



T.C.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

KRAS MUTANT KOLOREKTAL KANSER KARACİĞER METASTAZI
OLAN HASTALARDA MİRNA'LARIN ROLÜNÜN RETROSPEKTİF
ARAŞTIRILMASI

Dr. Hatice ASLAN

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2024



T.C.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

**KRAS MUTANT KOLOREKTAL KANSER KARACİĞER METASTAZI
OLAN HASTALARDA MİRNA'LARIN ROLÜNÜN RETROSPEKTİF
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Hatice ASLAN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Adem DELİGÖNÜL

BURSA-2024

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ÖZET	ix
İNGİLİZCE ÖZET	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	13
2.GENEL BİLGİLER.....	15
2.1.Epidemiyoloji.....	15
2.2.Etiyoloji	17
2.3.Risk Faktörleri.....	17
2.4.Kolorektal Kanser Karsinogenezi.....	18
2.4.1. Kromozomal İstabilite (CIN).....	19
2.4.2. Mikrosatellit İstabilite (MSI).....	19
2.4.3.Cpg Adası Metilatör Fenotipi (Cımp)	20
2.5.KRK Karsinogenezinde Rol Oynayan Genlerden KRAS.....	21
2.6.KRK Karaciğer Metastazı.....	22
2.7.Mikro- RNA'lara Genel Bakış.....	22
2.8.KRK Tanı Ve Ayırıcı Tanısı.....	25
2.9.KRK Evreleme.....	26
2.10. Metastatik KRK Da Tedavi.....	29
2.10.1. Neoadjuvan Tedavi.....	30
2.10.2. Cerrahi Yaklaşım.....	30
2.10.3.Kemoterapi.....	32
2.10.4.Hedefe Yönelik Tedaviler.....	34
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	37
3.1. Hasta Grubu.....	37
3.2. Gereçler ,.....	37
3.2.1. Kullanılan Sarf Ve Ekipmanlar.....	37
3.2.2. Kullanılan Cihazlar.....	38

3.3. Yöntemler	38
3.3.1. Parafin Doku Örneklerinden Rna İzolasyonu.....	38
3.3.2. Rna Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	39
3.3.3. Rna'lardan Cdna Sentezi.....	40
3.3.4. Real-Time PCR (RT-qPCR) ile miRNA Ekspresyon Analizleri.....	41
3.3.5.Rt-Qpcr Tabanlı Mirna Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi	44
3.3.6.İstatistiksel Analiz.....	45
4.BULGULAR.....	47
4.1.Kolorektal Kanser Hastalarının Demografik, Klinik Histopatolojik Özelliklerine İlişkin Bulgular.....	47
4.2.Tümörlü Ve Komşu Sağlıklı Dokularda miRNA Ekspresyon Düzeylerine İlişkin Bulgular.....	49
4.3. miRNA Gen Ekspresyonları İle Bazı Klinikopatolojik Özellikler Arasındaki İlişkiye Yönelik Bulgular.....	58
4.4. Sağkalım Verileri.....	62
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	71
KAYNAKLAR.....	79
TEŞEKKÜR.....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	87

KISALTMALAR

5FU: Fluorourasil

AJCC: American Joint Committee on Cancer

AKT: Protein kinaz B

BAP: Bilimsel Araştırma Projesi

BCL2: B-Hücreli Lenfoma 2

cDNA: Komplementer DNA

CIMP: CpG Ada Metilatör Fenotip

CIN: Kromozomal İnstabilite

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

EMT: Epitelial Mezenkimal Transition (geçiş)

ERK: Extracellular signal regulated kinase

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)

FFPE: Parafine gömülü formalin ile fikse edilmiş doku (Formalin Fixed Paraffin Embedded)

FOLFİRİ: 5-FU, Lökoverin, İrinotekan

FOLFOX: 5-FU, Lökoverin, Oksaliptin

HCC: Hepatosellüler Karsinom

HNPCC: Herediter Non-Polipozis Kolorektal Kanseri

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

KRAS: Kristen Rad Sarkoma

KRK: Kolorektal Kanseri

KRKM: Kolorektal Kanseri Karaciğer Metastazı

MetastamiR: Metastazla ilişkili Mikro RNA'lar

miRNA: Mikro RNA

mKRK: Metastatik Kolorektal Kanseri

MMR: Mismatch Repair

MSI: Mikrosatellit İnstabilite

MSS: Mikrosatellit Stabil

NRAS: Neuroblastoma Rat Sarcoma
MUTYH: Baz Eksizyon Onarım Geni (MutY Homolog Gen)
OS: Genel Sağkalım
PCR: Polimeraz Zincir Tepkimesi
RAS: Rad Sarkoma
RCC: Renal Hücreli Karsinom
RF: Radyofrekans Ablasyon
sncRNA: Küçük Kodlama Yapmayan RNA
SYBR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
TAKE: Transkateter Arteriyel Kemo Embolizasyon
T-ALL: T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
TGF: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNM: Tümör Nod Metastaz
TP53: Tümör Protein 53
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1: DSÖ Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı'nın yaşa standardize edilmiş kanser insidansı.....	16
Şekil-2: Tüm Yaş Gruplarında Cinsiyete Göre En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları.....	16
Şekil-3: Metastatik kolorektal kansere cerrahi yaklaşımı.....	32
Şekil-4: RT-qPCR analizi şematik gösterimi.....	42
Şekil-5: Hasta ve kontrol grubunun miR-16 ekspresyon dağılımları.....	50
Şekil- 6: Hasta ve kontrol grubunun miR-143 ekspresyon dağılımları.....	50
Şekil-7: Hasta ve kontrol grubunun miR-193a-3p ekspresyon dağılımları...	51
Şekil-8: Hasta ve kontrol grubunun miR-543 ekspresyon dağılımları.....	52
Şekil-9: Hasta ve kontrol grubunun miR-622 ekspresyon dağılımları.....	52
Şekil-10: Hasta ve kontrol grubunun miR-30b ekspresyon dağılımları.....	53
Şekil-11: Hasta ve kontrol grubunun miR-29b ekspresyon dağılımları.....	53
Şekil-12: Hasta ve kontrol grubunun miR-96-5p ekspresyon dağılımları.....	54
Şekil-13: Hasta ve kontrol grubunun miR-384-3p ekspresyon dağılımları...	55
Şekil-14: Hasta ve kontrol grubunun miR-200c ekspresyon dağılımları.....	55
Şekil-15: Hasta bazlı miRNA ifade düzeylerinin ısı haritası.....	57
Şekil-16: Hastaların genel sağkalımları.....	62
Şekil-17: Hastaların tümör lokalizasyonuna göre ortalama sağkalım süreleri.....	63
Şekil-18: Hastaların tanı anı metastaz durumuna göre ortalama sağkalım süreleri.....	64
Şekil-19: Hastaların karaciğere metastazektomi yapılma durumuna göre ortalama sağkalım süreleri.....	65
Şekil-20: Hastaların Karaciğere lokal tedavi alma durumuna göre ortalama sağkalım süreleri.....	66
Şekil-21: Hastaların tümör grade durumuna göre ortalama sağkalım süreleri.....	67

Şekil-22: miR-96-5p ekspresyonu artan ve azalan hastalarda ortalama sağkalım süreleri.....	66
--	----



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo-1: Kolorektal kanser için risk faktörleri.....	17
Tablo-2: Kolon Rektum Tümörleri Patolojik Evreleme Sistemi.....	27
Tablo-3: Çalışmaya dahil edilen hastaların klinikopatolojik özellikleri.....	48
Tablo-4: Çalışmaya dahil edilen hastaların tedavi modaliteleri.....	49
Tablo-5: Hastaların Cinsiyetine Göre miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	58
Tablo-6: Hastaların Metastaz Durumuna Göre miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	60
Tablo-7: Tümör Lokalizasyonuna Göre miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması	61
Tablo-8: miRNA ekspresyonlarının artıp azalma durumuna göre ortalama sağkalım süreleri.....	68
Tablo-9: Kras mutant karaciğer metastazlı kolorektal kanserli hastalarda OS'yi etkileyen tek değişkenli ve çok değişkenli analiz değerlendirmesi.....	70

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge-1: cDNA sentezi için reaksiyon karışımı.....	40
Çizelge-2: cDNA sentezi için PCR koşulları.....	40
Çizelge-3: RT-qPCR için reaksiyon karışımı.....	42
Çizelge-4: RT-qPCR koşulları.....	43



ÖZET

Kolorektal kanser, dünyada en yaygın üçüncü kanser türüdür ve tedavideki gelişmelere rağmen kansere bağlı ölümlerin başlıca ikinci sebebidir. KRK hastalarının yaklaşık %70-80'inde nüks ve/veya metastaz gelişir ve metastatik bölgelerin %50'sinden fazlası karaciğerdedir. Kolorektal kanser karaciğer metastazı, KRK'ya bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. KRAS mutasyonu tümör gelişimi ve metastazda önemli bir rol oynar, son çalışmalar KRAS transkripsiyon düzenleyicilerinin gen mutasyonlarının miRNA'ların düzensizliğiyle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda KRAS mutant kolorektal kanser karaciğer metastazlı hastalarda KRAS genini hedefleyen ve kolorektal karaciğer metastazında etkinliği bilinen 10 miRNA'nın (miR-16, miR-143, miR-193a-3p, miR-543, miR-200c, miR-622, miR-30b, miR-29b, miR-96-5p, miR-384-3p) ekspresyon düzeylerini ve hastalığın tanısında ve ilerlemesindeki potansiyellerini belirlemek amacıyla, KRAS geninde mutasyon saptanmış, kolorektal karaciğer metastazlı 42 hastaya ait parafine gömülü (FFPE) tümör dokusu ve ilgili hastaların 28'inin sağlıklı (normal) dokusu dahil edildi. Kantitatif Real Time-PCR yöntemiyle ilgili miRNA'ların ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, hasta grubunda miR-16, miR-143, miR-96-5p'nin ekspresyonunun tümörlü dokularda normal dokulara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı, miR-200c, miR-543, miR-622, miR-30b, miR-29b, ve miR-384-3p'nin ekspresyonun ise anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Buna karşın, miR-193a-3p ekspresyon seviyeleri, kontrol grubu ile hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. Ayrıca miR96-5p'nin ortalama sağkalım üzerinde istatistik olarak anlamlı bir etkisi gözlenmiştir.

Çalışılan miRNA'ların KRK'lı dokularda normal dokuya göre önemli derecede farklı çıkması karsinomatozis ve metastazda önemli rol oynadığını KRK prognozunu ve gelişebilecek metastatik süreci değerlendirmede yol gösterici olabileceklerini ve miRNA ekspresyon farklılıklarının metastatik

KRK'da biyobelirteç olarak kullanılmasının yakın gelecekte mümkün olabileceği ve bu doğrultuda ileri fonksiyonel analizlerin yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer Metastazı, Kolorektal Kanser, KRAS, miRNA, biyobelirteç.



SUMMARY

RETROSPECTIVE INVESTIGATION OF THE ROLE OF miRNAs IN KRAS MUTANT COLORECTAL CANCER PATIENTS

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide and, despite advancements in treatment, remains the second leading cause of cancer-related deaths. Approximately 70-80% of CRC patients develop recurrence and/or metastasis, with over 50% of metastatic sites located in the liver. Liver metastasis from colorectal cancer is a major cause of mortality related to CRC. KRAS mutations play a significant role in tumor development and metastasis, and recent studies have shown that KRAS transcriptional regulators are closely associated with the dysregulation of miRNAs.

In our study, we aimed to determine the expression levels of 10 miRNAs (miR-16, miR-143, miR-193a-3p, miR-543, miR-200c, miR-622, miR-30b, miR-29b, miR-96-5p, miR-384-3p) targeting the KRAS gene, whose effectiveness in colorectal liver metastasis is well known, and to assess their potential in diagnosing and monitoring disease progression in KRAS mutant colorectal cancer liver metastasis patients. The study included formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue from 42 patients with KRAS mutations and colorectal liver metastasis, as well as healthy (normal) tissue from 28 of these patients. The expression levels of the relevant miRNAs were determined using quantitative Real-Time PCR.

The results indicated that in the patient group, the expression of miR-16, miR-143, and miR-96-5p was significantly reduced in tumor tissues compared to normal tissues, while the expression of miR-200c, miR-543, miR-622, miR-30b, miR-29b, and miR-384-3p was significantly increased. In contrast, the expression levels of miR-193a-3p did not show a statistically significant difference between the patient and control groups. Furthermore, miR-96-5p had a statistically significant impact on overall survival.

