE1*'nin (Serp Family E Member 1) anlatımını baskılayarak, bir EMT baskılayıcı miRNA rolü oynadığını ve metastazı önlemek için yeni stratejiler sunabileceğini göstermişlerdir (X. Li ve ark., 2020). Tez çalışmasının mikroarray sonucunda CTC (+)/SK ve mKRK/SK grup kıyaslamalarında hsa-miR-181c'nin anlatımının azaldığı (sırasıyla $\log FC = -3,457$; $\log FC = -3,063$) bulunmuştur. CTC

(+)/SK ve mKRK/SK grup kıyaslamalarında 6 DEM grubunda logFC değerlerine göre anlatımı en çok azalmış miRNA'dır.

hsa-miR-497-5p ile yapılan çalışmalar sonucunda bu miRNA küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve KRK türlerinde tümör baskılayıcı bir miRNA olarak önerilmiştir (Huang, Wang, Liu, & Li, 2019; Xu ve ark., 2017). Xu ve arkadaşları, hsa-miR-497'nin, *IRS1* (Insulin Receptor Substrate 1) inhibisyonu ile KRK hücre büyümesinin baskılanmasında önemli bir rol oynadığına dair ilk kanıtı sunmuştur (Xu ve ark., 2017). Guo ve arkadaşları, hsa-miR-497'nin, *IGF1-R* (Insulinlike Growth Factor 1 Receptor) anlatımının inhibe edilmesinde ve PI3K/Akt aktivasyonunda, buna bağlı olarak, insan kolon kanseri hücrelerinde proliferasyonun, hayatta kalmanın ve invazyonun baskılanmasında önemli bir role sahip olduğuna dair kanıtlar sunmuştur (Guo ve ark., 2013). Fridrichova ve arkadaşları, endometriyal kanserin ileri evrelerinde hsa-miR-497-5p'nin ekspresyonun azalmasının hastalığa daha agresif bir özellik kazandırdığını saptamışlardır (Fridrichova ve ark., 2020). Tian ve arkadaşları, hsa-miR-497-5p'nin hepatosellüler karsinomda anlatımının arttığını ve hsa-miR-497-5p'nin yüksek ekspresyonunun tümör boyutunun ve sayısının artmasına yol açtığını bildirmiştir. Bu nedenle, hsa-miR-497-5p'nin hepatosellüler karsinomda onkomiR ya da tümör baskılayıcı miRNA olarak rol oynadığı hala tartışmalıdır (Tian ve ark., 2021). Tez çalışmasının mikroarray sonucunda CTC (+)/SK ve mKRK/SK grup kıyaslamalarında hsa-miR-497-5p'nin anlatımının azaldığı (sırasıyla logFC=-3,088; logFC=-2,904) bulunmuştur.

hsa-miR-520e ile ilgili yapılan KRK çalışmaları oldukça sınırlıdır. Lv ve arkadaşları, hsa-miR-520e'nin *AEG-1*'i (Astrocyte Elevated Gene 1) baskılayarak KRK hücre büyümesini ve invazyonu baskıladığını tespit etmişlerdir (Lv ve ark., 2020). Ji ve arkadaşları, hsa-miR-520e'nin kolon kanseri doku örneklerinde qRT-PCR yöntemi ile anlatımının arttığını saptamışlardır (Ji, Gu, Zhang ve Xu, 2023). Zhang ve arkadaşları, glioma hücrelerinde hsa-miR-520e'nin ekspresyonun azaldığını ve hücre çoğalmasını ve invazyonu baskıladığını göstermişlerdir (Zhang, Cao, Jia, & Wei, 2019). Tez çalışmasının mikroarray sonucunda CTC (+)/SK ve mKRK/SK grup kıyaslamalarında hsa-miR-520e'nin anlatımının azaldığı (sırasıyla logFC=-3,118; logFC=-2,805) bulunmuştur.

hsa-miR-769-5p ile yapılan araştırmalar incelendiğinde bu miRNA'nın onkomiR veya tümör baskılayıcı özelliği olduğu gösterilmiştir. Xian ve arkadaşları, hsa-miR-769-5p ekspresyonu hepatoselüler karsinomda ekspresyonu arttığını ve bu yüksek ekspresyonun kötü prognoz ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Ek olarak, hsa-miR-769-5p'nin hepatoselüler karsinom hücrelerinin büyümesini ve metastazı teşvik ettiği bulunmuştur (Xian ve ark., 2019). 2021 yılında hsa-miR-769-5p'nin prostat kanserinde bir onkogen olan *ARHGAP10*'u (Rho GTPase Activating Protein 10) hedefleyerek tümör baskılayıcı rolünü ortaya koymuştur (Lee, 2021). Han ve arkadaşları, KRK dokularında hsa-miR-769 ekspresyonun azaldığını ve anlatım seviyesinin KRK hastalarının prognozu ile negatif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Ek olarak, hsa-miR-769'un, *HEY1*'i (Hairy/Enhancer-Of-Split Related with YRPW Motif 1) hedefleyerek KRK hücrelerinin çoğalmasını ve istilasını baskıladığını göstermişlerdir (Han, Song, & Lian, 2018). Tez çalışmasının mikroarray sonucunda CTC (+)/SK ve mKRK/SK grup kıyaslamalarında hsa-miR-769-5p'nin anlatımının azaldığı (sırasıyla logFC=-3,069; logFC=-2,861) bulunmuştur.

hsa-miR-4754 ile yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Slattey ve arkadaşları, kolon adenom doku örneklerinde hsa-miR-4754'nin normal kolon dokusuna göre anlatımının anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$) (Slattey ve ark., 2016). Ek olarak, Yang ve arkadaşları, hsa-miR-4754'nin akciğer adenokarsinomanın patolojik evrelemede tanısal bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Yang, Yin, Shi ve Qian, 2020). Tez çalışmasının mikroarray sonucunda CTC (+)/SK ve mKRK/SK grup kıyaslamalarında hsa-miR-4754'ün anlatımının azaldığı (sırasıyla logFC=-2,772; logFC=-2,588) bulunmuştur.

hsa-miR-5691 ile yapılan kanser araştırmaları da oldukça sınırlıdır. Watahiki ve arkadaşları, metastatik ve non-metastatik prostat kanseri hasta örneklerine ait RNA sekans kütüphanelerinin karşılaştırmalı analiz sonuçlarında, hsa-miR-5691'i anlamlı diferansiyel ekspresyon gösteren miRNA'lar arasında tespit etmişlerdir (Watahiki ve ark., 2011). Lai ve arkadaşlarının tamamladığı biyoinformatik çalışmada meme kanserinin nüksü için potansiyel bir DEM olabileceğini raporlamışlardır (Lai ve ark., 2019). Tez çalışmasının mikroarray sonucunda CTC (+)/SK ve mKRK/SK grup kıyaslamalarında hsa-miR-5691'in anlatımının azaldığı (sırasıyla logFC=-2,847; logFC=-2,663) bulunmuştur.

Altı DEM grubuna ait miRNA'larla ilgili literatürde tamamlanan güncel çalışmaların sonuçları ile tez çalışmasında anlatımı azalmış olarak bulunan bu DEM grubu sonuçları ile paralellik göstermektedir. CTC (+)/SK ve mKRK/SK kıyaslamasında saptanan 6 DEM grubuna ait miRNA'ların anlatımları azalmıştır. Tez çalışması kapsamında tamamlanan biyoinformatik analizlerde hsa-miR-497-5p COAD ve READ veri setlerinde anlatımının arttığı gözlenmiş ($\log FC=0,467$ ve $\log FC=0,714$) ve 6 DEM grubu içinde anlatımı sonuçlarımız ile zıt olan tek miRNA olarak belirlenmiştir. Literatürde hsa-miR-497-5p'nin farklı kanser türlerinde onkomiR ya da tümör baskılayıcı miRNA olarak rol oynadığı hala tartışmalıdır. Bu nedenle literatür, veri setleri ve çalışma sonuçlarımız arasındaki farklılıklar ileri validasyon çalışmalarını gerektirmektedir.

Çalışmamızda elde edilen 2 DEM grubuna ait sonuçlar, KRK patogenezindeki karmaşık düzenleyici rollerini vurgulayarak kanser yönetiminde hem tanısal bir biyobelirteç hem de terapötik hedef olarak kullanım potansiyellerini vurgulamaktadır. Yapılan istatistiksel ve biyoinformatik analizlerin sonucuna göre CTC durumu ile ilişkili miRNA'lar ileri araştırmalarımız için aday olarak belirlenmiştir. Aday miRNA'lar mKRK risk değerlendirmesinde ve mKRK ilişkili CTC tespitinde kullanım potansiyeli yüksek olarak değerlendirilmiştir.

Yukarıda belirtilen iki 2 DEM grubuna ek olarak, sadece CTC (+) ve SK gruplarında kesişen 2 DEM (hsa-miR-520b ve hsa-miR-6071) saptanmıştır ($p=4,93E-02$ ve $p=4,35E-02$). hsa-miR-520b ve hsa-miR-6071 miRNA'ların CTC durumu ile ilişkili olabileceği ön görülmektedir. Mikroarray verilerinde anlatımı SK grubuna göre anlatımı azalmış bu miRNA'ların $\log FC$ değerleri sırasıyla $\log FC=-2,65$ ve $\log FC=-2,97$ olarak bulunmuştur. Lu ve arkadaşları, hsa-miR-520b'yi, EMT mekanizması yoluyla hücresel göçü ve istilayı inhibe ettiği için baş ve boyun kanserini baskılamada yeni bir moleküler hedef olarak tanımlamışlardır. Çalışma sonuçları hsa-miR-520b'nin tümör oluşumunda ve metastazı baskılamada yüksek bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Y. C. Lu ve ark., 2017). 2020 yılında Zhou ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada glioblastoma hücre hatlarında hsa-miR-6071'nin *ULBP2* (UL16 Binding Protein 2)'ye bağlanarak PI3K/Akt/mTOR yolağının inhibisyonu ile hücre çoğalmasını, göçünü ve istilasını baskılamanın yanı sıra apoptozu teşvik etme potansiyeline sahip olduğu göstermiştir. Böylece, hsa-miR-6071'in glioblastomada

tümör baskılayan bir gen olabileceği düşünülmektedir (Zhou, An, & Wu, 2020). Tez çalışmasında hsa-miR-520b ve hsa-miR-6071'in anlatımı azalması ile EMT yolağındaki potansiyel rolleri arasında ilişki kurulabilir. Bu kapsamda bahsedilen iki miRNA da ileri araştırmalarla validasyonu gereken diğer aday miRNA'lardır.