The significant differences in miRNA expression in CRC tissues compared to normal tissues suggest that these miRNAs play important roles in carcinomatosis and metastasis. They may serve as potential biomarkers for assessing CRC prognosis and metastatic processes. The expression differences in miRNAs could potentially be used as biomarkers in metastatic CRC in the near future, highlighting the need for further functional analyses in this area.

Keywords: Liver Metastasis, Colorectal Cancer, KRAS, miRNA, Biomarker.



1-GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser, dünyada en yaygın üçüncü kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin başlıca ikinci sebebidir (1). Her yıl 1,2 milyondan fazla hastaya kolorektal kanser tanısı konmakta ve 600.000'den fazlası hastalıktan ölmektedir (2). Ülkemizde Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün 2018 de yaptığı çalışmada kolorektal kanserler hem kadınlarda hem de erkeklerde üçüncü sıradaki yerini muhafaza etmektedir ve bir yılda yaklaşık 18.750 kişiye kolorektal kanser teşhisi konulmuştur (3).

KRK hastalarının yaklaşık %70-80'inde nüks ve/veya metastaz gelişir, asemptomatik dönemde nüksün erken saptandığı vakalarda 5 yıllık sağkalım yaklaşık %20 iken, semptomatik olduktan sonra metastatik hastalık saptananlarda 5 yıllık sağkalım %5 olarak görülmektedir(4). Ve metastatik bölgelerin %50'sinden fazlası karaciğerdedir. Kolorektal kanser karaciğer metastazı (KRKM), KRK'ya bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (5) KRK'lı hastalarda nükslerin henüz semptomatik olmadan erkenden saptanabilmesi amacıyla tümör belirleyicileri uzun süredir araştırılmaktadır (6).

Mevcut parametrelere göre Kristen Rad Sarkoma (KRAS) mutasyonları, KRK'da en iyi çalışılan biyobelirteçlerden biridir (7). Metastatik kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %40'ında KRAS mutanttır (8). KRAS mutasyonu tümör gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamasına rağmen, KRAS aracılı transkripsiyonel regülasyonun mekanizması hala tam olarak anlaşılamamakla birlikte giderek artan sayıda çalışma, transkripsiyon düzenleyicilerinin gen mutasyonlarının miRNA'ların düzensizliğiyle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir ve bazı miRNA'ların etkilerini göstermek için KRK'daki mutant KRAS ile doğrudan etkileşime girdiğine dair çalışmalar mevcuttur (9). Çalışmalar miRNA'ların anjiyogenez, tümör invazyonu, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve kanser hücrelerinin kök yapısı dahil olmak üzere KRKM oluşumunun tüm basamaklarında önemli bir düzenleyici rol oynadığını göstermiştir (10,11).

Günümüzde kolorektal kanser, hepatosellüler karsinoma, pankreatik karsinoma, meme kanseri ve akciğer kanseri gibi birçok kanser türü için farklı miRNA ekspresyon profilleri tanımlanmıştır (12). Artan kanıtlar miRNA'ların düzensiz ekspresyonunun, KRK'nın ilerlemesinde ve metastazında, spesifik mesajcı RNA (mRNA) hedeflerinin ekspresyonunu düzenlemek için tümör baskılayıcılar veya onkogenler olarak işlev gören fonksiyonel bir rolü olduğunu vurgulamaktadır (13)(14). Wnt/ β katenin, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) ve Tümör Protein 53 (TP53) gibi sinyal yollarının regülasyonlarındaki bozuklukların, KRK'nın gelişimine, invazyon ve metastazına neden olduğu gösterilmiştir (22,23). Bu nedenle birçok çalışma, KRK gelişimi, ilerlemesi ve metastazının altını çizen moleküler bulmacayı tamamlamada, miRNA-mRNA etkileşim ağlarını tespit etmek için bu alana odaklanmıştır (11). Son yıllarda miRNA'ların tümörün başlaması ve gelişmesinde önemli rolleri olduğu ve KRKM'nin tüm yönlerinde miRNA'ların; tümör gelişimi, anijiyogenez, tümör invazyonu ve metastazı ve Epitelial Mezenkimal Transition (EMT) süreçlerinde düzenleyici görevler üstlendiği saptanmıştır (15).

Bu bilgilerden yola çıkarak tezimizde, karaciğer metastazı yapmış KRAS mutant kolorektal kanserli 42 hastada, KRAS geninin hedeflediği 10 miRNA'nın (miR-16, miR-143, miR-193a-3p, miR-543, miR-200c, miR-622, miR-30b, miR-29b, miR-96-5p, miR-384-3p) ekspresyon düzeylerindeki farklılıkların araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, KRAS'ı hedefleyen miRNA'ların ekspresyon profillerindeki değişimlerin aydınlatılması, bu genin anormal aktivasyonunu durdurmada ve KRK'in prognoz ve tedavisine katkıda önemli bir yol olabilecektir. Anlamlı miRNA'ların KRKM' de tedavi stratejileri için de ideal potansiyel hedefler haline gelebileceği düşünülebilir. Ayrıca elde edilen sonuçlar neticesinde, ilgili miRNA'ların KRAS mutant kolorektal karaciğer metastazı olan hastalarda aday bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliği açığa kavuşturulacaktır.

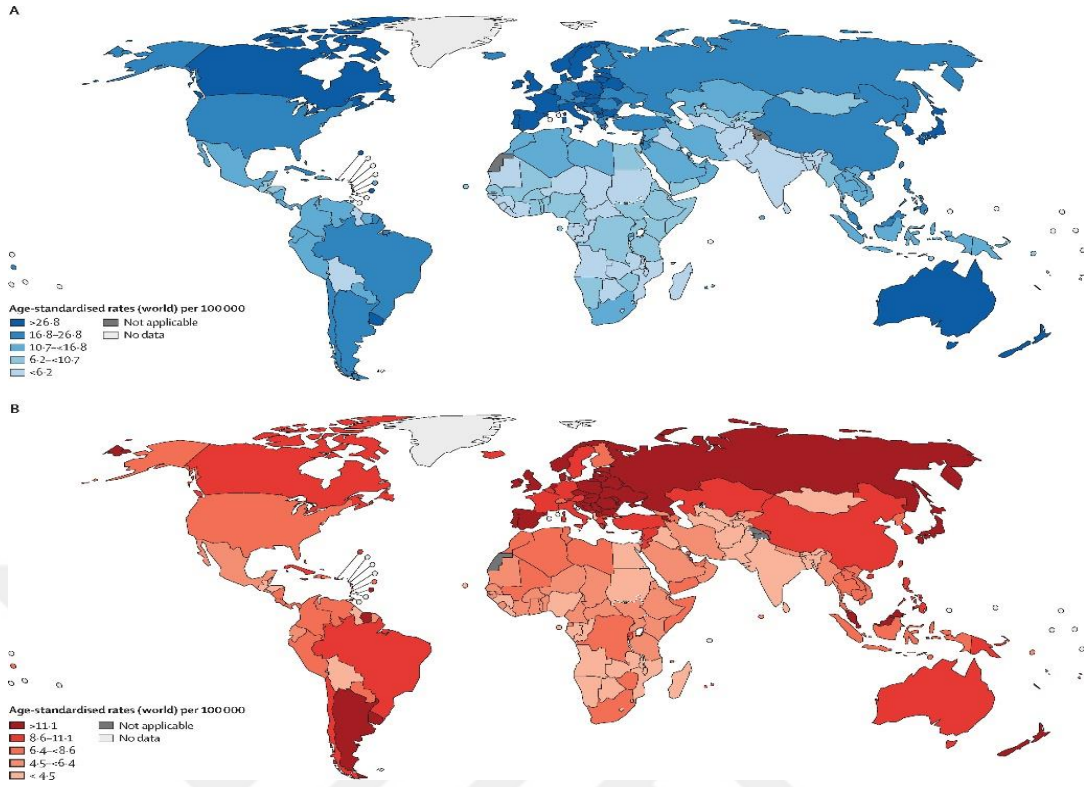
2.GENEL BİLGİLER

Kolorektal kanser, kalın bağırsağın (kolon ve rektum) mukozasından kaynaklanan malign bir neoplazmdır. Kolorektal kanserlerin yaklaşık üçte ikisi kolonda, geri kalanı ise rektumda meydana gelir(16).

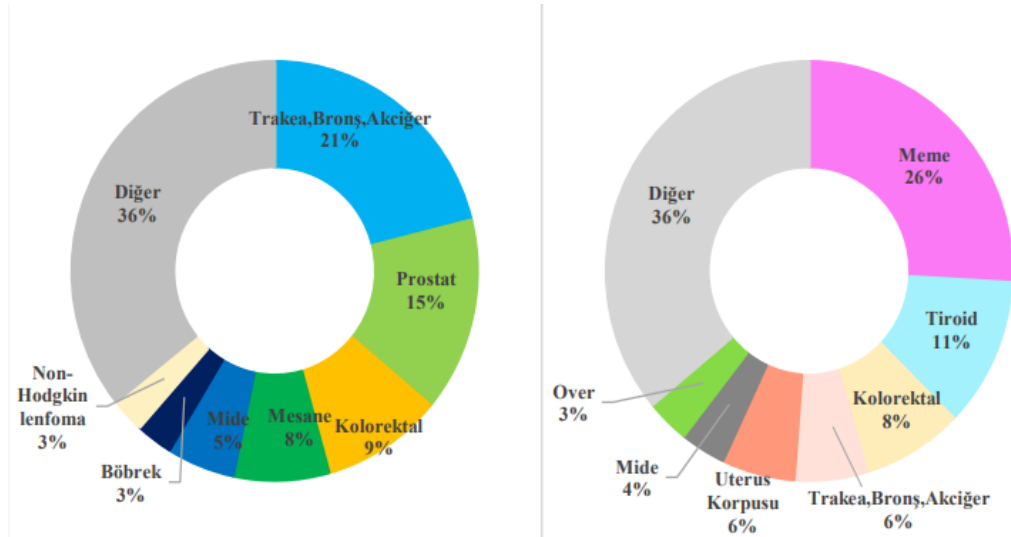
2.1.Epidemiyoloji

Kolorektal kanser, dünyada en yaygın üçüncü kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin başlıca ikinci sebebidir(1). Her yıl 1,2 milyondan fazla hastaya kolorektal kanser tanısı konmakta ve 600.000'den fazlası hastalıktan ölmektedir. İnsidans küresel olarak büyük farklılıklar göstermektedir ve batılı yaşam tarzı olarak adlandırılan unsurlarla yakından bağlantılıdır (2). En yüksek insidans Avustralya ve Yeni Zelanda' da bulunurken, Batı Afrika en düşük insidansa sahiptir (17). Erkeklerde tüm kanserlerin yaklaşık %10'unu, kadınlarda ise %9,2'sini oluşturur.

Ülkemizde Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün 2018 de yaptığı çalışmada kolorektal kanserler hem kadınlarda hem de erkeklerde üçüncü sıradaki yerini muhafaza etmektedir. Sıklığı erkeklerde yüz binde 24,8 iken kadınlarda yüz binde 14,7'dir ve bir yılda yaklaşık 18.750 kişiye kolorektal kanser teşhisi konulmuştur (3). Şekil-1'de DSÖ Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın en son rakamlarına göre dünya genelinde yaşa standardize edilmiş kanser insidansı verilmiştir. Şekil-2'de ise Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'na ait kanser istatistikleri verilerinden alınmış tüm yaş gruplarında cinsiyete göre en sık görülen bazı kanserlerin yüzde dağılımları gösterilmiştir (3).



Şekil-1: DSÖ Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın en son rakamlarına göre beş kıtadaki ülkeler için yaşa standardize edilmiş kanser insidansı (A) ve mortalite (B) oranları (18)



Şekil-2: Tüm Yaş Gruplarında Cinsiyete Göre En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2018, melanom olmayan deri kanserleri dahil (3).

2.2.Etiyoloji

Kolorektal kanserin etiyolojisinde hem genetik hem de çevresel risk faktörleri önemli rol oynamaktadır (17) Onkogenlerde, tümör baskılayıcı genlerde ve DNA onarım mekanizmalarıyla ilgili genlerde ortaya çıkan mutasyonlar, diğer kanser türlerinde olduğu gibi kolorektal kanserin başlamasına yol açabilir. Nokta mutasyonlarından türetilen kanserlere sporadik kanserler denir ve tüm kolorektal kanserlerin %70'ini oluşturur (19). Lynch sendromu, ailesel adenomatöz polipozis, MUTYH ile ilişkili polipozis ve bazı hamartomatöz polipozis sendromları dahil olmak üzere iyi tanımlanmış kalıtsal sendromlar ise tüm kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %5-7'sini oluşturur (20). Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve Lynch sendromu (kalıtsal polipozis dışı kolorektal kanser (HNPCC), kalıtsal kolon kanseri sendromlarının en yaygın olanlarıdır (21).