Tez çalışmasında elde edilen ve ileri araştırmalarla desteklenmesi gereken veriler CTC (+) ile CTC (-) gruplarının SK ile karşılaştırılması sonucu CTC (+) grubunda anlamlı olarak değişen miRNA'lardır. Bu bulguya göre CTC (+) KRK hastalarında hastalığın kötü seyri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Tez çıktılarının geniş çaplı validasyon çalışmaları ve fonksiyonel analizlerle ileri çalışmalarla kapsamlı olarak araştırılması planlanmaktadır. Özetle, anlamlı anlatım değişikliği gösteren bu miRNA'ların validasyonu ile gen hedefleri, bu genlerin protein ürünleri ve biyolojik yollardaki rolleri incelenerek desteklenmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasının bazı limitasyonları bulunmaktadır. İlk olarak, çalışmada mKRK spesifik CTC durumu ile ilişkili DEM gruplarında yer alan miRNA'ların bütçe kısıtlaması nedeni ile validasyonları gerçekleştirilmemiştir. İkinci olarak, AdnaTest yönteminde sadece 3 kolon-spesifik mRNA belirtecine (*CEA*, *EGFR*, *EpCAM*) göre CTC tespit ettiği için CTC heterojenitesine yönelik farklı profile sahip CTC'ler tespit edilememiştir. Üçüncü olarak, çalışmada nmKRK hasta grubunun dahil edilmemesi ve CTC durumunun analiz edilmemesidir. Son olarak, belirlenen DEM'lerin ekspresyon profillerinin spesifik örnek türlerinde (serum, plazma, doku gibi) belirlenmemiş olmasıdır.

Sonuç olarak, çalışma sonuçlarımız dolaşımdaki miRNA'ların, hastaların CTC durumunu ayırt etmede tamamlayıcı bir yaklaşım olarak kullanılabilirliğini önermektedir. Sonuçlarımızın ileri çalışmalarla desteklenmesi ile KRK'lı hastalarda metastaz riskinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi, hastaların risk durumlarına göre doğru tedaviye yönlendirilmesi ve mKRK'ya yönelik translasyonel tıp uygulamalarının geliştirilmesi için umut vaat etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abd Elaziz, M., Mabrouk, A., Dahou, A., & Chelloug, S. A. (2022). Medical Image Classification Utilizing Ensemble Learning and Levy Flight-Based Honey Badger Algorithm on 6G-Enabled Internet of Things. *Comput Intell Neurosci*, 2022, 5830766. <https://doi.org/10.1155/2022/5830766>
- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., Brannigan, B. W., Kapur, R., Stott, S. L., Shioda, T., Ramaswamy, S., Ting, D. T., Lin, C. P., Toner, M., Haber, D. A., & Maheswaran, S. (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, 158(5), 1110-1122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013>
- Agrawal, S., Bhattacharya, A., Manhas, J., & Sen, S. (2019). Molecular Diagnostics in Colorectal Cancer. In K. K. Shukla, P. Sharma, & S. Misra (Eds.), *Molecular Diagnostics in Cancer Patients* (pp. 143-155). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-5877-7>
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., & Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*, 10(5), 619-624. <https://doi.org/10.1038/ncb1725>
- Alix-Panabieres, C., & Pantel, K. (2021). Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov*, 11(4), 858-873. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1311>
- American Cancer Society. (2023). *Tests to Diagnose and Stage Colorectal Cancer*. American Cancer Society. Retrieved 19 Dec from <https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html#:~:text=Usually%20if%20a%20suspected%20colorectal,removed%20to%20make%20the%20diagnosis>
- Amersi, F., Agustin, M., & Ko, C. Y. (2005). Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and health services. *Clin Colon Rectal Surg*, 18(3), 133-140. <https://doi.org/10.1055/s-2005-916274>
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>
- Ashworth, T. R. (1869). A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood after Death. *The Medical Journal of Australia*, 14, 146-147.
- Bagaria, B., Sood, S., Sharma, R., & Lalwani, S. (2013). Comparative study of CEA and CA19-9 in esophageal, gastric and colon cancers individually and in combination (ROC curve analysis). *Cancer Biol Med*, 10(3), 148-157. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2013.03.005>
- Bao, Y., Wang, L., Shi, L., Yun, F., Liu, X., Chen, Y., Chen, C., Ren, Y., & Jia, Y. (2019). Transcriptome profiling revealed multiple genes and ECM-receptor interaction pathways that may be associated with breast cancer. *Cell Mol Biol Lett*, 24, 38. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0162-0>

- Bao, Z., Gao, S., Tang, Q., Zhang, B., Shi, W., & Tian, Q. (2021). A novel role of miR-326 in colorectal carcinoma by regulating E2F1 expression. *J BUON*, 26(2), 528-535. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34077002>
- Baran, B., Mert Ozupek, N., Yerli Tetik, N., Acar, E., Bekcioglu, O., & Baskin, Y. (2018). Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Res*, 11(4), 264-273. <https://doi.org/10.14740/gr1062w>
- Barbazan, J., Muinelo-Romay, L., Vieito, M., Candamio, S., Diaz-Lopez, A., Cano, A., Gomez-Tato, A., Casares de Cal Mde, L., Abal, M., & Lopez-Lopez, R. (2014). A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*, 135(11), 2633-2643. <https://doi.org/10.1002/ijc.28910>
- Barriere, G., Fici, P., Gallerani, G., Fabbri, F., Zoli, W., & Rigaud, M. (2014). Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations. *Ann Transl Med*, 2(11), 109. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.10.04>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bidard, F. C., Jacot, W., Kiavue, N., Dureau, S., Kadi, A., Brain, E., Bachelot, T., Bourgeois, H., Goncalves, A., Ladoire, S., Naman, H., Dalenc, F., Gligorov, J., Espie, M., Emile, G., Ferrero, J. M., Loirat, D., Frank, S., Cabel, L., . . . Pierga, J. Y. (2021). Efficacy of Circulating Tumor Cell Count-Driven vs Clinician-Driven First-line Therapy Choice in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: The STIC CTC Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 7(1), 34-41. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.5660>
- Botteri, E., Borroni, E., Sloan, E. K., Bagnardi, V., Bosetti, C., Peveri, G., Santucci, C., Specchia, C., van den Brandt, P., Gallus, S., & Lugo, A. (2020). Smoking and Colorectal Cancer Risk, Overall and by Molecular Subtypes: A Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol*, 115(12), 1940-1949. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000803>
- Bulfoni, M., Turetta, M., Del Ben, F., Di Loreto, C., Beltrami, A. P., & Cesselli, D. (2016). Dissecting the Heterogeneity of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer: Going Far Beyond the Needle in the Haystack. *Int J Mol Sci*, 17(10). <https://doi.org/10.3390/ijms17101775>
- Cai, J., Ma, H., Huang, F., Zhu, D., Zhao, L., Yang, Y., Bi, J., & Zhang, T. (2014). Low expression of RSK4 predicts poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(8), 4959-4970. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25197367>
- Cai, S., Li, Y., Ding, Y., Chen, K., & Jin, M. (2014). Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*, 23(6), 532-539. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000076>
- Catalanotto, C., Cogoni, C., & Zardo, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci*, 17(10). <https://doi.org/10.3390/ijms17101712>
- Cervena, K., Siskova, A., Buchler, T., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2020). Methylation-Based Therapies for Colorectal Cancer. *Cells*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/cells9061540>

- Chan, D. S., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., & Norat, T. (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*, 6(6), e20456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020456>
- Chang, L., Zhou, G., Soufan, O., & Xia, J. (2020). miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic Acids Res*, 48(W1), W244-W251. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa467>
- Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 303(5654), 83-86. <https://doi.org/10.1126/science.1091903>
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2012). Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell*, 3(1), 28-37. <https://doi.org/10.1007/s13238-012-2003-z>
- Cheng, F., Su, L., & Qian, C. (2016). Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*, 7(30), 48832-48841. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9453>
- Cohen, R., Pudlarz, T., Delattre, J. F., Colle, R., & Andre, T. (2020). Molecular Targets for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/cancers12092350>
- Coleman, D., & Kuwada, S. (2024). miRNA as a Biomarker for the Early Detection of Colorectal Cancer. *Genes*, 15(3), 338. <https://doi.org/10.3390/genes15030338>
- Colucci, P. M., Yale, S. H., & Rall, C. J. (2003). Colorectal polyps. *Clin Med Res*, 1(3), 261-262. <https://doi.org/10.3121/cmr.1.3.261>
- Cui, P., Dai, X., Liu, R., & Cao, H. (2021). LncRNA LINC00888 upregulation predicts a worse survival of laryngeal cancer patients and accelerates the growth and mobility of laryngeal cancer cells through regulation of miR-378g/TFRC. *J Biochem Mol Toxicol*, 35(10), e22878. <https://doi.org/10.1002/jbt.22878>
- Czene, K., Lichtenstein, P., & Hemminki, K. (2002). Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer*, 99(2), 260-266. <https://doi.org/10.1002/ijc.10332>
- de Miguel Perez, D., Rodriguez Martinez, A., Ortigosa Palomo, A., Delgado Urena, M., Garcia Puche, J. L., Robles Remacho, A., Exposito Hernandez, J., Lorente Acosta, J. A., Ortega Sanchez, F. G., & Serrano, M. J. (2020). Extracellular vesicle-miRNAs as liquid biopsy biomarkers for disease identification and prognosis in metastatic colorectal cancer patients. *Sci Rep*, 10(1), 3974. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60212-1>
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *Lancet*, 394(10207), 1467-1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
- Deligezer, U., Erten, N., Akisik, E. E., & Dalay, N. (2006). Circulating fragmented nucleosomal DNA and caspase-3 mRNA in patients with lymphoma and myeloma. *Exp Mol Pathol*, 80(1), 72-76. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.05.001>
- Deneve, E., Riethdorf, S., Ramos, J., Nocca, D., Coffy, A., Daures, J. P., Maudelonde, T., Fabre, J. M., Pantel, K., & Alix-Panabieres, C. (2013). Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients. *Clin Chem*, 59(9), 1384-1392. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.202846>