2.3.Risk Faktörleri

Kolorektal kanser risk faktörlerinin iki geniş kategorisi vardır; değiştirilemeyen ve değiştirilebilen risk faktörleri Tablo- 1'de verilmiştir.

Tablo-1: Kolorektal kanser için risk faktörleri (22)

Değiştirilemeyen Risk Faktörleri	Değiştirilebilir Risk Faktörleri
İrk	Sedanter Yaşam
Cinsiyet	Diyet
Yaş	Obezite
Hereditör Mutasyonlar	Sigara
İnflamatuar Bağırsak Hastalıkları	Alkol Kullanımı
Abdominal Radyasyon	Diyabet ve İnsülin Direnci
Kistik Fibrozis	Bağırsak Mikrobiyotası
Akromegali	
Kolesistektomi	
Androjen Tedavisi	

Kolorektal kanser için ana risk faktörü yaştır. Epidemiyolojik çalışmalar erkek cinsiyet ve artan yaş ile hastalık insidansı arasında güçlü ilişkiler olduğunu göstermiştir (18). Yaşamın beşinci on yılı sonrasında KRK gelişme riski belirgin şekilde artarken, elli yaşın altında kolorektal kanser tanısı kalıtsal kanserler dışında nadirdir. Yaşın yanı sıra başka doğal risk faktörleri de vardır (19). Bunlar arasında erkek cinsiyet, Afro-Amerikan etnik kökeni, inflamatuvar bağırsak hastalığı (özellikle ülseratif kolit), obezite, hareketsiz yaşam tarzı, yoğun işlenmiş kırmızı et tüketimi, sigara içme, alkol tüketimi, geçmişte batın bölgesine radyoterapi öyküsü, akromegali, immünosupresif ilaç kullanımı, böbrek transplantasyon öyküsü, diyabetes mellitus ve insülin direnci, androjen tedavisi, kolesistektomi, koroner arter hastalığı ve üreterokolik anastomoz bulunmaktadır (23).

2.4.Kolorektal Kanser Karsinogenezi

Normal mukozada proliferasyonu arttıran, doğal olarak oluşan ve normal şekilde çalışan onkogenler (proto-onkogenler) ile proliferasyonu azaltan tümör baskılayıcı genler arasındaki dengenin bir sonucu olarak proliferasyon hızı sabittir. Genlerin fonksiyonel DNA dizileri (ekzonlar), metilasyon gibi değişiklikler ve yüzey reseptörlerinden gelen aşağı akış sinyal proteinleri tarafından düzenlenir (24). Bu DNA dizilerindeki değişiklikler ailesel ya da sporadik tüm kolorektal kanserlerde, adenomdan kansere giden süreci başlatan temel mekanizmadır (25). Üç moleküler karsinogenezi yolu tanımlanmıştır:

1. Kromozomal instabilite (CIN),
2. Mikrosatellit instabilitesi (MSI) ve
3. CpG adası metilatör fenotipi (CIMP)

2.4.1. Kromozomal İnstabilite (CIN): CIN yolu tüm KRK vakalarının %80-85'inin nedenini temsil ettiğinden klasik yol olarak kabul edilir (19). Bu yolda çeşitli onkogen ve tümör süpressör genlerde görülen seri mutasyonların ardı ardına kümülasyonu sonucu kromozomal instabilite ortaya çıkmaktadır. Bu ara yolda, moleküler değişikliklerle tanımlanabilen bir dizi morfolojik değişiklik eşlik etmekte ve lezyonların progresyonu sonucu kolorektal karsinoma gelişmektedir. En erken lezyon lokalize epitelyal proliferasyonlar şeklindedir. Bunu küçük adenoma oluşumu ve daha sonra bunların büyümesiyle displastik değişikliklerin ortaya çıkması ve sonunda da invaziv kanserin gelişimi izlemektedir (26).

Kromozomal instabilite tipik olarak tümör baskılayıcı genler APC ve TP53'te ve onkogen KRAS'ta mutasyonlarla sonuçlanır. APC'deki mutasyonlar, Wnt sinyal yolunun aktivasyonuna neden olur ve bu kromozomal instabilite yolunda adenomların başlangıcındaki en erken olaydır (27).

CIN tümörleri en sık görülen tümörlerdir (%70) ve sayısal (anöplöidiler) veya yapısal kromozomal anormalliklerin toplamını temsil eder, kolonik mukozada karyotipik değişikliklere neden olur. Tümör baskılayıcı lokuslarda tekrarlayan heterozigotluk kaybı ve kromozomal yeniden organizasyonlarla karakterizedir. Bu genetik değişiklikler, tümör baskılayıcı genler ve iyi bilinen onkogenler APC, KRAS ve TP53 gibi DNA homeostazisinin kontrolünde önemli rollere sahip birçok genin mutasyona uğramasından kaynaklanmaktadır (28).

2.4.2. Mikrosatellit İnstabilite (MSI): Mikrosatellitler hem kodlayan hem de kodlamayan bölgelerde insan genomu boyunca dağıtılan birden tetraya kadar baz çiftinden oluşan kısa tandem tekrarlı DNA dizileridir. Tekrarlanan yapıları nedeniyle mikrosatellitler, kopyalama hatalarına özellikle yatkındır bu nedenle uyumsuz baz dizilerinin tanımlanıp onarılması açısından Uyumsuzluk Onarımı (MMR) sistemi tarafından yüksek düzeyde korunmuştur (29).

Uyumsuzluk onarımı (MMR) sistemi, genomik bütünlüğün en önemli koruyucularından biridir. DNA replikasyonunun aslına uygunluğunu artırır, meşru olmayan rekombinasyonu iptal eder ve DNA metabolizmasının diğer birçok işleminin etkiler (30). MMR sistemindeki proteinler arasında MLH1,

PMS2, MSH2, MSH6, MLH3, MSH3, PMS1 ve Exo1 bulunur. Bu proteinler, DNA hasarını onaran heterodimerler oluşturur. Yeterli MMR (pMMR) ile normal DNA replikasyonu sırasında, küçük DNA uyumsuzluğu hataları başlangıçta MSH2/MSH6 ve MSH2/MSH3 heterodimerleri tarafından tespit edilir ve bağlanır. MLH1/PMS2 heterodimerleri daha sonra yeni, düzeltilmiş bir ipliğin eksizyonu ve yeniden sentezi için görevlendirilir. Bununla birlikte, yetersiz MMR (dMMR), DNA polimeraz kaymasına bağlı olarak mikrosatellit dizilerinin yaygın uzunluktaki polimorfizmleri ile karakterize edilen, mikrosatellit instabilitesi (MSI) olarak bilinen güçlü bir mutator fenotipiyle sonuçlanır (29).

MSI, kolorektal kanserin (KRK) başlıca karsinogenetik yollarından biri olarak kabul edilmektedir. Lynch sendromu (LS) olarak da bilinen kalıtsal polipozis dışı kolorektal kanserin (HNPCC) moleküler bir özelliğini temsil eder ve genellikle bir kolorektal hücrede germ hattı mutasyonu ile bağlantılıdır. MMR genlerinin; ayrıca sporadik kolorektal kanserlerin %15'inde, daha sıklıkla MLH1'in epigenetik inaktivasyonuna bağlı olarak tespit edilir.

MSI tümörleri kolonun sağ tarafında görünme eğilimindedir, genellikle yüksek histolojik derecelere sahiptir, müsinöz bir fenotipe sahiptir ve CIN kaynaklı kanserlerle karşılaştırıldığında sıklıkla daha erken evrelerde teşhis edilir(28).

2.4.3.CpG Adası Metilatör Fenotipi (CIMP): CpG adacıklarının anormal DNA metilasyonu, insan kolorektal tümörlerinde yaygın olarak gözlemlenmiştir ve promotör alanlarda meydana geldiğinde gen susturulması ile ilişkilidir. Metilasyon, CpG dinükleotidleri içinde meydana gelen sitozinlere bir metil grubunun (CH₃) kovalent olarak eklenmesidir. CpG açısından zengin bölgeler (CpG adaları), hemen hemen tüm temel genlerin destekleyici düzenleyici bölgelerinin yanı sıra dokuya özgü promotör genlerin de yaklaşık yarısında bulunur. Tümör baskılayıcı gen promotörlerinin CpG adalarındaki yüksek yoğunluktaki metillenmiş sitozin, transkripsiyonun tamamen bloke edilmesine yol açabilir ve birçok kanser türü, tümör baskılayıcı genleri etkisiz hale getirmek için bu mekanizmayı kullanır (31).

CIMP tümörleri CpG adacıklarının yaygın hipermetilasyonundan kaynaklanır ve %40'a kadar kolonun proksimal segmentinde yerleşir. Bunlar,

CIMP-yüksek (BRAF mutasyonları ve MLH1 metilasyonu barındıran) ve CIMP-düşük (KRAS mutasyonları olan) olarak bölünebilir. CIMP yüksek tümörlerdeki kötü prognoz sebebi BRAF mutasyonlarına atfedilebilir (28).

2.5.KRK Karsinogenezinde Rol Oynayan Genlerden KRAS

Kromozom 12 üzerinde yer alan bir sıçan sarkom virüsü onkogeni olan KRAS, insan tümörleriyle ilişkili RAS gen ailesinin bir üyesidir (32). KRAS, birçok hücre dışı uyarana hücrel tepkinin düzenlenmesinde rol oynayan, 21 kilo dalton (kD)luk küçük bir guanozin trifosfat/guanozin difosfat bağlayıcı proteini kodlayan bir proto-onkogendir (4). KRK'de en sık mutasyona uğrayan onkogenlerden biridir. KRK hastalarının yaklaşık %40'ı KRAS'ta yanlış aktive edici mutasyonlara sahiptir ve bu mutasyonların çoğunluğu 12, 13 ve 61 kodonlarında meydana gelir (33).

En yaygın KRAS nokta mutasyonu 12. pozisyondaki (G12) glisindedir, bunu 13. pozisyondaki (G13) glisin ve 61. pozisyondaki (Q61) glutamin takip eder. G12 kodonu, G12A, G12D, G12F, G12K, G12N, G12S, G12V, G12Y, G12C, G12E, G12I, G12L, G12R, G12T ve G12W dahil olmak üzere 15 farklı nokta mutasyonuna sahiptir. Yaklaşık %41 ile G12D mutasyonu tüm G12 mutasyonlarının en yaygın görülenidir, G12V yaklaşık %28'ini ve G12C ise yaklaşık %14'ünü oluşturur (32).

KRAS mutasyonları düzensiz hücre büyümesine katkıda bulunur ve sonuçta tümör hücresinin büyüüp genişlemesine yol açar. KRAS mutasyonları, kanser hücrelerinin, normal hücrelerin büyümesi için gerekenden daha düşük glikoz konsantrasyonlarında büyümesine olanak sağlar (34). Klinik kanıtlar, KRAS mutasyonlarının kötü prognoz, anti-EGFR antikor tedavisine direnç ve karaciğer metastazı ile ilişkisini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, tümör agresifliğini ve kolorektal karaciğer metastazını teşvik eden mekanizma henüz tanımlanmamıştır ve bu da etkili bir terapötik stratejinin geliştirilmesinin önünde bir engeldir (35). Halen metastatik olmayan KRK'larda prognozu veya adjuvan tedaviyi yönlendirmek için kullanılmamaktadır (34).

2.6.KRK Karaciğer Metastazı

KRK hastalarının yaklaşık %70-80'inde nüks ve/veya metastaz gelişir ve metastatik bölgelerin %50'sinden fazlası karaciğerdedir. Kolorektal kanser karaciğer metastazı (KRKM), KRK'ya bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Bu nedenle, ana araştırma odaklarından biri KRKM mekanizmalarının aydınlatılması ve KRKM'nın hem tahmini hem de yönetimi için potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesidir (36).