- Dexheimer, P. J., & Cochella, L. (2020). MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front Cell Dev Biol*, 8, 409. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00409>
- Di Meo, A., Pasic, M. D., & Yousef, G. M. (2016). Proteomics and peptidomics: moving toward precision medicine in urological malignancies. *Oncotarget*, 7(32), 52460-52474. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8931>
- Diederichs, S., & Haber, D. A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, 131(6), 1097-1108. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.032>
- Ding, L., Lan, Z., Xiong, X., Ao, H., Feng, Y., Gu, H., Yu, M., & Cui, Q. (2018). The Dual Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer Progression. *Int J Mol Sci*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092791>
- Ding, Y., Li, W., Wang, K., Xu, C., Hao, M., & Ding, L. (2020). Perspectives of the Application of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer. *Biomed Res Int*, 2020, 6843180. <https://doi.org/10.1155/2020/6843180>
- Dogan, B., Gumusoglu, E., Ulgen, E., Sezerman, O. U., & Gunel, T. (2022). Integrated bioinformatics analysis of validated and circulating miRNAs in ovarian cancer. *Genomics Inform*, 20(2), e20. <https://doi.org/10.5808/gi.21067>
- Doroshov, D. B., Eder, J. P., & LoRusso, P. M. (2017). BET inhibitors: a novel epigenetic approach. *Ann Oncol*, 28(8), 1776-1787. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx157>
- El-Kenawi, A., Hanggi, K., & Ruffell, B. (2020). The Immune Microenvironment and Cancer Metastasis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 10(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037424>
- Elazezy, M., & Joosse, S. A. (2018). Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput Struct Biotechnol J*, 16, 370-378. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.10.002>
- Eulalio, A., Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*, 132(1), 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.024>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)
- Feng, F., Tian, Y., Xu, G., Liu, Z., Liu, S., Zheng, G., Guo, M., Lian, X., Fan, D., & Zhang, H. (2017). Diagnostic and prognostic value of CEA, CA19-9, AFP and CA125 for early gastric cancer. *BMC Cancer*, 17(1), 737. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3738-y>
- Fernandez-Lazaro, D., Garcia Hernandez, J. L., Garcia, A. C., Cordova Martinez, A., Mielgo-Ayuso, J., & Cruz-Hernandez, J. J. (2020). Liquid Biopsy as Novel Tool in Precision Medicine: Origins, Properties, Identification and Clinical Perspective of Cancer's Biomarkers. *Diagnostics (Basel)*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040215>
- Ferreira, M. M., Ramani, V. C., & Jeffrey, S. S. (2016). Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*, 10(3), 374-394. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.007>
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 453-458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>
- Filip, S., Vymetalkova, V., Petera, J., Vodickova, L., Kubecek, O., John, S., Cecka, F., Krupova, M., Manethova, M., Cervena, K., & Vodicka, P. (2020). Distant

- Metastasis in Colorectal Cancer Patients-Do We Have New Predicting Clinicopathological and Molecular Biomarkers? A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*, 21(15). <https://doi.org/10.3390/ijms21155255>
- Forman, J. J., Legesse-Miller, A., & Collier, H. A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(39), 14879-14884. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803230105>
- Frampton, A. E., Fletcher, C. E., Gall, T. M., Castellano, L., Bevan, C. L., Stebbing, J., & Krell, J. (2013). Circulating peripheral blood mononuclear cells exhibit altered miRNA expression patterns in pancreatic cancer. *Expert Rev Mol Diagn.*, 13(5), 425–430. <https://doi.org/10.1586/erm.13.31>
- Fridrichova, I., Kalinkova, L., Karhanek, M., Smolkova, B., Machalekova, K., Wachsmannova, L., Nikolaieva, N., & Kajo, K. (2020). miR-497-5p Decreased Expression Associated with High-Risk Endometrial Cancer. *Int J Mol Sci*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/ijms22010127>
- Gaballah, M. S. A., Ali, H. E. A., Hassan, Z. A., Mahgoub, S., Ali, H. I., Rhim, J. S., Zerfaoui, M., El Sayed, K. A., Stephen, D., Sylvester, P. W., & Abd Elmageed, Z. Y. (2022). Small extracellular vesicle-associated miR-6068 promotes aggressive phenotypes of prostate cancer through miR-6068/HIC2/SIRT1 axis. *Am J Cancer Res*, 12(8), 4015-4027. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36119841>
- Gao, W., Chen, Y., Yang, J., Zhuo, C., Huang, S., Zhang, H., & Shi, Y. (2021). Clinical Perspectives on Liquid Biopsy in Metastatic Colorectal Cancer. *Front Genet*, 12, 634642. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.634642>
- Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(1), 21-37. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>
- Ghosh, S., & Srivastava, S. (2017). Nuts and Bolts of Biomarker Research. In S. Srivastava (Ed.), *Biomarkers in Cancer Screening and Early Detection* (pp. 1-15). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118468869>
- Giuliano, M., Shaikh, A., Lo, H. C., Arpino, G., De Placido, S., Zhang, X. H., Cristofanilli, M., Schiff, R., & Trivedi, M. V. (2018). Perspective on Circulating Tumor Cell Clusters: Why It Takes a Village to Metastasize. *Cancer Res*, 78(4), 845-852. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2748>
- Gorges, T. M., Stein, A., Quidde, J., Hauch, S., Rock, K., Riethdorf, S., Joosse, S. A., & Pantel, K. (2016). Improved Detection of Circulating Tumor Cells in Metastatic Colorectal Cancer by the Combination of the CellSearch(R) System and the AdnaTest(R). *PLoS One*, 11(5), e0155126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155126>
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reynies, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa, E. M. F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., . . . Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*, 21(11), 1350-1356. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>
- Gumusoglu-Acar, E., Gunel, T., Hosseini, M. K., Dogan, B., Tekarslan, E. E., Gurdamar, B., Cevik, N., Sezer, U., Topuz, S., & Aydinli, K. (2023). Metabolic pathways of potential miRNA biomarkers derived from liquid

- biopsy in epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett*, 25(4), 142. <https://doi.org/10.3892/ol.2023.13728>
- Gungormez, C., Gumushan Aktas, H., Dilsiz, N., & Borazan, E. (2019). Novel miRNAs as potential biomarkers in stage II colon cancer: microarray analysis. *Mol Biol Rep*, 46(4), 4175-4183. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04868-7>
- Guo, S. T., Jiang, C. C., Wang, G. P., Li, Y. P., Wang, C. Y., Guo, X. Y., Yang, R. H., Feng, Y., Wang, F. H., Tseng, H. Y., Thorne, R. F., Jin, L., & Zhang, X. D. (2013). MicroRNA-497 targets insulin-like growth factor 1 receptor and has a tumour suppressive role in human colorectal cancer. *Oncogene*, 32(15), 1910-1920. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.214>
- Gyoba, J., Shan, S., Roa, W., & Bédard, E. L. (2016). Diagnosing Lung Cancers through Examination of Micro-RNA Biomarkers in Blood, Plasma, Serum and Sputum: A Review and Summary of Current Literature. *Int J Mol Sci*, 17(4), 494. <https://doi.org/10.3390/ijms17040494>
- Habli, Z., AlChamaa, W., Saab, R., Kadara, H., & Khraiche, M. L. (2020). Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility: Challenges and Opportunities. *Cancers (Basel)*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/cancers12071930>
- Hammarstrom, S. (1999). The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*, 9(2), 67-81. <https://doi.org/10.1006/scbi.1998.0119>
- Han, C., Song, Y., & Lian, C. (2018). MiR-769 Inhibits Colorectal Cancer Cell Proliferation and Invasion by Targeting HEY1. *Med Sci Monit*, 24, 9232-9239. <https://doi.org/10.12659/MSM.911663>
- Harvey, K. F., Zhang, X., & Thomas, D. M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer*, 13(4), 246-257. <https://doi.org/10.1038/nrc3458>
- Healy, M. (2022). *Surgical Procedures: Surgery and Staging for Colon Cancer*. Retrieved 21 Dec from <https://www.oncolink.org/cancers/gastrointestinal/colon-cancer/treatments/surgery-for-colon-cancer>
- Heeke, S., Mograbi, B., Alix-Panabieres, C., & Hofman, P. (2019). Never Travel Alone: The Crosstalk of Circulating Tumor Cells and the Blood Microenvironment. *Cells*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/cells8070714>
- Henrikson, N. B., Webber, E. M., Goddard, K. A., Scrol, A., Piper, M., Williams, M. S., Zallen, D. T., Calonge, N., Ganiats, T. G., Janssens, A. C., Zauber, A., Lansdorp-Vogelaar, I., van Ballegooijen, M., & Whitlock, E. P. (2015). Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review. *Genet Med*, 17(9), 702-712. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.188>
- Hu, Y., Liu, J., Jiang, B., Chen, J., Fu, Z., Bai, F., Jiang, J., & Tang, Z. (2014). MiR-199a-5p loss up-regulated DDR1 aggravated colorectal cancer by activating epithelial-to-mesenchymal transition related signaling. *Dig Dis Sci*, 59(9), 2163-2172. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3136-0>
- Huang, X., Wang, L., Liu, W., & Li, F. (2019). MicroRNA-497-5p inhibits proliferation and invasion of non-small cell lung cancer by regulating FGF2. *Oncol Lett*, 17(3), 3425-3431. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9954>
- Hur, K., Toiyama, Y., Okugawa, Y., Ide, S., Imaoka, H., Boland, C. R., & Goel, A. (2017). Circulating microRNA-203 predicts prognosis and metastasis in