İntravazasyon olarak adlandırılan kanser hücrelerinin kan damarlarını istila ederek dolaşım sistemine yayılması süreci, KRK metastazının önemli bir parçasıdır. Daha sonra kan damarlarından dışarı çıkarak hedef organlara saldırarak yerleşirler. Kolon ve rektumu karaciğere bağlayan portal damar sisteminden dolayı KRK'da dolaşımdaki tümör hücreleri ağırlıklı olarak karaciğere yerleşir, ancak nispeten nadir olarak kemik veya beyine yerleşir. Bu süreçte miRNA'ların tümör gelişimi, anijiyogenez, tümör invazyonu ve metastazı süreçlerinde düzenleyici görevler üstlendiği saptanmıştır (15). Primer kolorektal tümör ile eşleştirilmiş karaciğer metastazını karşılaştıran Cellura ve ark. miR-19'un TG2 ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini ve ardından KRK hücrelerinin istilacı yeteneğini değiştirdiğini buldu (37).

2.7.Mikro- RNA'lara Genel Bakış

Ekspresyonunun küçük kodlayıcı olmayan RNA'ların (sncRNA'ların) gen ekspresyonunun düzenlenmesinde etkili olduğu ve tümör oluşumu ve gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu sncRNA'ların, en kapsamlı ve üzerinde en çok araştırma yapılanı, miRNA'lardır (36). miRNA'lar, hücre farklılaşması, gelişim, hücre döngüsü düzenlemesi ve apoptoz gibi önemli fonksiyonlara sahip olan, yaklaşık 21-24 nükleotid uzunluğunda küçük, kodlama yapmayan RNA'lardır. Tümör oluşumunda, bazı onkogenleri ve tümör baskılayıcı genleri düzenleyerek rol oynarlar (38). İnsan genomunda yaklaşık 1900 miRNA kodlayan gen mevcuttur (28).

2007 yılında Ma ve ark. (39) ilk olarak miR-10'un meme kanserinde hücre istilasını ve metastazı düzenlediğini bildirdi; daha sonra giderek daha fazla çalışma, bir grup miRNA'nın tümör metastazına dahil olduğunu anti- veya pro metastatik etkilere sahip olduklarını gösterdi ve "metastamiR'ler"(metastazla ilişkili miRNA'lar) olarak adlandırıldı. MetastamiR'ler, apoptoz, epitelyal-mezenkimal geçiş, kaçış, göç, istila, proliferasyon ve anjiyogenez gibi kanserin metastatik kademesini geniş ölçüde etkiler. 250 kadar miRNA, KRK'da ekspresyon ve/veya fonksiyonda değişiklikler göstermektedir (15,39).

miRNA'ların düzensizliği, KRK'nın başlatılması, ilerlemesi ve gelişiminin her aşamasında görülebilir. Let-7, miR-18a ve miR-30 ileri evre KRK'da bulunabilirken, miR-193a daha sıklıkla erken evre KRK ile ilişkilidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda dokudaki miRNA'ların serum, kan ve plazmadaki miRNA'ların ekspresyonuyla uyumlu olduğu rapor edilmiştir. miR-193a-3p, miR-23a ve miR-338-5p'nin doku ve kan örneklerinde mevcut olduğu bulundu. Bu nedenle, miRNA'lar potansiyel bir moleküler sınıflandırıcı, erken tespit biyobelirteçleri ve KRK'nın gelecekteki tedavisi ve tanısı için terapötik hedefler olabilir (11).

Let-7 ailesi; Lethal-7 keşfedilen en eski miRNA'lardan biridir. Let-7, KRK'da KRAS ifadesi ile negatif olarak düzenlenir. Let-7'nin aşırı ifadesi, KRAS'ı ve RAD51, CDC25 gibi DNA hasar onarım genlerini azaltır. Şu anda let-7 ailesinde dokuz farklı lokasyonda yer alan bilinen on üç üye bulunmaktadır. Let-7 ailesi üyelerinin tümü oldukça benzer bir diziyeye sahiptir ve RNA kaynaklı susturma kompleksi hedef tanıma için önemli bir bileşen olan bir nükleotid motifi bölgesini (GAGGUAG) paylaşır (11).

miR-143: Meme kanseri hücre hatlarında northern blot tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarda aşağı regüle olduğu bulunmuştur. KRK hastalarının dokularında da ekspresyon seviyesinin azaldığı gözlenerek, tümör baskılayıcı miRNA olarak görev yaptığı ve aşağı regüle olduğu bildirilmiştir. Ayrıca insan, fare ve sıçan beyin tümör örneklerinde ve hücre hatlarında yukarı regüle olmaktadır. Prostat kanseri ilerlemesi sırasında miR-143 ekspresyonunun açıkça aşağı regüle edildiği görülmektedir (40).

miR-193: Son zamanlarda birçok çalışma, miR-193a-3p, miR-193a-5p, miR-193b-3p ve miR-193b-5p'den oluşan miR-193 ailesinin, esas olarak tümör baskılayıcı olarak katkıda bulunan özel hedefleme ve sinyalleme ile etkileşim yoluyla sağlık ve hastalık biyolojik süreçlerinde önemli rol oynadığını göstermiştir (41).

miR-16: MiRNA'ların insan kanserlerinde rol oynadığının doğrudan ilk kanıtı, miR-16 içeren miRNA kümesinin, kronik lenfositik lösemi vakalarının önemli bir bölümünde ekspresyon kaybı olduğunun gösterilmesidir. MiR-16 ekspresyonu, osteoklast farklılaşması ve kemik metastazında yükseldiği için potansiyel bir terapötik hedef ve kemik metastazının biyobelirteçi olabilir ayrıca aşağı regüle edilmektedir (42). KKK'da aşağı regülasyonu ile proliferasyonu engelleyebileceği ve p53 sinyal yolunu düzenleyerek KKK hücrelerinin apoptozunu indükleyebileceği bildirilmiştir.

miR-543: Prostat kanserinde aşağı regülasyonu metastazı ve hücre proliferasyonunu baskılayarak, kök hücre özelliklerini desteklediği görülmüştür (43). Ayrıca meme kanseri hücrelerinde aşağı regüle olarak ERK/MAPK sinyal yolu aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur (44). KKK dokularında yapısal olarak yukarı regüle edildiği ve aşırı ekspresyonunda tümör hücresi ve istilasını desteklediği görülmüştür (45).

miR-200c: Akciğer kanserinde aşağı regüle edilip hücre migrasyonunu engellemektedir (46). Meme kanserinde de yukarı regülasyon göstererek; migrasyon ve invazyonu engellediği görülmüştür (47). Ayrıca miR-200c'nin onkogenik olabileceğini ve KKK ilerlemesinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (48).

miR-622: Meme karsinomunun yeni bir biyobelirteçi olup, meme kanseri hücrelerinin hareketliliğini bozmaktadır ve aşağı regüledir (49). Ayrıca prostat kanserinde hücre apoptozunu indüklemeye ve metastazı inhibe etmekte bir tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir ve aşağı regüle olmaktadır (50). KKK tümör dokularında ve hücre dizilerinde ise aşağı regüle edildiği görülmektedir. Bir çalışma da ise miR-622 ekspresyonunun papiller tiroid kanseri dokularında ve hücre dizilerinde aşağı regüle edildiği ve düşüşün TNM evresi ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (51).

miR-30b: Çoklu kemik metastazı ile ilişkili genleri doğrudan hedefleyerek meme kanseri invazyonunu, ve kemik yıkımını engeller (52). Pankreas kanseri kök hücrelerinin migrasyon ve invazyonu üzerinde düzenleyici bir etkisi vardır ve aşağı regüle edilir (53). KRK dokularında önemli ölçüde aşağı regüle edildiği görülmüştür. Düşük bir miR-30b ekspresyon seviyesinin, zayıf farklılaşma, ileri TNM aşaması ve KRK'nın kötü prognozu ile yakından ilişkili içinde olduğu bildirilmiştir (54).

miR-29b: Prostat kanserinde aşağı regüle edilir ve prostat büyümesini engeller (55). Meme kanserinde tümörigenez, metastaz ve immün mikroçevresinin yeniden şekillenmesine katkıda bulunur ve yukarı düzenlenmektedir (56). Ayrıca KRK'da aşağı regüle olduğu bildirilmiştir (57).

miR-96: Epitelyal-mezenkimal geçişli meme kanserinde hücre büyümesi ve migrasyonunu düzenleyerek aşağı regüle olduğu gösterilmiştir .Prostat kanserinde androjen sinyalini ve kanser ilerlemesini yönetir ve aşağı regüledir (58). KRK dokularında bu miRNA'nın ekspresyonunun yukarı regüle olduğu görülmüştür. MiR-96-5p'nin KRAS mRNA'yı hedeflediği ve bu nedenle KRK hücrelerinde RAS sinyal yolunu etkilediği gösterildiğinden, KRAS'ın miR-96-5p tarafından düzenlenmesi, tümör ilerlemesine ve EGFR hedefleme ajanlarına karşı dirençte katkıda bulunabilmektedir (59).

miR-384: Gırtlak kanserinde aşağı regüle edilerek hücre çoğalmasını ve apoptozu düzenler. Küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücrelerinin apoptozunu ve otofajisini indükler (60). KRK dokularında aşağı regüle olduğu ve KRK ilerlemesini baskılayabileceği gösterilmiştir (61).

2.8.KRK Tanı Ve Ayırıcı Tanısı

Başlangıçta asemptomatik olup geç belirti veren bir hastalıktır. Semptom ve bulgular ilk dışkıda kan görme ve anemi ile başlar, daha sonra bağırsak hareketlerinde değişiklik (ishal, kabızlık, dışkı özelliklerinde değişiklik) olarak ilerler. Nonspesifik karın ağrısı, mide bulantısı, tenesmus gibi şikayetler ve kilo kaybı eklenebilir. Daha ileri evrelerde ileus ile acile başvuran hasta sayısı tanı yöntemlerinin etkin kullanımıyla azalsa da halen ciddi bir düşüş söz konusu değildir (62).

KRK ile ilişkili belirti ve semptomlar spesifik olmadığı için özellikle karın ağrısı ve rektal kanama ile başvuran hastalarda diğer malignitelerin yanı sıra ayırıcı tanı pek çok hastalığı içerir, hemoroit, divertikülit, enfeksiyon veya inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi benign hastalıklar da benzer belirti veya semptomlara neden olur (63).

Kolorektal kanserin tanısı endoskopi sırasında alınan biyopsi örneklerinden histolojik olarak konur (2). İlerlemiş lezyonların kolonoskopik tanımlanması nispeten basittir, ancak erken kolorektal kanserler çok ince mukozal benign lezyonlar olarak görülebilir, bu lezyonların tespitini sağlamak için dikkatli ve eksiksiz mukozal inceleme ve optimal bağırsak hazırlığı gerekir. Ayrıca endoskopistin deneyimi de başarıyı etkiler (18). Asemptomatik hastalar arasında, deneyimli operatörlerin elindeki KRK'lar için kolonoskopinin tanıyı gözden kaçırma oranı yüzde 2 ila 6 arasında değişmektedir ve gözden kaçan kanserler en sık kolonun sağ tarafındadır. Semptomatik hastalar arasında pubmed üzerinden 9223 hastayı kapsayan bir meta-analiz çalışmasında kolonoskopinin KRK'yı saptanmadaki duyarlılığı yüzde 94,7 atlama oranı yüzde 5,3 bulunmuştur (64). BT kolonografi, poliplerin ve kolorektal kanserin (örneğin eksik veya yetersiz kolonoskopi sonrası) tanısında tamamlayıcı bir görüntüleme yöntemi olarak kullanılır. Ancak görüntüleme yöntemleri çoğunlukla doğru lokalizasyon ve uzak metastaz için kullanılır. Rektum kanserinde lokorejyonel evreleme rutin olarak MRI ile yapılır ve ileri tedavi kararında yol gösterir (18).

2.9.KRK Evreleme

KRK tanısını takiben öncelikle klinik ve patolojik evreleme yapmak, hastalığın lokal ve uzak yayılımını belirlemek takibinde prognoz tahmini ve tedavi seçimi için gereklidir. Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği (UICC) ve Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) TNM evreleme sistemini altın standart kabul eder (34).

TNM sistem sınıflandırması, prognozun belirlenmesi ve adjuvan tedavi seçimi için en sık kullanılan sistemdir. Erken (evre I) ve geç (evre IV) hastalığı

olan hastalar için güçlü prognoz tahmini sağlarken evre II ve III hastalığı olan hastalarda prognoz ve sonuçlarda heterojenite mevcuttur (34).

TNM evrelemesi en son 2017 de revize edilmiş ve güncel olarak; peritoneal karsinomatozis kötü bir prognostik faktör olarak M1c şeklinde evrelemeye eklenmiştir (63). N kategorisi de değişmemiştir ancak lenf nodlarında 20 veya daha fazla hücreden oluşan kümeler veya > 0,2 mm ve <2 mm çapındaki mikrometastazlar barındıran lenf düğümleri pozitif kabul edilmiştir (65) (Tablo-2).

Tablo-2: Kolon Rektum Tümörleri Patolojik Evreleme Sistemi (66).

	Açıklaması
Primer Tümör(T)	
TX	Primer tümör değerlendirilemedi
T0	Primer tümör izlenmedi
Tis	Karsinoma insitu (intramukozal karsinom; lamina propria veya tam kat geçmeksizin muskularis mukoza invazyonu)
T1	Submukoza invazyonu yapmış tümör
T2	Muskularis propria ivazyonu yapmış tümör
T3	Tümör muskularis propriayı geçerek perikolorektal yağlı doku invazyonu yapıyor.
T4	Tümör visseral periton veya komşu organ veya yapılara yapışık ya da invaze ediyor
T4a	Tümör visseral periton invazyonu yapıyor(tümör makroskopik perforasyon yapıyor veinflamasyonla birliktedirekt tümör invazyonu)
T4b	Tümör direkt olarak komşu organ veya yapılara yapışık veya invaze ediyor.
Bölgesel Lenf Nodları(N)	
NX	Değerlendirilemedi
N0	Lenf nodu metastazı yok

N1	1-3 bölgesel lenf nodunda metastaz var(lenf nodu içindeki tümör0.2 mm) veya tüm lenf nodlarının negatifliği halindehangi sayıda tümör depoziti varlığı
N1a	1 bölgesel lenf nodu pozitif
N1b	2-3 lenf nodu pozitif
N1c	Pozitif lenf nodu yok, ancak aşağıdaki alanlarda tümör depoziti var • Subseroza • Mezenter • Veya peritonla kaplı olmayanperikolik veya perirektal/mezorektal dokular
N2	≥4 bölgesel lenf nodunda metastaz var
N2a	4-6 lenf nodu pozitif
N2b	7 ve üzeri lenf nodu pozitif
Uzak Metastaz (M)	
M0	Görüntüleme yöntemleri ile uzak metastaz yok; örn. Uzak bölge ve organlarda metastaz bulgusu yok (bu kategori patoloğlar tarafından verilmemelidir)
M1	Bir veya daha fazla bölge veya organda veya peritonda metastaz varlığı
M1a	Peritoneal metastaz olmaksızın bir bölge veya organda metastaz
M1b	Peritoneal metastaz olmaksızın iki veya daha fazla bölge veya organda metastaz
M1c	Tek başına veya uzak organ metastazı ile periton metastazı

EVRELEME	SİSTEMİ
----------	---------

Evre 0	Tis N0 M0
Evre I	T1 N0 M0 T2 N0 M0
Evre IIA	T3 N0 M0
Evre IIB	T4a N0 M0
Evre IIC	T4b N0 M0
Evre IIIA	T1-T2 N1 M0 T1 N2a M0
Evre IIIB	T3-T4a N1 M0 T2-T3 N2a M0 T1-T2 N2b M0
Evre IIIC	T4a N2a M0 T3-T4a N2b M0 T4b N1-N2 M0
Evre IVA	Herhangi T Herhangi N M1a
Evre IVB	Herhangi T Herhangi N M1b

2.10. Metastatik KRK da Tedavi

Kolon ve rektum kanserinin tedavisi ancak tümörün tamamen çıkarılmasıyla mümkündür ve bu nedenle tedavinin temelini cerrahi oluşturur. Cerrahinin amacı, temiz cerrahi sınırlarla, tam veya küratif rezeksiyon ile tümörün ortadan kaldırılmasıdır (67). Ancak sadece çok erken evredeki hastalarda tek başına cerrahi yeterli olabilmektedir. Lokal ileri evre rektum kanserlerinde uygulanan neoadjuvan radyoterapi lokal yinelemeyi anlamlı olarak azaltmaktadır. Radyoterapiye, kemoterapi eklenmesi ile patolojik tam yanıt ve lokal kontrol oranları artmaktadır (68).

Sitotoksik kemoterapi, metastatik KRK (mKRK) için standart tedavi stratejisi olmaya devam etmektedir. Kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviyle

ilgili olarak, birkaç birinci basamak terapötik seçenek vardır ve KRK'daki gen mutasyon durumunu ve direnç mekanizmalarını anlamak, en iyi tedavi seçeneğini seçmek için çok önemlidir, bazı nadir durumlarda neoadjuvan tedavi, tümörün evrelemesini kolaylaştırabilir ve böylece rezeksiyon fırsatını artırabilir (69).

MKRK için kemoterapinin hedefleri klinik senaryoya göre farklılık göstermekle birlikte çoğu hasta için tedavi küratif değil palyatif olmaktadır, tedavide temel hedef genel sağ kalımı uzatmak ve yaşam kalitesini mümkün olduğunca uzun süre korumaktır (1,68).

2.10.1. Neoadjuvan Tedavi

Kolon kanseri için kabul edilmiş bir neoadjuvan tedavi yoktur. Bununla birlikte, rektum kanseri için, orta ve ileri evre kanserlerde neoadjuvan radyoterapi veya kemoradyoterapi önerilmektedir; örneğin, çok düşük kanallı anterior yerleşimli cT2 lezyonlar, çoğu T3 lezyon, sınırlı peritoneal tutulumu olan bazı T4a lezyonlar, N+ lezyonlar, cT3, lokal nüks oranını azaltmak için mezorektal fasyayı istila eden lezyonlar ve pozitif lateral düğümlere sahip cT4a ve cT4b lezyonlarda düşünülebilir. Neoadjuvan tedavi, kısa süreli radyoterapi ve ardından cerrahi olarak veya 5-florourasil veya kapesitabin (oral floropirimidin) ile kemoradyoterapi olarak verilebilir. Her ne kadar preoperatif (kemo-)radyoterapi, lokal nüksü azaltmada postoperatif tedaviden daha etkili olsa da genel sağkalımı iyileştirmez (70).

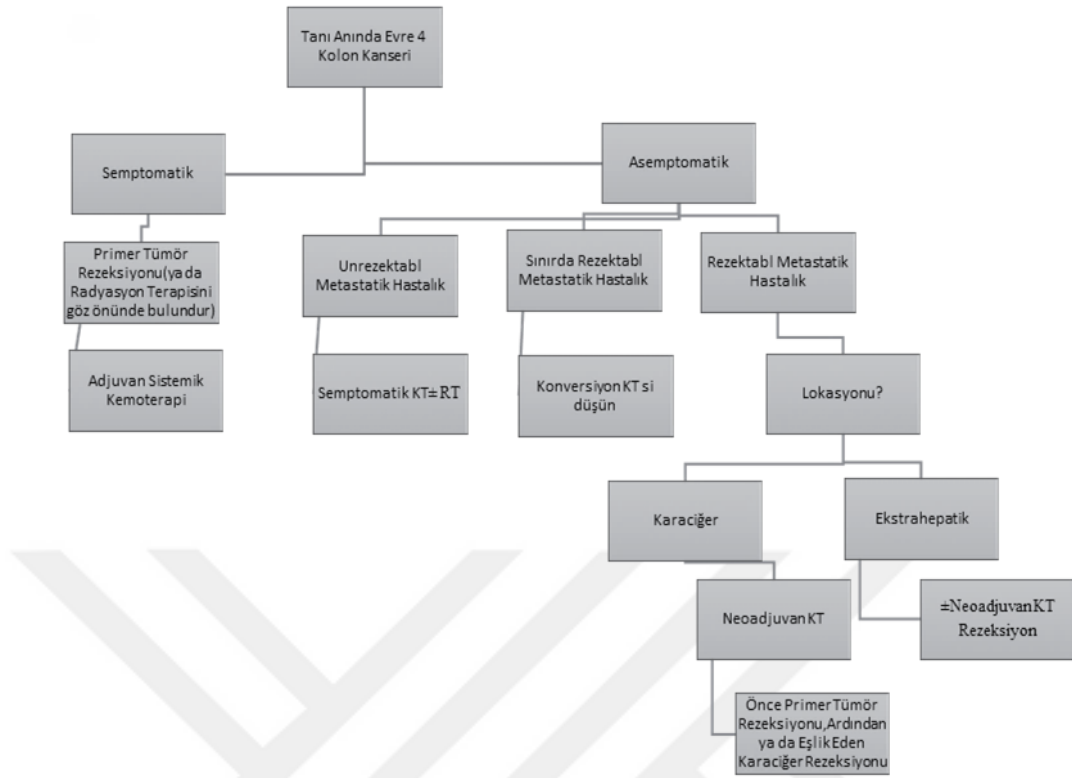
2.10.2. Cerrahi Yaklaşım

Evre IV kolorektal kanserle başvuran hastalarda, kolorektal cerrahın tıbbi onkologla birlikte değerlendirdiği tedavilerin seçimi ve sırası, büyük oranda primer tümörden kaynaklanan semptomlara ve metastazların rezeke edilebilirliğine bağlıdır. Metastatik veya rezeke edilemeyen tümörü olan ancak asemptomatik hastalar, genellikle primer tümörün cerrahi rezeksiyonundan genel sağkalım açısından fayda görmezler. Kanama, perforasyon ve obstrüksiyon olarak tanımlanan semptomatik hastalık, acil müdahale endikasyonlarıdır ve başvuruların %16'sını oluşturur (71). Cerrahi seçenekler arasında primer anastomoz veya uç stoma ile rezeksiyon; rezeksiyonsuz proksimal saptırma veya bypass ya da endoskopik stentleme ve lazer

fulgurasyon gibi diğer yöntemler mevcuttur. Spesifik seçim, hastanın genel tıbbi durumunun yanı sıra mevcut semptomlara göre belirlenir (72).

Kolorektal kanserli hastaların yaklaşık yarısı bir aşamada karaciğer metastazı ile başvurur. Karaciğer rezeksiyonu şu anda literatürde %25 ile %39 arasında değişen oranlarla uzun süreli hayatta kalma şansı sunan tek tedavi şeklidir. Ancak mevcut cerrahi endikasyonlar kullanılarak karaciğere kolorektal metastazı olan tüm hastaların yalnızca %10'unda küratif bir operasyonun yapılabileceği tahmin edilmektedir (72). Senkron, rezeke edilebilir karaciğer metastatik hastalığı olanlarda, cerrahinin zamanlaması, sıralaması ve sistemik tedavi son zamanlarda tartışma konusu olmuştur. Sınırdaki rezeke edilebilir karaciğer metastazları olan (metastazların boyutunda veya sayısında hafif bir azalmanın rezeksiyonu mümkün kılabilen) hastalar için, lezyonların evresini düşürmek için agresif kemoterapötiklerin kullanıldığı konversiyon kemoterapisi ile bir miktar başarı elde edilmiştir. Bizmut ve ark. ve Adam ve ark. başlangıçta rezeksiyonu mümkün olmayan, kemoterapiye tümör yanıtının ardından rezeksiyon uygulanan bir grup hastanın %13-16'sının, primer karaciğer rezeksiyonu uygulanan hastalarla karşılaştırılabilir 5 yıllık sağkalım gösterdiğini bildirmiştir (73).

Rezeke edilebilir karaciğer metastatik hastalığı için mevcut cerrahi seçenekler üç ana stratejiyi içerir: ilk primer tümör rezeksiyonu, eş zamanlı kolon ve karaciğer rezeksiyonu ve "önce karaciğer" rezeksiyonu. Lykoudis ve ark. bu üç stratejinin sistematik bir incelemesini yapmış ve mevcut verilere dayanarak hiçbir stratejinin diğerlerinden daha aşağı olmadığı sonucuna varmıştır. Ancak bu sonuç, herhangi bir randomize veri içermeyen mevcut literatürle sınırlıdır (74).



Şekil-3: Metastatik kolorektal kansere cerrahi yaklaşımı (72)

2.10.3. Kemoterapi

5-Florourasil: Başarıyla kullanılan ilk kemoterapötik ajan, folinik asit (FA) ile kombinasyon halinde intravenöz floropirimidin 5 Florourasil(5FU) idi. 5FU, pirimidinlerin sentezinde anahtar bir enzim olan timidilat sentazı inhibe eder, böylece DNA replikasyonu için mevcut olan pirimidinleri azaltır. 5FU/FA'yı palyatif bakımla karşılaştıran bir dizi randomize kontrollü çalışma, kemoterapi ile yaşam kalitesinde ve ortalama sağkalımda 6 aydan 1 yıla kadar iyileşme olduğunu göstermiştir. 5FU/FA tedavisinin yan etkileri genellikle iyi tolere edilir ve yorgunluk, bulantı, ishal ve mukozit içerir (75).