- human colorectal cancer. *Gut*, 66(4), 654-665. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308737>
- Hutvagner, G., & Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 22-32. <https://doi.org/10.1038/nrm2321>
- Imamura, T., Komatsu, S., Ichikawa, D., Kawaguchi, T., Miyamae, M., Okajima, W., Ohashi, T., Arita, T., Konishi, H., Shiozaki, A., Morimura, R., Ikoma, H., Okamoto, K., & Otsuji, E. (2016). Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol*, 22(25), 5627-5641. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i25.5627>
- Iozzo, R. V., & Sanderson, R. D. (2011). Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 15(5), 1013-1031. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x>
- IQWiG, (2017). *Signs of Colorectal Cancer*. InformedHealth.org. Retrieved 19 Dec from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279199/>
- Jaspersen, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044-2058. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054>
- Ji, Y., Gu, J., Zhang, H., & Xu, H. (2023). Identification and Validation of Key miRNAs for Colon Cancer Based on miRNA-Gene Integration Analysis. *Int J Gen Med.*, 16, 5703–5718. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S440340>
- Jia, Y., Chen, Y., Wang, Q., Jayasinghe, U., Luo, X., Wei, Q., Wang, J., Xiong, H., Chen, C., Xu, B., Hu, W., Wang, L., Zhao, W., & Zhou, J. (2017). Exosome: emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget*, 8(25), 41717-41733. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16684>
- Joshi, H. (2023). Precision Medicine: Translation of Individualistic Treatment in Oncology. In H. S. Tuli & M. B. Yerer Aycan (Eds.), *Oncology: Genomics, Precision Medicine and Therapeutic Targets* (pp. 77-149). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-99-1529-3>
- Joshi, H., Kumar, G., Tuli, H. S., & Mittal, S. (2022). Inhibition of Cancer Cell Metastasis by Nanotherapeutics: Current Achievements and Future Trends. In H. S. Tuli (Ed.), *Nanotherapeutics in Cancer* (Vol. 1). Jenny Stanford Publishing.
- Juma, A. R., Damdimopoulou, P. E., Grommen, S. V., Van de Ven, W. J., & De Groef, B. (2016). Emerging role of PLAG1 as a regulator of growth and reproduction. *J Endocrinol*, 228(2), R45-56. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0449>
- Jung, G., Hernandez-Illan, E., Moreira, L., Balaguer, F., & Goel, A. (2020). Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 17(2), 111-130. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0230-y>
- Junqueira-Neto, S., Batista, I. A., Costa, J. L., & Melo, S. A. (2019). Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA. *Acta Cytol*, 63(6), 479-488. <https://doi.org/10.1159/000493969>
- Kang, J., Tang, Q., He, J., Li, L., Yang, N., Yu, S., Wang, M., Zhang, Y., Lin, J., Cui, T., Hu, Y., Tan, P., Cheng, J., Zheng, H., Wang, D., Su, X., Chen, W., & Huang, Y. (2022). RNAInter v4.0: RNA interactome repository with redefined confidence scoring system and improved accessibility. *Nucleic Acids Res*, 50(D1), D326-D332. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab997>

- Kanthan, R., Senger, J. L., & Kanthan, S. C. (2012). Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Patholog Res Int*, 2012, 597497. <https://doi.org/10.1155/2012/597497>
- Kanwal, R., & Gupta, S. (2012). Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet*, 81(4), 303-311. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01809.x>
- Kim, S., Park, B. K., Seo, J. H., Choi, J., Choi, J. W., Lee, C. K., Chung, J. B., Park, Y., & Kim, D. W. (2020). Carbohydrate antigen 19-9 elevation without evidence of malignant or pancreatobiliary diseases. *Sci Rep*, 10(1), 8820. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65720-8>
- Koya, J., Saito, Y., Kameda, T., Kogure, Y., Yuasa, M., Nagasaki, J., McClure, M. B., Shingaki, S., Tabata, M., Tahira, Y., Akizuki, K., Kamiunten, A., Sekine, M., Shide, K., Kubuki, Y., Hidaka, T., Kitanaka, A., Nakano, N., Utsunomiya, A., . . . Kataoka, K. (2021). Single-Cell Analysis of the Multicellular Ecosystem in Viral Carcinogenesis by HTLV-1. *Blood Cancer Discov*, 2(5), 450-467. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-21-0044>
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue), D152-157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>
- Krebs, M. G., Renehan, A. G., Backen, A., Gollins, S., Chau, I., Hasan, J., Valle, J. W., Morris, K., Beech, J., Ashcroft, L., Saunders, M. P., & Dive, C. (2015). Circulating Tumor Cell Enumeration in a Phase II Trial of a Four-Drug Regimen in Advanced Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 14(2), 115-122 e111-112. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2014.12.006>
- Kwong, T. N. Y., Wang, X., Nakatsu, G., Chow, T. C., Tipoe, T., Dai, R. Z. W., Tsoi, K. K. K., Wong, M. C. S., Tse, G., Chan, M. T. V., Chan, F. K. L., Ng, S. C., Wu, J. C. Y., Wu, W. K. K., Yu, J., Sung, J. J. Y., & Wong, S. H. (2018). Association Between Bacteremia From Specific Microbes and Subsequent Diagnosis of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 155(2), 383-390 e388. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.04.028>
- Kyrgiou, M., Kalliala, I., Markozannes, G., Gunter, M. J., Paraskeva, E., Gaba, H., Martin-Hirsch, P., & Tsilidis, K. K. (2017). Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature. *BMJ*, 356, j477. <https://doi.org/10.1136/bmj.j477>
- Lai, J., Chen, B., Zhang, G., Wang, Y., Mok, H., Wen, L., Pan, Z., Su, F., & Liao, N. (2019). Identification of a novel microRNA recurrence-related signature and risk stratification system in breast cancer. *Aging (Albany NY)*, 11(18), 7525–7536. <https://doi.org/10.18632/aging.102268>
- Lakemeyer, L., Sander, S., Wittau, M., Henne-Bruns, D., Kornmann, M., & Lemke, J. (2021). Diagnostic and Prognostic Value of CEA and CA19-9 in Colorectal Cancer. *Diseases*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/diseases9010021>
- Lankiewicz, S., Zimmermann, S., Hollmann, C., Hillemann, T., & Greten, T. F. (2008). Circulating tumour cells as a predictive factor for response to systemic chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Mol Oncol*, 2(4), 349-355. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2008.09.001>
- Lee, D. (2021). miR-769-5p is associated with prostate cancer recurrence and modulates proliferation and apoptosis of cancer cells. *Exp Ther Med*, 21(4), 335. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9766>

- Lee, M. K. C., & Loree, J. M. (2019). Current and emerging biomarkers in metastatic colorectal cancer. *Curr Oncol*, 26(Suppl 1), S7-S15. <https://doi.org/10.3747/co.26.5719>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 21(17), 4663-4670. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>
- Legolvan, M. P., Taliano, R. J., & Resnick, M. B. (2012). Application of molecular techniques in the diagnosis, prognosis and management of patients with colorectal cancer: a practical approach. *Hum Pathol*, 43(8), 1157-1168. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.03.003>
- Li, G., Xu, Y., Wang, S., Yan, W., Zhao, Q., & Guo, J. (2019). MiR-873-5p inhibits cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer via targeting ZEB1. *Pathol Res Pract*, 215(1), 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.10.008>
- Li, J., Xia, L., Zhou, Z., Zuo, Z., Xu, C., Song, H., & Cai, J. (2018). MiR-186-5p upregulation inhibits proliferation, metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer cell by targeting ZEB1. *Arch Biochem Biophys*, 640, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.002>
- Li, R., Qu, H., Wang, S., Chater, J. M., Wang, X., Cui, Y., Yu, L., Zhou, R., Jia, Q., Traband, R., Wang, M., Xie, W., Yuan, D., Zhu, J., Zhong, W. D., & Jia, Z. (2022). CancerMIRNome: an interactive analysis and visualization database for miRNome profiles of human cancer. *Nucleic Acids Res*, 50(D1), D1139-D1146. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab784>
- Li, W., Zhu, Q., Zhang, S., Liu, L., Zhang, H., & Zhu, D. (2020). HOXC13-AS accelerates cell proliferation and migration in oral squamous cell carcinoma via miR-378g/HOXC13 axis. *Oral Oncol*, 111, 104946. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104946>
- Li, X., Wu, P., Tang, Y., Fan, Y., Liu, Y., Fang, X., Wang, W., & Zhao, S. (2020). Down-Regulation of MiR-181c-5p Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via Targeting SERPINE1. *Front Oncol*, 10, 544476. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.544476>
- Li, Y., Cai, B., Shen, L., Dong, Y., Lu, Q., Sun, S., Liu, S., Ma, S., Ma, P. X., & Chen, J. (2017). MiRNA-29b suppresses tumor growth through simultaneously inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by targeting Akt3. *Cancer Lett*, 397, 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.032>
- Liang, X., Li, Z., Men, Q., Li, Y., Li, H., & Chong, T. (2018). miR-326 functions as a tumor suppressor in human prostatic carcinoma by targeting Mucin1. *Biomed Pharmacother*, 108, 574-583. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.053>
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., & Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, 343(2), 78-85. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007133430201>

- Liu, Z., Liu, X., Li, Y., Ren, P., Zhang, C., Wang, L., Du, X., & Xing, B. (2019). miR-6716-5p promotes metastasis of colorectal cancer through downregulating NAT10 expression. *Cancer Manag Res*, 11, 5317-5332. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S197733>
- Long, S., Qin, Q., Wang, Y., Yang, Y., Wang, Y., Deng, A., Qiao, L., & Liu, B. (2019). Nanoporous silica coupled MALDI-TOF MS detection of Bence-Jones proteins in human urine for diagnosis of multiple myeloma. *Talanta*, 200, 288-292. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.067>
- Lotfollahzadeh, S., Recio-Boiles, A., & Cagir, B. (2023). *Colon Cancer*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>
- Lotvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzas, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Ghossein, S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W., & Thery, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, 3, 26913. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.26913>
- Lowes, L. E., & Allan, A. L. (2018). Circulating Tumor Cells and Implications of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Adv Clin Chem*, 83, 121-181. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2017.10.004>
- Lu, Y. C., Cheng, A. J., Lee, L. Y., You, G. R., Li, Y. L., Chen, H. Y., & Chang, J. T. (2017). MiR-520b as a novel molecular target for suppressing stemness phenotype of head-neck cancer by inhibiting CD44. *Sci Rep*, 7(1), 2042. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02058-8>
- Lu, Y. J., Wang, P., Peng, J., Wang, X., Zhu, Y. W., & Shen, N. (2017). Meta-analysis Reveals the Prognostic Value of Circulating Tumour Cells Detected in the Peripheral Blood in Patients with Non-Metastatic Colorectal Cancer. *Sci Rep*, 7(1), 905. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01066-y>
- Lv, S., Zhang, J., He, Y., Liu, Q., Wang, Z., Liu, B., Shi, L., & Wu, Y. (2020). MicroRNA-520e targets AEG-1 to suppress the proliferation and invasion of colorectal cancer cells through Wnt/GSK-3 β /catenin signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 47(1), 158-167. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13185>
- Ma, E., MacRae, I. J., Kirsch, J. F., & Doudna, J. A. (2008). Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J Mol Biol*, 380(1), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.005>
- Ma, S., Zhou, M., Xu, Y., Gu, X., Zou, M., Abudushalamu, G., Yao, Y., Fan, X., & Wu, G. (2023). Clinical application and detection techniques of liquid biopsy in gastric cancer. *Mol Cancer*, 22(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01715-z>
- Maltoni, R., Gallerani, G., Fici, P., Rocca, A., & Fabbri, F. (2016). CTCs in early breast cancer: A path worth taking. *Cancer Lett*, 376(2), 205-210. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.051>
- Markman, M. (2022). *Colorectal Cancer Symptoms*. City of Hope. Retrieved 19 Dec from <https://www.cancercenter.com/cancer-types/colorectal-cancer/symptoms#metastatic-colorectal-cancer-symptoms>
- Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 361(25), 2449-2460. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804588>

- Martelotto, L. G., Ng, C. K., Piscuoglio, S., Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2014). Breast cancer intra-tumor heterogeneity. *Breast Cancer Res*, 16(3), 210. <https://doi.org/10.1186/bcr3658>
- Martinez, N. J., Ow, M. C., Barrasa, M. I., Hammell, M., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Roth, F. P., Ambros, V. R., & Walhout, A. J. (2008). A C. elegans genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity. *Genes Dev*, 22(18), 2535-2549. <https://doi.org/10.1101/gad.1678608>
- Mazard, T., Cayrefourcq, L., Perriard, F., Senellart, H., Linot, B., de la Fouchardiere, C., Terrebonne, E., Francois, E., Obled, S., Guimbaud, R., Mineur, L., Fonck, M., Daures, J. P., Ychou, M., Assenat, E., & Alix-Panabieres, C. (2021). Clinical Relevance of Viable Circulating Tumor Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer: The COLOSPOT Prospective Study. *Cancers (Basel)*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/cancers13122966>
- Mazouji, O., Ouhajjou, A., Incitti, R., & Mansour, H. (2021). Updates on Clinical Use of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer Screening, Diagnosis, Follow-Up, and Treatment Guidance. *Front Cell Dev Biol*, 9, 660924. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.660924>
- Medema, J. P. (2013). Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol*, 15(4), 338-344. <https://doi.org/10.1038/ncb2717>
- Menyailo, M. E., Tretyakova, M. S., & Denisov, E. V. (2020). Heterogeneity of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Identifying Metastatic Seeds. *Int J Mol Sci*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051696>
- Michael-Robinson, J. M., Reid, L. E., Purdie, D. M., Biemer-Hüttmann, A. E., Walsh, M. D., Pandeya, N., Simms, L. A., Young, J. P., Leggett, B. A., Jass, J. R., & Radford-Smith, G. L. (2001). Proliferation, apoptosis, and survival in high-level microsatellite instability sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 7(8), 2347-2356.
- Monteys, A. M., Spengler, R. M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K. A., Xing, Y., & Davidson, B. L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*, 16(3), 495-505. <https://doi.org/10.1261/rna.1731910>
- Morgan, E., Arnold, M., Gini, A., Lorenzoni, V., Cabasag, C. J., Laversanne, M., Vignat, J., Ferlay, J., Murphy, N., & Bray, F. (2023). Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*, 72(2), 338-344. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327736>
- Mourtzikou, A., Kroupis, C., Poupouridou, N., Christodoulou, S., Skondra, M., Kastania, A. N., Athanasas, G., Pectasides, D., & K., D. (2012). Molecular Detection of Circulating Tumor Cells in peripheral blood of colon cancer patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research*, 1(5), 74-79. <http://www.ghrnet.org/index./joghr/>
- Musella, V., Pietrantonio, F., Di Buduo, E., Iacovelli, R., Martinetti, A., Sottotetti, E., Bossi, I., Maggi, C., Di Bartolomeo, M., de Braud, F., Daidone, M. G., & Cappelletti, V. (2015). Circulating tumor cells as a longitudinal biomarker in patients with advanced chemorefractory, RAS-BRAF wild-type colorectal cancer receiving cetuximab or panitumumab. *Int J Cancer*, 137(6), 1467-1474. <https://doi.org/10.1002/ijc.29493>

- Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Ulkus, L., Smith, M. R., Kwak, E. L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U. J., Tompkins, R. G., Haber, D. A., & Toner, M. (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450(7173), 1235-1239. <https://doi.org/10.1038/nature06385>
- Nakayama, T., Watanabe, M., Teramoto, T., & Kitajima, M. (1997). Slope analysis of CA19-9 and CEA for predicting recurrence in colorectal cancer patients. *Anticancer Res*, 17(2B), 1379-1382. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9137502>
- Nassar, D., & Blanpain, C. (2016). Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol*, 11, 47-76. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044438>
- National Institutes of Health. (2015). *Advances in Colorectal Cancer Research*. Retrieved 21 Dec from
- Nelson, N. J. (2010). Circulating tumor cells: will they be clinically useful? *J Natl Cancer Inst*, 102(3), 146-148. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq016>
- Ning, X., Wang, C., Zhang, M., & Wang, K. (2019). Ectopic Expression of miR-147 Inhibits Stem Cell Marker and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)-Related Protein Expression in Colon Cancer Cells. *Oncol Res*, 27(4), 399-406. <https://doi.org/10.3727/096504018X15179675206495>
- Niu, L., Yang, W., Duan, L., Wang, X., Li, Y., Xu, C., Liu, C., Zhang, Y., Zhou, W., Liu, J., Zhao, Q., Hong, L., & Fan, D. (2021). Biological Implications and Clinical Potential of Metastasis-Related miRNA in Colorectal Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*, 23, 42-54. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.10.030>
- Ocana, O. H., Corcoles, R., Fabra, A., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., Barrallo-Gimeno, A., Cano, A., & Nieto, M. A. (2012). Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*, 22(6), 709-724. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.10.012>
- Onstenk, W., Sieuwerts, A. M., Mostert, B., Lalmahomed, Z., Bolt-de Vries, J. B., van Galen, A., Smid, M., Kraan, J., Van, M., de Weerd, V., Ramirez-Moreno, R., Biermann, K., Verhoef, C., Grunhagen, D. J., JN, I. J., Gratama, J. W., Martens, J. W., Foekens, J. A., & Sleijfer, S. (2016). Molecular characteristics of circulating tumor cells resemble the liver metastasis more closely than the primary tumor in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(37), 59058-59069. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10175>
- Pan, Y. J., Wan, J., & Wang, C. B. (2019). MiR-326: Promising Biomarker for Cancer. *Cancer Manag Res*, 11, 10411-10418. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S223875>
- Pancione, M., Remo, A., & Colantuoni, V. (2012). Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Patholog Res Int*, 2012, 509348. <https://doi.org/10.1155/2012/509348>
- Park, Y., Kitahara, T., Urita, T., Yoshida, Y., & Kato, R. (2011). Expected clinical applications of circulating tumor cells in breast cancer. *World J Clin Oncol*, 2(8), 303-310. <https://doi.org/10.5306/wjco.v2.i8.303>
- Petrik, J., Verbanac, D., Fabijanec, M., Hulina-Tomaskovic, A., Ceri, A., Somborac-Bacura, A., Petlevski, R., Grdic Rajkovic, M., Rumora, L., Kruslin, B., Stefanovic, M., Ljubicic, N., Barsic, N., Hanzek, A., Bockor, L., Celap, I., Demirovic, A., & Barisic, K. (2022). Circulating Tumor Cells in Colorectal

- Cancer: Detection Systems and Clinical Utility. *Int J Mol Sci*, 23(21). <https://doi.org/10.3390/ijms232113582>
- Pinsky, P. F., Prorok, P. C., & Kramer, B. S. (2017). Prostate Cancer Screening - A Perspective on the Current State of the Evidence. *N Engl J Med*, 376(13), 1285-1289. <https://doi.org/10.1056/NEJMSb1616281>
- Qin, Z., Ljubimov, V. A., Zhou, C., Tong, Y., & Liang, J. (2016). Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer*, 35, 36. <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0092-4>
- Qiu, Y., He, J., Chen, X., Huang, P., Hu, K., & Yan, H. (2018). The diagnostic value of five serum tumor markers for patients with cholangiocarcinoma. *Clin Chim Acta*, 480, 186-192. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.02.008>
- Raimondi, C., Nicolazzo, C., Gradilone, A., Giannini, G., De Falco, E., Chimenti, I., Varriale, E., Hauch, S., Plappert, L., Cortesi, E., & Gazzaniga, P. (2014). Circulating tumor cells: exploring intratumor heterogeneity of colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*, 15(5), 496-503. <https://doi.org/10.4161/cbt.28020>
- Ramzy, G. M., Norkin, M., Koessler, T., Voirol, L., Tihy, M., Hany, D., McKee, T., Ris, F., Buchs, N., Docquier, M., Toso, C., Rubbia-Brandt, L., Bakalli, G., Guerrier, S., Huelsken, J., & Nowak-Sliwinska, P. (2023). Platform combining statistical modeling and patient-derived organoids to facilitate personalized treatment of colorectal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 42(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02650-z>
- Rapado-Gonzalez, O., Alvarez-Castro, A., Lopez-Lopez, R., Iglesias-Canle, J., Suarez-Cunqueiro, M. M., & Muinelos-Romay, L. (2019). Circulating microRNAs as Promising Biomarkers in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/cancers11070898>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*, 14(2), 89-103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
- Remo, A., Fassan, M., Vanoli, A., Bonetti, L. R., Barresi, V., Tatangelo, F., Gafa, R., Giordano, G., Pancione, M., Grillo, F., & Mastracci, L. (2019). Morphology and Molecular Features of Rare Colorectal Carcinoma Histotypes. *Cancers (Basel)*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/cancers11071036>
- Remo, A., Pancione, M., Zanella, C., & Vendraminelli, R. (2012). Molecular pathology of colorectal carcinoma. A systematic review centred on the new role of the pathologist. *Pathologica*, 104(6), 432-441. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23547429>
- Romero-Cordoba, S. L., Salido-Guadarrama, I., Rodriguez-Dorantes, M., & Hidalgo-Miranda, A. (2014). miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther*, 15(11), 1444-1455. <https://doi.org/10.4161/15384047.2014.955442>
- Rong, L., Chen, B., Liu, K., Liu, B., He, X., Liu, J., Li, J., He, M., Zhu, L., Liu, K., Shi, X., Shuai, Y., & Jin, L. (2022). CircZDBF2 up-regulates RNF145 by ceRNA model and recruits CEBPB to accelerate oral squamous cell carcinoma progression via NFkappaB signaling pathway. *J Transl Med*, 20(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03347-1>
- Saetrom, P., Heale, B. S., Snove, O., Jr., Aagaard, L., Alluin, J., & Rossi, J. J. (2007). Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and