Kapesitabin: Oral floropirimidinlerden olan kapesitabin 5FU'nun floropirimidin karbamat öncüsüdür. Bir dizi enzimatik adımla 5FU'ya katalize edilir. 5FU'ya son dönüşümde rol oynayan enzim, timidin fosforilaz, tümör hücrelerinde normal hücrelere göre daha yüksek seviyelerde bulunur, böylece tümör hücrelerine daha yüksek dozlarda ulaşır ve 5FU'ya sistemik maruziyet azalır. Kapesitabin ile intravenöz 5FU'yu karşılaştıran iki büyük randomize klinik

çalışmanın her ikisi de kapesitabin ile bolus 5FU'ya göre tedaviye daha yüksek bir yanıt alındığını göstermiştir. Progresyona kadar geçen süre ve genel sağkalım her iki tedavi için de benzerken en önemli fark kapesitabinin, 5FU ile karşılaştırıldığında tolere edilebilirlik açısından klinik olarak anlamlı faydalar göstermesidir. Kapesitabin, 5FU'ya göre önemli ölçüde daha az ishal, febril nötropeni ve stomatit ile sonuçlanır, ancak daha yüksek oranda el-ayak sendromu ve asemptomatik hiperbilirubinemi ile ilişkilidir (75).

İrinotekan: İrinotekan, topoizomerez I inhibitörü olarak görev yapan bir kamptotesin türevidir. Topoizomerezların inhibisyonu, DNA iplikçiklerinin kırılmasına, replikasyonun başarısız olmasına ve ardından hücre ölümüne neden olur. Topoizomerez I enziminin kolorektal kanserde aşırı eksprese edilmesi onu çekici bir ilaç hedefi yapar. İrinotekan in vivo olarak daha aktif bileşik SN38'e metabolize edilir. Bu bileşik safrayla atılır ve enterohepatik dolaşıma girer. Bu ilacın temel doz kısıtlayıcı toksisitesi, muhtemelen kolondaki yüksek SN38 dozuyla ilişkili olan diyaredir. İrinotekanın ilk faz III çalışmaları, 5FU/FA ile birinci basamak tedavi sonrasında nükseden hastalar üzerineydi. Cunningham ve ark. (76) irinotekanı en iyi palyatif bakımla karşılaştırırken, Rougier ve ark. irinotekanı 5FU'nun sürekli infüzyonuyla karşılaştırmıştır. Her iki çalışmada irinotekanın genel sağkalımı, progresyonsuz sağkalımı ve yaşam kalitesini iyileştirdiğini göstermesi üzerine sonraki çalışmalar irinotekan/5FU'yu (FOLFIRI olarak bilinir) birinci basamak tedavi olarak tek başına 5FU ile karşılaştırmıştır, yapılan üç önemli çalışma da kombinasyon koluyla yanıt oranında yaklaşık %20'lik bir iyileşme göstermiştir. İrinotekan alan hastalarda toksisite olarak genellikle yaşam kalitesini bozmayan diyare görülmektedir. Klinik uygulamada, irinotekan içeren kombinasyon kemoterapisi alan hastalar, diyare hakkında bilgilendirilip gerektiğinde kullanmak üzere önleyici tedavi reçetesi düzenlenir (76).

Oksaliplatin: Oksaliplatin, platin atomunun 1,2-diaminosikloheksan ile kompleks oluşturduğu üçüncü nesil bir platin bileşiğidir, platin-DNA çapraz bağları oluşturarak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu inhibe eder ve hücre ölümüne sebep olur. Bu ilaçla yapılan ilk in vitro çalışmalarda, 5FU ile sinerji göstermesi üzerine oksaliplatin ve 5FU'nun kombinasyon halinde

verildiği klinik uygulamaya dönüşmüştür. Oksaliptatin ve 5FU kombinasyonuna FOLFOX adı verilmektedir. FOLFOX'un (oksaliptatin/5FU) tek başına 5FU monoterapisi ile karşılaştırıldığı ilk fazIII çalışma sonuçlarında 5FU monoterapisindeki yanıt oranları %16-22 ile geçmiş verilerle uyumluyken, FOLFOX ikilisi %50 civarında bir yanıt oranına ulaşmış ve progresyonsuz sağkalımın, kombinasyon lehine 6 aydan 8-9 aya uzadığı görülmüştür. FOLFOX kemoterapisi, toksisite olarak tek başına 5FU ile karşılaştırıldığında daha yüksek nötropeni, ishal ve periferik duyuşal nörotoksisite insidansı ile ilişkilidir, ancak genel olarak yaşam kalitesinde belirgin bir azalma ile ilişkilendirilmemiştir. Klinik pratikte doz kısıtlayıcı toksisite, kümülatif olan ve genel olarak ilacın kesilmesiyle geri dönüşümlü olan periferik nörotoksisitedir, bazı nadir durumlarda kalıcı fonksiyon kaybına neden olabilir (77).

2.10.4.Hedefe Yönelik Tedaviler

Oldukça etkili olmalarına rağmen, sistemik kemoterapötik ilaçlar DNA'ya zarar veren maddelerdir ve bu nedenle hızla bölünen tüm hücreleri etkileyerek önemli toksisiteye yol açarlar bu durum kullanım sürelerini sınırlandırır. Ayrıca, KRK hücreleri kaçınılmaz olarak kemoterapi ajanlarına karşı direnç geliştirir ve bu noktada ek tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulur. Sistemik tedaviden farklı olarak hedefe yönelik ajanlar, tümör hücrelerini hücre zarı reseptörleri veya tümör hücrelerine özgü sinyal yolları aracılığıyla tanırlar ve hedefler; dolayısıyla hedefe yönelik ilaçlar sağlıklı dokuların yalnızca küçük bir alt kümesini etkileyerek yan etkileri en aza indirir (78).

Bu hedefe yönelik ilaçlar özellikle üç ana grubu içerir;

1. EGFR'ye karşı monoklonal antikorlar (cetuximab ve panitumumab), VEGF-A'ya karşı monoklonal antikorlar (bevacizumab)
2. Çoklu proanjyogenik büyüme faktörleri (örneğin aflibersept)
3. Küçük molekülleri hedef alan füzyon proteinleri bazlı multikinaz inhibitörleri (örneğin regorafenib (17)).

Setuksimab; epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) inhibe eden, çoklu kinazların aktivasyonunu bloke ederek hücre büyümesinin inhibisyonuna

ve apoptoza yol açan monoklonal bir immünoglobulin G (IgG) antikorudur. Trastuzumab ve rituksimab gibi setuksimab da tümör büyümesini ve ilerlemesini teşvik eden sinyal yollarını inhibe eder ve apoptozu indükler. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan ilk KRK hedefli ajan 2004 yılında Setuksimab olmuş, bunu aynı yıl bevacizumab izlemiştir. Setuksimab, irinotekan tedavisine dirençli mKRK hastalarında hem tek ajan olarak hem de irinotekan ile kombinasyon halinde anlamlı antitümör aktivitesi göstermiştir (79).

Panitumab; setuksimabın yaptığı gibi antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksisiteyi tetiklemeyen ve daha düşük bir aşırı duyarlılık reaksiyonu riski sergileyen tamamen hümanize antikor olarak geliştirilmiştir. Panitumumabın KRK'ya karşı etkinliği, PRIME çalışmasında (80) değerlendirilmiş ve kombinasyon rejimi tek başına FOLFOX'tan daha iyi bir PFS (Progresyonsuz Yaşam Süresi) ve OS (Ortalama Sağkalım) elde etmiştir. Faz III ASPECCT (81) çalışmasında setuksimab ve panitumumab arasında herhangi bir üstünlük tespit edilmemiş ve derece 3 veya 4 hipomagnezemi insidansı dışında hiçbir belirgin yan etki gözlenmemiştir. Bu aynı zamanda antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksitenin bu ajanlar için önemli bir mekanizma olmadığını da göstermiştir (82).

Bevacizumab; VEGF reseptörünü aktive eden ligandlar ailesinin bir üyesi olan vasküler endotelyal büyüme faktörü-A'yı (VEGF-A) hedef alan FDA onaylı, hümanize bir monoklonal antikordur. KRK, randomize çalışmalarda anti-VEGF stratejisinin etkinliğine dair açık kanıtların gösterildiği ilk malignitedir. Birinci basamakta bevacizumablı ve bevacizumabsız kemoterapiyi karşılaştıran çalışmaların derlendiği bir analizde, bevacizumabın eklenmesi ölüm riskinde yüzde 19'luk anlamlı bir azalma ile ilişkilendirilmiştir (83). Bevacizumab aynı zamanda hastalığın ilerlemesinden sonra bile tedaviye devam edildiğinde hastalara hayatta kalma avantajı sağlayan az sayıdaki biridir (17).

Aflibersept; VEGF-A, VEGF-B ve PlGF'yı bloke eden anjiyogenezin benzersiz ve tam inhibisyonuna sahip, önceki anjiyogenik tedaviye karşı direncin biyolojik mekanizmalarını hedef alan rekombinant bir proteindir. Oksaliptatin tedavisine dayalı olarak birinci basamak tedaviye ilerleyen mKRK hastalarında FOLFIRI

ile kombinasyon halinde güçlü kanıtlarla desteklenen bir seçenektir. Afibersept'in klinik faydası, moleküler durum, yaş, potansiyel olarak rezeke edilebilir hastalar veya ilk basamaktan sonra progresyona kadar geçen süreden bağımsız olarak tüm hasta profillerinde gözlemlenmiştir (84).

Regorafenib; standart kemoterapiye dirençli metastatik kolorektal kanser hastalarının tedavisi için onaylanmış çok hedefli bir kinaz inhibitörüdür. Anjiyogenez, metastaz, hücre proliferasyonu ve immünosupresyon ile ilgili geniş bir yelpazedeki aktive edilmiş yolları inhibe eder. Bunun sonucu olarak geniş aralıkta ilaç duyarlılığına neden olur. Bu ajanın ana terapötik etkileri, anti-anjiyogenez ve çeşitli etki mekanizmaları yoluyla tümör mikro ortamının yeniden şekillendirilmesidir. VEGF reseptörlerinin ve TIE2'nin ikili blokajı, hem ilave anti-anjiyogenez etkilerine hem de damar stabilitesinin düşündürücü benzersiz düzenlemesine yol açabilir. Ek olarak VEGF inhibisyonuna giden moleküler kaçış yollarını inhibe ederek VEGF inhibitörlerine dirençli tümörlerde bile sürekli antianjiyojenik etkisini mümkün kılar. Ayrıca regorafenib, makrofaj modülasyonu yoluyla anti-tümör bağışıklığını artırma yönünde önemli bir etkiye sahiptir (85).

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

Çalışmaya, 2012-2023 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi (BUÜ) Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı'na başvuran, KRAS geninde mutasyon saptanmış, kolorektal karaciğer metastazlı 42 hastaya ait parafine gömülü (FFPE) tümör dokusu ve ilgili hastaların 28'inin sağlıklı (normal) dokusu dahil edildi. Çalışmaya alınan hastaların normal ve tümörlü materyallerin temini; Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı alındıktan sonra başlandı (Karar No: 2023-9/5). Değerlendirilen hastalara ait klinik özellikler, tümörlerine yönelik patolojik bilgiler, tanı, tedavi ve takip bilgileri istatistiksel analizlerde kullanılmak üzere toplandı. Planlanan çalışma ile ilgili olarak oluşturulan tıpta uzmanlık tez projesi, Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından TTU-2024-1437 sayılı proje ile desteklendi.