- cooperativity. *Nucleic Acids Res*, 35(7), 2333-2342. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm133>
- Sanghvi, V. R., & Steel, L. F. (2011). The cellular TAR RNA binding protein, TRBP, promotes HIV-1 replication primarily by inhibiting the activation of double-stranded RNA-dependent kinase PKR. *J Virol*, 85(23), 12614-12621. <https://doi.org/10.1128/JVI.05240-11>
- Saucedo-Zeni, N., Mewes, S., Niestroj, R., Gasiorowski, L., Murawa, D., Nowaczyk, P., Tomasi, T., Weber, E., Dworacki, G., Morgenthaler, N. G., Jansen, H., Propping, C., Sterzynska, K., Dyszkiewicz, W., Zabel, M., Kiechle, M., Reuning, U., Schmitt, M., & Lucke, K. (2012). A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol*, 41(4), 1241-1250. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1557>
- Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedzwiedzka, E., Arlukowicz, T., & Przybylowicz, K. E. (2021). A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>
- Schulz, W. A. (2023). Colorectal Cancer. In *Molecular Biology of Human Cancers* (2 ed., pp. 291-308). Springer Cham. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-031-16286-2>
- Shin, A. E., Giancotti, F. G., & Rustgi, A. K. (2023). Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*, 44(4), 222-236. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2023.01.003>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*, 73(1), 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Sisik, A., Kaya, M., Bas, G., Basak, F., & Alimoglu, O. (2013). CEA and CA 19-9 are still valuable markers for the prognosis of colorectal and gastric cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(7), 4289-4294. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.7.4289>
- Slaterry, M. L., Herrick, J. S., Pellatt, D. F., Stevens, J. R., Mullany, L. E., Wolff, E., Hoffman, M. D., Samowitz, W. S., & Wolff, R. K. (2016). MicroRNA profiles in colorectal carcinomas, adenomas and normal colonic mucosa: variations in miRNA expression and disease progression. *Carcinogenesis*, 37(3), 245-261. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv249>
- Soler, A., Cayrefourcq, L., Mazel, M., & Alix-Panabieres, C. (2017). EpCAM-Independent Enrichment and Detection of Viable Circulating Tumor Cells Using the EPISPOT Assay. *Methods Mol Biol*, 1634, 263-276. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7144-2_22
- Stang, A., Weilert, H., Lipp, M. J., Oldhafer, K. J., Hoheisel, J. D., Zhang, C., & Bauer, A. S. (2021). MicroRNAs in blood act as biomarkers of colorectal cancer and indicate potential therapeutic targets. *Mol Oncol*, 15(9), 2480-2490. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13065>
- Sun, S., Hang, T., Zhang, B., Zhu, L., Wu, Y., Lv, X., Huang, Q., & Yao, H. (2019). miRNA-708 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting ZEB1 through Akt/mTOR signaling pathway. *Am J Transl Res*, 11(9), 5338-5356. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31632515>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of

- Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Surinova, S., Radova, L., Choi, M., Srovnal, J., Brenner, H., Vitek, O., Hajdich, M., & Aebbersold, R. (2015). Non-invasive prognostic protein biomarker signatures associated with colorectal cancer. *EMBO Mol Med*, 7(9), 1153-1165. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404874>
- Suzuki, H. I., Arase, M., Matsuyama, H., Choi, Y. L., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K., & Miyazono, K. (2011). MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation. *Mol Cell*, 44(3), 424-436. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.012>
- Swennenhuis, J. F., I Dalum, G., Zeune, L. L., & Terstappen, L. W. (2016). Improving the CellSearch(R) system. *Expert Rev Mol Diagn*, 16(12), 1291-1305. <https://doi.org/10.1080/14737159.2016.1255144>
- Szczerba, B. M., Castro-Giner, F., Vetter, M., Krol, I., Gkountela, S., Landin, J., Scheidmann, M. C., Donato, C., Scherrer, R., Singer, J., Beisel, C., Kurzeder, C., Heinzelmann-Schwarz, V., Rochlitz, C., Weber, W. P., Beerenwinkel, N., & Aceto, N. (2019). Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature*, 566(7745), 553-557. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0915-y>
- Talasaz, A. H., Powell, A. A., Huber, D. E., Berbee, J. G., Roh, K. H., Yu, W., Xiao, W., Davis, M. M., Pease, R. F., Mindrinos, M. N., Jeffrey, S. S., & Davis, R. W. (2009). Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(10), 3970-3975. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813188106>
- Tam, W. L., & Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*, 19(11), 1438-1449. <https://doi.org/10.1038/nm.3336>
- Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., & Zhang, Z. (2017). GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res*, 45(W1), W98-W102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>
- Tayoun, T., Faugeroux, V., Oulhen, M., Aberlenc, A., Pawlikowska, P., & Farace, F. (2019). CTC-Derived Models: A Window into the Seeding Capacity of Circulating Tumor Cells (CTCs). *Cells*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/cells8101145>
- Tian, L. L., Qian, B., Jiang, X. H., Liu, Y. S., Chen, T., Jia, C. Y., Zhou, Y. L., Liu, J. B., Ma, Y. S., Fu, D., & Ding, S. T. (2021). MicroRNA-497-5p Is Downregulated in Hepatocellular Carcinoma and Associated with Tumorigenesis and Poor Prognosis in Patients. *Int J Genomics*, 2021, 6670390. <https://doi.org/10.1155/2021/6670390>
- Tian, X. P., Cai, J., Ma, S. Y., Fang, Y., Huang, H. Q., Lin, T. Y., Rao, H. L., Li, M., Xia, Z. J., Kang, T. B., Xie, D., & Cai, Q. Q. (2020). BRD2 induces drug resistance through activation of the RasGRP1/Ras/ERK signaling pathway in adult T-cell lymphoblastic lymphoma. *Cancer Commun (Lond)*, 40(6), 245-259. <https://doi.org/10.1002/cac2.12039>
- Toiyama, Y., Hur, K., Tanaka, K., Inoue, Y., Kusunoki, M., Boland, C. R., & Goel, A. (2014). Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Ann Surg*, 259(4), 735-743. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3182a6909d>

- Tokar, T., Pastrello, C., Rossos, A. E. M., Abovsky, M., Hauschild, A. C., Tsay, M., Lu, R., & Jurisica, I. (2018). mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res*, 46(D1), D360-D370. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1144>
- Tong, Z., Cui, Q., Wang, J., & Zhou, Y. (2019). TransmiR v2.0: an updated transcription factor-microRNA regulation database. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D253-D258. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1023>
- Tsai, W. S., Chen, J. S., Shao, H. J., Wu, J. C., Lai, J. M., Lu, S. H., Hung, T. F., Chiu, Y. C., You, J. F., Hsieh, P. S., Yeh, C. Y., Hung, H. Y., Chiang, S. F., Lin, G. P., Tang, R., & Chang, Y. C. (2016). Circulating Tumor Cell Count Correlates with Colorectal Neoplasm Progression and Is a Prognostic Marker for Distant Metastasis in Non-Metastatic Patients. *Sci Rep*, 6, 24517. <https://doi.org/10.1038/srep24517>
- Vafaei, F., Diakos, C., Kirschner, M. B., Reid, G., Michael, M. Z., Horvath, L. G., Alinejad-Rokny, H., Cheng, Z. J., Kuncic, Z., & Clarke, S. (2018). A data-driven, knowledge-based approach to biomarker discovery: application to circulating microRNA markers of colorectal cancer prognosis. *NPJ Syst Biol Appl*, 4, 20. <https://doi.org/10.1038/s41540-018-0056-1>
- Valpione, S., Gremel, G., Mundra, P., Middlehurst, P., Galvani, E., Girotti, M. R., Lee, R. J., Garner, G., Dhomen, N., Lorigan, P. C., & Marais, R. (2018). Plasma total cell-free DNA (cfDNA) is a surrogate biomarker for tumour burden and a prognostic biomarker for survival in metastatic melanoma patients. *Eur J Cancer*, 88, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.10.029>
- van der Pol, E., Boing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*, 64(3), 676-705. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005983>
- Vandenbroucke, R. E., & Libert, C. (2014). Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov*, 13(12), 904-927. <https://doi.org/10.1038/nrd4390>
- Vishnoi, A., & Rani, S. (2023). miRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Updated Overview. *Methods Mol Biol*, 2595, 1-12. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2823-2_1
- Vlachos, I. S., Zagkanas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*, 43(W1), W460-466. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv403>
- Vojtechova, G., Benesova, L., Belsanova, B., Minarikova, P., Levy, M., Lipska, L., Suchanek, S., Zavoral, M., & Minarik, M. (2016). Monitoring of Circulating Tumor Cells by a Combination of Immunomagnetic Enrichment and RT-PCR in Colorectal Cancer Patients Undergoing Surgery. *Adv Clin Exp Med*, 25(6), 1273-1279. <https://doi.org/10.17219/acem/63824>
- Vu, T., & Datta, P. K. (2017). Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers (Basel)*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/cancers9120171>
- Wagner, P. D. (2017). Colon Cancer. In S. Srivastava (Ed.), *Biomarkers in Cancer Screening and Early Detection* (pp. 141-150). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118468869>

- Wang, J. Z., Xu, C. L., Wu, H., & Shen, S. J. (2017). LncRNA SNHG12 promotes cell growth and inhibits cell apoptosis in colorectal cancer cells. *Braz J Med Biol Res*, 50(3), e6079. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20176079>
- Wang, L. G., & Gu, J. (2012). Serum microRNA-29a is a promising novel marker for early detection of colorectal liver metastasis. *Cancer Epidemiol*, 36(1), e61-67. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2011.05.002>
- Wang, Q., Ye, B., Wang, P., Yao, F., Zhang, C., & Yu, G. (2019). Overview of microRNA-199a Regulation in Cancer. *Cancer Manag Res*, 11, 10327-10335. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S231971>
- Wang, W., Young, M. R., & Srivastava, S. (2017). MicroRNA Biomarkers for Early Detection of Cancer. In S. Srivastava (Ed.), *Biomarkers in Cancer Screening and Early Detection* (pp. 27-36). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118468869>
- Wang, W. C., Zhang, X. F., Peng, J., Li, X. F., Wang, A. L., Bie, Y. Q., Shi, L. H., Lin, M. B., & Zhang, X. F. (2018). Survival Mechanisms and Influence Factors of Circulating Tumor Cells. *Biomed Res Int*, 2018, 6304701. <https://doi.org/10.1155/2018/6304701>
- Watahiki, A., Wang, Y., Morris, J., Dennis, K., O'Dwyer, H. M., Gleave, M., Gout, P. W., & Wang, Y. (2011). MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer. *PLoS One*, 6(9), e24950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024950>
- Wei, D., Shen, B., Wang, W., Zhou, Y., Yang, X., Lu, G., Yang, J., & Shao, Y. (2019). MicroRNA-199a-5p functions as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma via targeting the IKK β /NF- κ B signaling pathway. *Int J Mol Med*, 43(4), 1585-1596. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4083>
- Wen, X. Q., Qian, X. L., Sun, H. K., Zheng, L. L., Zhu, W. Q., Li, T. Y., & Hu, J. P. (2020). MicroRNAs: Multifaceted Regulators of Colorectal Cancer Metastasis and Clinical Applications. *Onco Targets Ther*, 13, 10851-10866. <https://doi.org/10.2147/OTT.S265580>
- Wen, W., Mai, S. J., Lin, H. X., Zhang, M. Y., Huang, J. L., Hua, X., Lin, C., Long, Z. Q., Lu, Z. J., Sun, X. Q., Liu, S. L., Yang, Q., Zhu, Q., Wang, H. Y., & Guo, L. (2019). Identification of two microRNA signatures in whole blood as novel biomarkers for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *J Transl Med.*, 17(1), 186. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1923-2>
- Wu, J., Hu, S., Zhang, L., Xin, J., Sun, C., Wang, L., Ding, K., & Wang, B. (2020). Tumor circulome in the liquid biopsies for cancer diagnosis and prognosis. *Theranostics*, 10(10), 4544-4556. <https://doi.org/10.7150/thno.40532>
- Wu, L., Fan, J., & Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(11), 4034-4039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510928103>
- Wu, L., Hui, H., Wang, L. J., Wang, H., Liu, Q. F., & Han, S. X. (2015). MicroRNA-326 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting the nin one binding protein. *Oncol Rep*, 33(5), 2309-2318. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3840>
- Xian, Y., Wang, L., Yao, B., Yang, W., Mo, H., Zhang, L., & Tu, K. (2019). MicroRNA-769-5p contributes to the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by attenuating RYBP. *Biomed Pharmacother*, 118, 109343. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109343>

- Xu, Y., Chen, J., Gao, C., Zhu, D., Xu, X., Wu, C., & Jiang, J. (2017). MicroRNA-497 inhibits tumor growth through targeting insulin receptor substrate 1 in colorectal cancer. *Oncol Lett*, 14(6), 6379-6386. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7033>
- Yakabe, T., Nakafusa, Y., Sumi, K., Miyoshi, A., Kitajima, Y., Sato, S., Noshiro, H., & Miyazaki, K. (2010). Clinical significance of CEA and CA19-9 in postoperative follow-up of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 17(9), 2349-2356. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1004-5>
- Yang, Z., Yin, H., Shi, L., & Qian, X. (2020). A novel microRNA signature for pathological grading in lung adenocarcinoma based on TCGA and GEO data. *Int J Mol Med*, 45(5), 1397–1408. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4526>
- Yap, Y. S., Leong, M. C., Chua, Y. W., Loh, K. W. J., Lee, G. E., Lim, E. H., Dent, R., Ng, R. C. H., Lim, J. H., Singh, G., Tan, A., Guan, G., Wu, A., Lee, Y. F., Bhagat, A. A. S., & Lim, D. W. (2019). Detection and prognostic relevance of circulating tumour cells (CTCs) in Asian breast cancers using a label-free microfluidic platform. *PLoS One*, 14(9), e0221305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221305>
- Ye, H., Pang, L., Wu, Q., Zhu, Y., Guo, C., Deng, Y., & Zheng, X. (2015). A critical role of mir-199a in the cell biological behaviors of colorectal cancer. *Diagn Pathol*, 10, 65. <https://doi.org/10.1186/s13000-015-0260-x>
- Yu, S., Cao, H., Shen, B., & Feng, J. (2015). Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure. *Oncotarget*, 6(35), 37151-37168. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6022>
- Zhang, G. J., Zhou, H., Xiao, H. X., Li, Y., & Zhou, T. (2014). MiR-378 is an independent prognostic factor and inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 14, 109. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-109>
- Zhang, L., Cao, Y., Jia, D., & Wei, M. (2019). MicroRNA-520e restricts the proliferation and invasion of glioma cells through the downregulation of Wnt/beta-catenin signaling by targeting fibroblast growth factor 19. *Biochem Biophys Res Commun*, 511(3), 619-625. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.112>
- Zhang, L., Dong, Y., Zhu, N., Tsoi, H., Zhao, Z., Wu, C. W., Wang, K., Zheng, S., Ng, S. S., Chan, F. K., Sung, J. J., & Yu, J. (2014). microRNA-139-5p exerts tumor suppressor function by targeting NOTCH1 in colorectal cancer. *Mol Cancer*, 13, 124. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-124>
- Zhang, L., Zhang, Y., Zhu, H., Sun, X., Wang, X., Wu, P., & Xu, X. (2019). Overexpression of miR-301a-3p promotes colorectal cancer cell proliferation and metastasis by targeting deleted in liver cancer-1 and runt-related transcription factor 3. *J Cell Biochem*, 120(4), 6078-6089. <https://doi.org/10.1002/jcb.27894>
- Zhang, N., Hu, X., Du, Y., & Du, J. (2021). The role of miRNAs in colorectal cancer progression and chemoradiotherapy. *Biomed Pharmacother*, 134, 111099. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111099>
- Zhang, P., Sun, Y., & Ma, L. (2015). ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle*, 14(4), 481-487. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1006048>

- Zhao, D. Y., Zhou, L., Yin, T. F., Zhou, Y. C., Zhou, G. Y., Wang, Q. Q., & Yao, S. K. (2022). Circulating miR-627-5p and miR-199a-5p are promising diagnostic biomarkers of colorectal neoplasia. *World J Clin Cases.*, 10(16), 5165–5184. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i16.5165>
- Zhou, Y., An, H., & Wu, G. (2020). MicroRNA-6071 Suppresses Glioblastoma Progression Through the Inhibition of PI3K/AKT/mTOR Pathway by Binding to ULBP2. *Onco Targets Ther.*, 13, 9429-9441. <https://doi.org/10.2147/OTT.S265791>
- Zhu, M., Zhang, W., Ma, J., Dai, Y., Zhang, Q., Liu, Q., Yang, B., & Li, G. (2019). MicroRNA-139-5p regulates chronic inflammation by suppressing nuclear factor-kappaB activity to inhibit cell proliferation and invasion in colorectal cancer. *Exp Ther Med.*, 18(5), 4049-4057. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8032>



7. SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık
bp	: Baz Çifti
cm	: Santimetre
kb	: Kilobase
kg	: Kilogram
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
nt	: Nükleotid
µl	: Mikrolitre
°C	: Derece

<u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ABC	: ATP Binding Cassette
ACD-A	: Anticoagulant Citrate Dextrose Solution A
AEG-1	: Astrocyte Elevated Gene 1
AFP	: α-fetoprotein
AGO	: Argonaute
AKT3	: AKT Serine/Threonine Kinase 3
ALDH1	: Aldehyde Dehydrogenase 1
ANOVA	: Analysis of Variation
APC	: Adenomatous Polyposis Coli
ARHGAP10	: Rho GTPase Activating Protein 10
ATP	: Adenosine Triphosphate
AUC	: Area Under the Curve
BEAMing	: Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics
BET	: Bromodomain and Extra-Terminal Domain
BMI	: Body Mass Index
BP	: Biological Process
BRAF	: B-Raf Proto-oncogene, Serine/Threonine Kinase
BRD2	: Bromodomain Containing 2
BT, CT	: Computed Tomography
CA	: Carbohydrate Antigen/Ca-cer Antigen
CC	: Cellular Component
CCR4-NOT	: Carbon Catabolite Repressor 4 - Negative on TATA
CD9	: Cluster of Differentiation 9
CD44	: Cluster of Differentiation 44
CD45	: Lymphocyte Common Antigen
CD63	: Cluster of Differentiation 63
CD147	: Cluster of Differentiation 147
cDNA	: Complementary DNA
CEA	: Carcinoembryonic Antigen
CEC	: Circulating Endothelial Cell
cfDNA	: Cell free DNA
cfRNA	: Cell free RNA
ChIP-seq	: Chromatin Immunoprecipitation Sequencing
CIMP	: CpG Island Methylator Phenotype
CIN	: Chromosomal Instability

CK	: Cytokeratins
CMS	: Consensus Molecular Subtypes
CREBRF	CREB3 Regulatory Factor
COAD	: Colon Adenocarcinoma
CT	: Computed Tomography
ctDNA	: Circulating Tumor DNA
CTC	: Circulating Tumor Cell
ctRNA	: Circulating Tumor RNA
DAPI	: 4',2'-diamidino-2-fenilindol dihidroklorür
DDR1	: Discoidin Domain Receptors 1
DEM	: Differentially Expressed miRNA
DGCR8	: DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
dMMR	: Mismatch Repair Deficiency
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
E2F1	: E2F Transcription Factor 1
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	: Epithelial-Mesenchymal Transition
EpCAM	: Epithelial Cell Adhesion Molecule
ER	: Estrogen Receptor
ERK	: Extracellular Signal Regulated Kinase
ESPR1	: Epithelial Splicing Regulator 1
EVs	: Extracellular Vesicles
exDNA	: Extracellular DNA
exRNA	: Extracellular RNA
FAP	: Familial Adenomatous Polyposis Coli
FGF19	: Fibroblast Growth Factor 19)
FISH	: Fluorescent in situ Hybridization
GA733-2	: Epithelial Cell Adhesion Molecule
GD	: Ganglioside
GE	: Gene Expression
GLOBOCAN	: Global Cancer Observatory
GP2	: Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 2
GTE _x	: Genotype-Tissue Expression
GTP	: Guanosine-5'-triphosphate
GW182	: Glycine(G)-Tryptophan(W) Repeats
HER2	: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HEY1	: Hairy/Enhancer-Of-Split Related With YRPW Motif 1
HNPCC	: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HS	: High Sensitivity
HTLV-1	: Human T-lymphotropic Virus 1
IBD	: Inflammatory Bowel Disease
IGF1-R	: Insulinlike Growth Factor 1 Receptor
IKBKB	: Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta
IPA	: Ingenuity Pathway Analysis
IRS1	: Insulin Receptor Substrate 1
KEGG	: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KRAS	: Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene
KRK	: Kolorektal Kanser
lncRNA	: Long Non-coding RNA
MALDI-TOF	: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-time of Flight
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinase
MCPIP1	: Monocyte Chemoattractant Protein 1-Induced Protein 1