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan Sarf ve Ekipmanlar

- Roche, TriPure Isolation Reagent (İsviçre) 200 ml
- Merck, Isopropanol (Almanya)
- Merck, EtOH (Almanya)
- Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (ABD)
- Qiagen, miRCURY LNA RT Kit (Almanya)
- Qiagen, miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Almanya)
- Qiagen, miRCURY LNA miRNA Custom PCR Panel (Almanya)
- ISOLAB, Filtreli pipet uçları (10,100,1000 µl) pipet ucu filtreli- ISOLAB- şeffaf- 10 µl- kutu- steril 96 adet/kutu, pipet ucu- filtreli-ISOLAB- şeffaf- 100 µl- kutu- steril 96 adet/kutu, pipet ucu- filtreli- ISOLAB- şeffaf- 1000 µl- kutu- steril 96 adet/kutu (Almanya)

- Thermo, 0,2 mL PCR tüpü (ABD) Tubes, 0.2 mL, flat cap
- ISOLAB, 1,5 mL steril mikrosantrifüj tüpü (Almanya)
- MagNA Lyser Green Beads (İsviçre)

3.2.2. Kullanılan Cihazlar

- -86 °C derin dondurucu (New Brunswick Scientific- U535)
- -20 °C derin dondurucu (Arçelik, Türkiye)
- Nanodorop 2000 (Thermo Scientific)
- Allegra X-15R Refrigerated Centrifuge (Beckman Coulter)
- MagNA Lyser (Roche Diagnostics)
- Thermal Block (Biosan TS100-C)
- Vorteks cihazı (Biosan V-1 Plus)
- Santrifüj (Hettich Universal 320R)
- Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied)
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Parafin Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu

FFPE doku örneklerinden RNA izolasyonu, “TriPure Isolation Reagent” ile aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

- Deparafinizasyon için; 1.5 ml ependorf tüplerde yer alan parafin doku örnekleri üzerine 1 ml ksilen eklendi. 50 °C de 3 dakika parafinin erimesi sağlandıktan sonra örnekler 1 dakika 20.000x g de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve ksilen ile yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı. Sonrasında örnekler 2 kez 1 ml etanol ile yıkandı.
- Örneklerin üzerine 40 µl proteinaz K ve 300 µl Lizis Buffer eklenerek mix edildi ve 55 °C de 3 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası tüplere 1 ml tripure eklendi ve homojenize edildi.

Bu aşamada tüpteki doku homojen bir görünüm alarak parçalanır ve tripure isolation reagent etkisiyle pembe bir renk görünümünü alır.

- Homojenize edilen tüpler buza alınıp 2 dakika bekletildi. Ardından 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Homojenizatörde o hızın ve sürenin etkisiyle ısınan tüpleri soğutmak için bu işleme başvurulur.

- Tüplere 200 µl kloroform eklendi ve 5 dakika bekletildi.

Kloroform; homojen hale gelen dokuda faz oluşumunu sağlar. Böylece RNA, DNA ve protein ayrı fazlarda elde edilmiş olur.

- 12.000 rpm' de 4 °C 'de 20 dakika santrifüj yapıldı.

Santrifüj sonunda 3 faz oluşur:

- 1.Faz (Sulu faz): RNA içerir (Renksizdir).
- 2.Faz: DNA içerir (Beyaz renklidir).
- 3.Faz (Organik faz): Protein içerir (Kırmızı renktedir),
- RNA izolasyonu için renksiz olan 1. faz yeni tüpe aktarıldı. Yeni tüpe 500 µl izopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

İzopropanol RNA' yı, DNA ve diğer safsızlıklardan arındırmak için kullanılır.

- 12.000 rpm' de 4°C' de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- Oluşan çökelek üzerine 1 ml %75 EtOH eklendi. 7.500 x g'de 4°C' de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı.
- 57°C' de EtOH uçuruldu. Kalan çökeleğe 50-100 µl RNase free su eklenerek pipetaj yapıldı.
- Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları belirlendi.

3.3.2. RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilmiş olan RNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi.

NOT: İdeal saflıktaki kaliteli RNA'nın A260/ A280 absorbans oranının 1,8-2,0 olması beklenir.

3.3.3. RNA'lardan cDNA Sentezi

cDNA sentezi “**Universal cDNA synthesis kit (Exiqon)**” kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi. Her örnek için 5 ng/ul RNA stokları hazırlandı ve cDNA’ da bu stoklar kullanıldı. 0,2 ml’ lik PCR tüplerine, kit içerisindeki malzemeler aşağıdaki tabloda belirtilen şekilde kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı (Çizelge 1).

Çizelge-1: cDNA sentezi için reaksiyon karışımı

Malzeme	Tek reaksiyon için gerekli hacim
RNA örneği (5ng/ul)	4 µl
Nuclease free water	9 µl
5x Reaction Buffer	4 µl
Spike in RNA	1 µl
Enzim mix	2 µl
Toplam hacim	20 µl

Hazırlanan PCR tüpleri, Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek aşağıdaki hazırlanmış programa uygun şekilde cDNA sentez işlemi gerçekleştirildi (Çizelge 2).

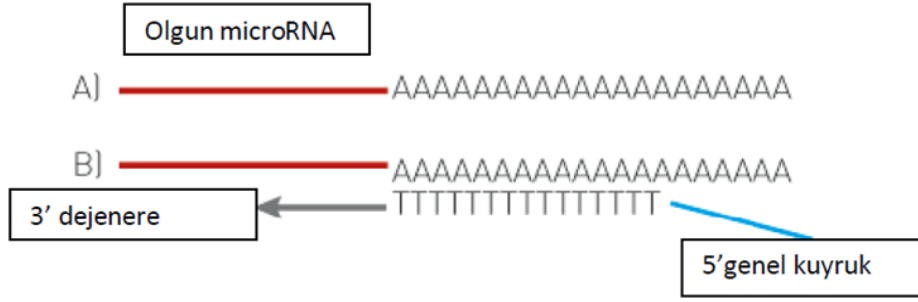
Çizelge-2. cDNA sentezi için PCR koşulları

cDNA sentezi	42 °C	60 dk.	1 döngü
	95 °C	5 dk.	
	4 °C	Bekleme	

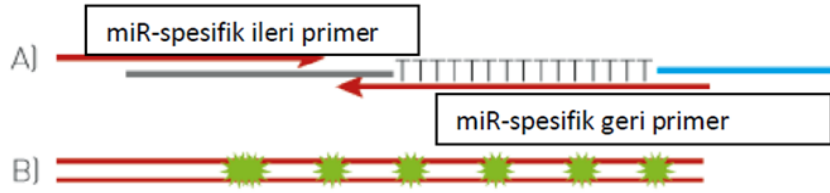
3.3.4. Real-Time PCR (RT-qPCR) ile miRNA Expresyon Analizleri

Çalışmada, miRNA'ya özgül LNA temelli, Exiqon firmasına ait "miRCURY LNATM Universal RT microRNA system" kiti kullanıldı (Şekil 4). Bu kit ile, total RNA'dan tek sarmal cDNA sentezlemek, sentezlenen cDNA'yı kalıp olarak kullanıp, özel LNA primerler ve SYBR green boya eşliğinde seçilen miRNA'ların gerçek zamanlı (Real-time) kantitatif/nicel PCR analizini gerçekleştirilmesi mümkündür. Elde edilen cDNA'lar öncelikle 80x seyreltildi (5 µl cDNA+395 µl su). Housekeeping gen ve cDNA'lar, kontrol primerleri ile gözden geçirildi. Çalışmada housekeeping gen olarak SNORD48 ve U6 kullanıldı. SNORD48 ve U6 primerlerini içeren karışım aşağıdaki şekilde kullanıldı ve yine aşağıda belirtilen protokolle Real-Time qPCR'da yürütüldü. Tüm çalışmalar buz üzerinde ve RNaz'lerden arındırılmış malzeme ile gerçekleştirildi. cDNA'ların Small Nucleolar RNA C/D Box 48 (SNORD48), RNA U6 Small Nuclear (U6) ve kontrol sonuçları Ct değerleri açısından değerlendirildiğinde, Ct değerleri 15-29 arasında olanlar, aşağıda belirtilen miRNA'lar için miRNA LNA™ primer setleri (Exiqon), (miRNA primerler; **miR-16, miR-143, miR-193a-3p, miR-543, miR-200c, miR-622, miR-30b, miR-29b, miR-96-5p, miR-384-3p**) kullanılarak ve aşağıdaki karışım ve cihaz protokolleri ile çalışıldı (Çizelge 3).

Adım 1: Birinci-iplik sentezi (RT)



Adım 2: Real-Time PCR amplifikasyonu



Şekil-4: RT-qPCR analizi şematik gösterimi (miRCURY LNATM Universal RT microRNA system 2017 protokolünden değiştirilerek alınmıştır)

MiRNA primerleri için liyofilize primerleri içeren custom miRCURY LNA miRNA custom PCR panellere (platelere) aşağıda belirtilen oranlarda tek reaksiyon için belirtilen karışımlar eklendi.

Çizelge-3. RT-qPCR için reaksiyon karışımı

Malzeme	Tek reaksiyon için gerekli hacim
cDNA	4 µl
Nuclease free water	1 µl
Enzim ve dNTP miski (PCR Master mix)	5 µl
Toplam hacim	10 µl

- Reaksiyon tüpüne, tek bir reaksiyon için reaktiflerin her birinden eklendi ve reaksiyon sayısı kadar konup, reaksiyon karışımı hazırlandı.

- Karışım spin ettirildi ve plate'lere her bir reaksiyon için 6 µl reaksiyon karışımından transfer edildi.
- 4 µl cDNA örnek veya kontrol her bir kuyucuğa son reaksiyon hacmi 10 µl olacak şekilde ilave edildi. Ha
- Hazırlanan plateler (karışım ilave edildikten sonra) 2000 rpm'de 15 saniye santrifüjlendi. Ardından aşağıda belirtilen cihaz protokolüne uygun olarak LightCycler® 480 II Real Time PCR (Roche, İsviçre) cihazı ile çalışma gerçekleştirildi (Çizelge 4).

Çizelge-4. RT-qPCR koşulları

Program	Denatürasyon	Amplifikasyon		Erime Eğrisi Analizi			Soğutma
Parametre							
Analiz Modu	Yok	Kuantifikasyon modu		Erime eğrisi modu			ok
Döngü Sayısı	1	45		1			
Hedef Sıcaklık [°C]	95	95	60	95	60	95	40
Süre	00:10:00	00:00:10	00:01:00	00:00:10	00:00:10	00:00:00	00:00:30
Sıcaklık Artış Hızı [°C/s]	4,4	4,4	1,6	4,4	1,6	0.,2	4,4
Okuma Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Sürekli	Yok

3.3.5. RT-qPCR Tabanlı miRNA Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçlarda relatif kantitasyon yapılabilmek için $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanıldı. Bu metod ile miRNA C_t değerleri SNORD48 ve U6 housekeeping genleri ile normalize edildi (Bu değer ΔC_t olarak ifade edilir). Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldıktan sonra elde edilen sonuçlar $\Delta\Delta C_t$ 'yi vermektedir. Orijinal Ekspresyon Seviyesi (L) her bir miRNA için aşağıdaki gibi belirtilmiştir.

Orijinal Ekspresyon Seviyesi (L) şu şekildedir;

$$L = 2^{-C_t}$$

Normalizasyon için hedef miRNA' nın housekeeping miRNaya oranlanması gerekmektedir. Bu da;

$$\frac{2^{-C_t(\text{GOI})}}{2^{-C_t(\text{HKG})}} = 2^{-[C_t(\text{GOI}) - C_t(\text{HKG})]} = 2^{-\Delta C_t}$$

şeklinde betimlenir. İki farklı koşuldaki aynı miRNA' nın oranı ise;

$$\frac{2^{-\Delta C_t \text{ örnek}}}{2^{-\Delta C_t \text{ kontrol}}} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{örnek}) - \Delta C_t (\text{kontrol})$$

$$\frac{2^{-\Delta C_t(GOI) \text{ örnek}}}{2^{-\Delta C_t(HKG) \text{ örnek}}} = \frac{2^{-[C_t(GOI) - C_t(HKG)] \text{ örnek}}}{2^{-[C_t(GOI) - C_t(HKG)] \text{ kontrol}}} = \frac{2^{-\Delta C_t \text{ örnek}}}{2^{-\Delta C_t \text{ kontrol}}} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

şeklinde. Buradan çıkan sonuç iki farklı koşulda bulunan miRNA'nın ne kadar değişim gösterdiğidir. Katlık artış değerleri kontrol grubuna göre verilmiştir.

3.3.6. İstatistiksel analiz

Çalışmada, nominal ve ordinal veriler frekans analiziyle, ölçüm ve ekspresyon düzeyleri ise ortalama ve standart sapma değerleri ile tanımlandı. Nominal ve ordinal veriler arasındaki fark analizlerinde Ki-Kare Benzerlik oranı ve Ki-Kare testleri kullanıldı.