MF	: Molecular Function
MET	: Mesenchymal–Epithelial Transition
MGMT	: O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
miRNA	: MicroRNA
mKRK	: Metastatik Kolorektal Kanser
MLH1	: MutL Homolog 1
MMP-2	: Matrix Metalloproteinase-2
MMP-7	: Matrix Metalloproteinase-7
MMP-9	: Matrix Metalloproteinase-9
MR, MRI	: Magnetic Resonance Imaging
MRD	: Minimal Residual Disease
mRNA	: Messenger RNA
MMR	: Mismatch Repair
MS	: Mass Spectrometry
MSH2	: mutS Homolog 2
MSH6	: mutS Homolog 6
MSI	: Microsatellite Instability
MSS	: Microsatellite Stability
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin
MUC-1	: Musin-1
mVa	: Missing Value Analysis
NAT10	: N-Acetyltransferase 10
NCI	: National Cancer Institute
ncRNA	: Non-coding RNA
NFIB	: Nuclear Factor I B
NF-κB	: Nuclear Factor kappa B
NGS	: Next Generation Sequencing
nmKRK	: Non-metastatik Kolorektal Kanser
NSAID	: Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs
NTRK	: Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase
OS	: Overall Survival
PABP	: Poly(A) Binding Protein
PACT	: Protein Activator of Protein Kinase R
PAN	: Poly(A) Nuclease
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PET	: Positron Emission Tomography
PFS	: Progression-free Survival
PLS3	: Plastin-3
PMS2	: PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component
PR	: Progesterone Receptor
PTBP3	: Polypyrimidine Tract Binding Protein 3
Pri-miRNA	: Primary miRNA
PSA	: Prostate-specific Antigen
RAF	: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	: Rat Sarcoma
Ran-GTP	: Ras-related Nuclear Protein
READ	: Rectum Adenocarcinoma
RIN	: RNA Integrity Number
RLC	: RISC Loading Complex
RNA	: Ribonucleic Acid
rRNA	: Ribosomal RNA
RISC	: RNA-Induced Silencing Complex
RNAInter	: RNA Interactome Database

RNF145	: Ring Finger Protein 145
RPS6KA3	: Ribosomal Protein S6 Kinase A3
ROC	: Receiver Operating Characteristic
RT	: Reverse Transcription
SEER	: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SERPINE1	: Serpin Family E Member 1
SNAI1	: Snail Family Transcriptional Repressor 1
SNHG16	: Small Nucleolar RNA Host Gene 16
TCGA	: The Cancer Genome Atlas
tdEVs	: Tumor-derived Extracellular Vesicles
TEP	: Tumor Educated Platelet
TP53	: Tumor Protein 53
TRBP	: HIV Transactivating Response RNA Binding Protein
TWIST1	: Twist Family Basic helix–loop–helix Transcription Factor 1
UCSC	: University of California, Santa Cruz
ULBP2	: UL16 Binding Protein 2
UTR	: Untranslated Regions
Wnt	: Wntless-related Integration Site
Zc3h12a	: Zinc-finger CCCH-type Containing 12A
ZEB1	: Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
ZO	: Zonula Occludens

8. EKLER



9. TEŞEKKÜR

Akademik kariyerimin en önemli aşamalarından birini tamamlıyorum. Zorlu ve meşakkatli örnek toplama sürecini ve deney adımlarını tamamlayarak tez çalışmamın sonuna gelmiş olmanın mutluluğunu ve gururunu yaşıyorum. Tezimi yürüttüğüm süre boyunca destek olan kurum ve kişilere teşekkürlerimi iletmeyi bir borç bilirim.

Doktora eğitimimde bana yol gösteren, eğitim süresince gösterdiği sabır, ilgi ve alakadan dolayı doktora tez danışmanım Doç. Dr. Dilek Pirim'e,

Akademik tecrübeleri ve manevi desteği ile eğitim sürecime değer katan, her türlü kolaylığı sağlayan ve destek olan, ilgi, alaka ve anlayışı nedeniyle çok değerli Ana Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Halil Sağlam'a,

Tez projemin ilerlemesinde tıbbi olarak destek aldığım ve uzun örnek toplama sürecinde bana yardımcı olan Tez İzleme Komitesi'nde yer alan Prof. Dr. Türkkkan Evrensel'e ve proje ekibinde yer alan Doç. Dr. Özgen Işık'a,

Tez döneminde her zaman yardımcı olan, değerli bilgilerini paylaşan diğer Tez İzleme Komitesi Üyesi olan Prof. Dr. Ferda Arı'ya,

Tüm akademik sürecimde yanımda olan, deneysel sürecimi gerçekleştirmem için izin veren ve akademik faaliyetlere katılmama onay veren başta Prof. Dr. Şehime Gülsün Temel'e ve Doç. Dr. Şebnem Özemri Sağ'a,

Projemizin gerçekleşmesinde emeği geçen Omik Analiz ve Araştırma Laboratuvarı ekibine,

Projemize destek veren Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Örnek toplama süresince birlikte çalıştığımız Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda görev alan Saliha Macun ve Mine Taylan'a,

Tez çalışmamda uyguladığım AdnaTest tekniğini gözlemleme ve uygulama şansı sunan Almanya'da bulunan QIAGEN GmbH'i iki kez ziyaret etmemi kabul eden ve her konuda destek veren bünyesindeki Dr. Siegfried Hauch, Dr. Constanze Kindler ve Dr. Thorsten Singer'a,

Doktora eğitiminin ilk senelerinde İstanbul Üniversitesi'nde danışmanlığımı yürüten, akademik ve sosyal hayatımda her zaman destekçim ve çalışmalarımıza aralıksız devam ettiğimiz, yüksek lisans tez danışmanım Prof. Dr. Tuba Günel'e,

Son olarak ve en çok, zorlu eğitim ve mesleki hayatımda hiçbir zaman sevgi ve desteğini esirgemeyen, sabır ve anlayışla yanımda olan, umut veren, sahip olduğum en değerli hazinelerim ve destekçilerim anneme, babama ve kız kardeşime,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı, teşekkürlerimi sunarım.

Siz olmasaydınız bu tez de olamazdı.

10. ÖZGEÇMİŞ

Berkcan DOĞAN, Lisans eğitimini Hacettepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamlayarak 19 Ocak 2015 tarihinde mezun olmuştur. Lisans eğitimi sırasında İngiltere'de yabancı dil eğitimi aldıktan sonra, Erasmus Staj Programı ile İtalya'da CIBio (Centre for Integrative Biology) merkezinde 5 ay eğitim alarak kanser araştırmalarına başlamıştır.

2015 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde başladığı Yüksek Lisans eğitimini 17 Mayıs 2018 tarihinde tamamlamıştır. Yüksek Lisans tezinde over kanserinin erken tanısına yönelik miRNA temelli aday biyobelirteçlerin validasyonunu tamamlamıştır. Eğitiminin tez aşamasında, İstanbul'da bir Biyoteknoloji firmasında Ar-Ge sorumlusu olarak görev almıştır.

24 Ağustos 2018 tarihinde İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Doktora eğitimine başlamıştır. 14 Mayıs 2019 tarihinde ise Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalında Translasyonel Tıp Öncelikli Alanında Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır. YÖK100/2000 bursiyeri olarak İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde başladığı Doktora eğitimine Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Translasyonel Tıp Ana Bilim Dalına yatay geçiş yapmıştır. Doktora eğitimi sırasında Erasmus programı kapsamında desteklenmeye hak kazanarak Almanya'da bulunan QIAGEN isimli firma bünyesinde tez çalışmasında kullandığı metodolojileri uygulamak için staj yapmıştır. Ek olarak, 2022-2024 yılları arasında Translasyonel Tıp Ana Bilim Dalı öğrenci temsilciliği görevini üstlenmiştir.

2021 yılından beri Moleküler Kanser Araştırma Derneği (MOKAD) mevcut Yönetim Kurulu üyesidir. MOKAD dışında British Association for Cancer Research, International Society of Liquid Biopsy, European Association for Cancer Research, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği gibi farklı ulusal ve uluslararası dernek üyelikleri bulunmaktadır.

Akademik yaşamı boyunca çeşitli kanser araştırma projelerinde araştırmacı olarak görev almıştır. Arş. Gör. Berkcan DOĞAN'ın toplam 15 uluslararası yayını (SCI-E ve SCI), 4 ulusal yayını, 2 kitap bölümü ve Google Scholar verilerine göre yaklaşık 89 atfı bulunmaktadır (Google Scholar h-index: 6). Bununla birlikte, ulusal ve uluslararası kongrelerde pek çok poster ve sözlü sunum ile akademik çalışmalarını aktarmıştır. Ek olarak, birçok ulusal ve uluslararası gerçekleşen bilimsel kongrelerin düzenleme kurullarında ve bilimsel komitelerinde görev almıştır.

2023 yılında TEKNOFEST festivali kapsamında Biyoteknoloji İnovasyon Yarışması Üniversite ve Üzeri Seviyesi Fikir Kategorisi'nde "Gözyaşı Kökenli Eksozomal MikroRNA'lar ile Kanser Hastalarının Kemoterapi Yanıtlarının Değerlendirilmesi" başlıklı geliştirdiği proje fikri 3. olarak dereceye almaya hak kazanmıştır.

Arş. Gör. Berkcan DOĞAN, kanser biyobelirteçleri, likit biyopsi, kodlama yapmayan RNA'lar, dolaşımdaki tümör hücreleri, mikroyarray ve biyoinformatik analizler ile ilgili alanlarda araştırma projelerine ve bilimsel çalışmalarına devam etmektedir.