Ekspresyon düzeylerinin ve ölçüm parametrelerinin fark analizlerinden önce, normal dağılıma uygunluk için Kolmogorov Smirnov testi yapıldı. Normal dağılıma uyan ekspresyon düzeyi parametrelerinin ikili grup farklarında Bağımsız Örneklem T-Testi ile Tukey testi, normal dağılıma uymayan parametrelerin ikili grup farkları için ise Mann Whitney U testi uygulandı. Ekspresyon düzeylerinin hasta-kontrol kıyaslamalarında, kontrol grubunun referans olması nedeniyle, hedef/referans (Target/Reference) değerleri, hasta gruplarının kendi aralarında ikili kıyaslamalarında ise fold change (değişim, delta CT) değerleri kullanıldı

Bulgular IBM Statistical Package for Social Science (SPSS) 22.0 programı vasıtası ile değerlendirildi. Hastalısız ve genel sağkalım analizleri için Kaplan-Meier yöntemi, çeşitli faktörlerin hastalısız sağkalıma etkisini değerlendirmek için tek yönlü değişken analizi Logrank testi ile yapıldı. Hastalısız sağ kalım üzerine etkili faktörler Cox regresyon analizinde tek

değişkenli analiz ile değerlendirildi. $p < 0,2$ olan faktörler çok değişkenli (multivariate) analize dahil edilerek bağımsız prognostik faktörler incelendi. Gruplar arası karşılaştırma sonuçlarında $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4.BULGULAR

Çalışmada, KRAS mutasyonuna sahip kolorektal karaciğer metastazlı hastalarda miRNA ekspresyon seviyeleri incelendi. Bu kapsamda, 42 hastaya ait parafine gömülmüş (FFPE) tümör dokuları ve 28 sağlıklı doku örneği kullanıldı. Elde edilen dokularda miR-16, miR-143, miR-193a-3p, miR-543, miR-200c, miR-622, miR-30b, miR-29b, miR-96-5p ve miR-384-3p'nin ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar değerlendirildi ve hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel analizler yapıldı.

4.1. Kolorektal Kanser Hastalarının Demografik, Klinik Histopatolojik Özelliklerine İlişkin Bulgular

Hastaların yaş dağılım aralığı 23 yıl ve 90,5 yıl arasında değişkenlik gösterirken tanı yaşı medyan 61'idi. Çalışmaya dahil edilen hastaların %29(n=12)'unun kadın, %71(n=30)'inin erkek olduğu görülmektedir. Hastaların %33,3(n=14)'ünün tümörü sol kolon, %33,3(n=14)'ünün sağ kolon, %33,3(n=14)'ünün de rektum yerleşimli idi. Hastaların %59,5(n=25)'i grade 2, %11,9(n=5)'u grade 3 tümöre sahipti %28,6(n=12)'i ise grade bilgisine erişilemedi. Çalışmaya dahil edilen hastaların %81(n=34)'i adenokarsinom, %19(n=8)'u ise müsinöz histolojiye sahipti. Çalışmaya dahil edilen hastaların %69(n=29)'u tanı anında metastatik, %29,6(n=12)'i non metastatik idi, 1 hastanın metastaz zamanına erişilemedi. Tablo-3'te hastaların demografik ve histopatolojik özelliklerine ilişkin bulgular verilmiştir.

Tablo-3: Çalışmaya dahil edilen hastaların klinikopatolojik özellikleri

		N=42	%
Yaş	Medyan (min-max), yıl	61 (23-90,5)	
Cinsiyet	Kadın	12	29
	Erkek	30	71
Tümör Lokalizasyonu	Sağ Kolon	14	33,3
	Sol Kolon	14	33,3
	Rektum	14	33,3
Grade	II	25	59,5
	III	5	11,9
	Bilinmeyen	12	28,6
Histolojik Tip	Adenokarsinom	34	81
	Müsinöz	8	19
Mutant Kras Kodonu	Kodon 12	15	35,7
	Kodon 12,13	2	4,8
	Kodon 13	4	9,5
	Bilinmeyen	21	50
Tanı Anı Hastalık Durumu	Non-metastatik	12	28,6
	Metastatik	29	69,0
	Bilinmeyen	1	2,4

Çalışmaya dahil edilen hastaların Karaciğer metastazlarına yönelik; %23,8(n=10)'ine metastazektomi, %26,1(n=11)'ine TAKE, %11,9(n=5)'una ise RF işlemi uygulanmıştı. Sistemik tedavi olarak çalışma hastalarının %100(n=42)'ü FOLFOX, %33(n=14)'ü FOLFİRİ, %35,7(n=15)'si Bevacizumab, %26,19(n=11)'u da Regorafenib almıştı. Hastaların tedavi modalitelerine ilişkin veriler Tablo-4'te verilmiştir.

Tablo-4: Çalışmaya dahil edilen hastaların tedavi modaliteleri

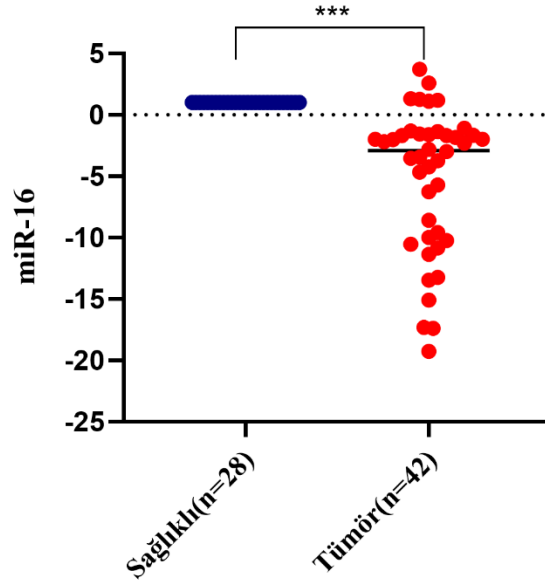
			N=42	%
Kc Yönelik Lokal Tedavi	Metastazektomi	Var	10	23,8
		Yok	32	76,1
	TAKE	Var	11	26,1
		Yok	31	73,8
	RF	Var	5	11,9
		Yok	37	88,09
Sistemik Tedavi	Floropirimidin+ Oxaliplatin	Var	42	100,0
		Yok	0	0
	Floropirimidin+ İrinotekan	Var	14	33,3
		Yok	28	66,6
	Bevacizumab	Var	15	35,7
		Yok	27	64,28
	Regorafenib	Var	11	26,19
		Yok	31	73,80

4.2. Tümörlü ve Komşu Sağlıklı Dokularda miRNA Ekspresyon Düzeylerine İlişkin Bulgular

Elde edilen sonuçlara göre, hasta grubunda miR-16 ($p<0,0001$), miR-143 ($p<0,0001$), miR-200c ($p<0,0001$), miR-543 ($p=0,0116$), miR-622 ($p<0,0001$), miR-30b ($p<0,0001$), miR-29b ($p<0,0001$), miR-96-5p ($p<0,0001$) ve miR-384-3p ($p<0,0001$)'nin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılıkların olduğu belirlendi. Buna karşın, miR-193a-3p ($p=0,0573$) ekspresyon seviyeleri, kontrol grubu ile hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi.

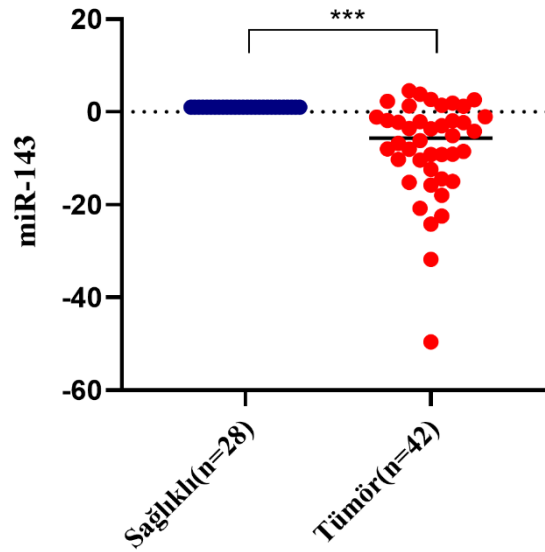
MiR-16 ekspresyon düzeyi hasta grubunda, kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde daha düşük seviyede görüldü. Bu, miR-16'nın hasta grubunda aşağı regüle edildiğini gösterdi ($p<0,0001$). Ekspresyon düzeyindeki bu düşüş, miR-16'nın gen regülasyonundaki potansiyel rolüyle ilgili olabilir. Ayrıca, miR-16 ekspresyon seviyesinin hasta grubunda düşük olması

hastalığın moleküler ve biyolojik mekanizmalarında önemini belirtmektedir (Şekil 5).



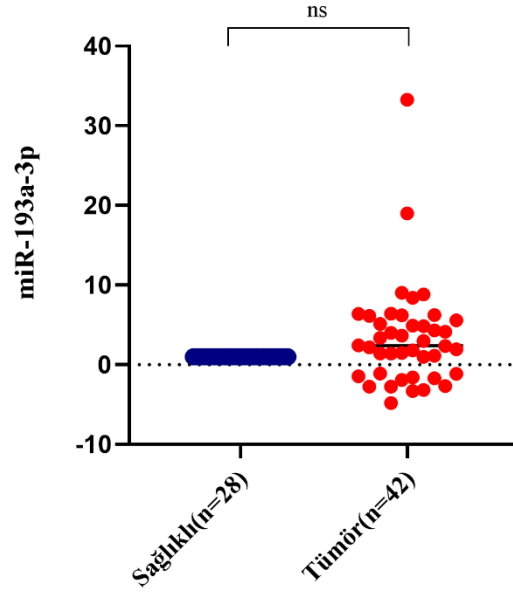
Şekil-5: Hasta ve kontrol grubunun miR-16 ekspresyon dağılımları

Hasta grubunda miR-143 ekspresyonunun kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görüldü ($p < 0,0001$). Bu durum, miR-143'ün hasta grubunda aşağı regüle edildiğini göstermektedir. Bu bulgu, miR-143'ün hasta grubunda ekspresyon düzeyinin baskılandığını belirtmektedir (Şekil 6).



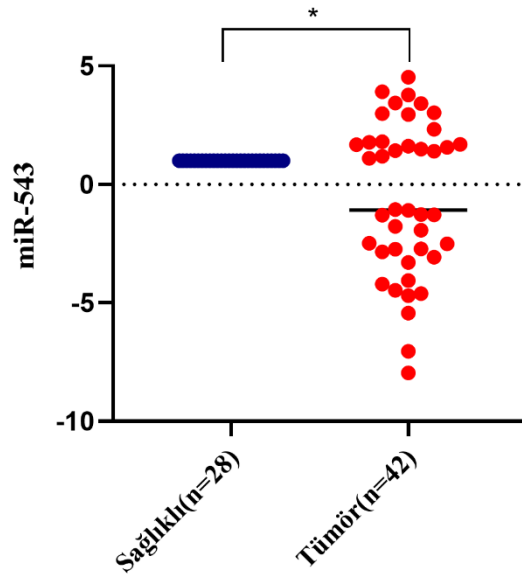
Şekil- 6: Hasta ve kontrol grubunun miR-143 ekspresyon dağılımları

Bir diğ er sonuçta, hasta grubu ile kontrol grubu arasında miR-193a-3p 'nin ekspresyon seviyelerinde dikkate değ er bir fark olmadığı görüldü. Bu da mir-193a-3p'nin hastalık üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını göstermektedir ($p=0,0573$) (Ş ekil 7).



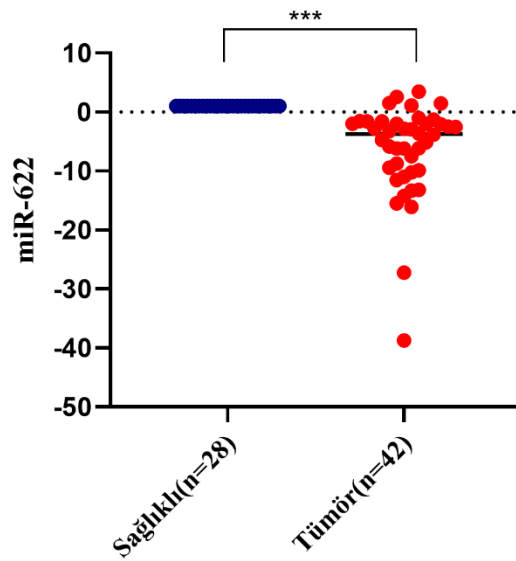
Ş ekil-7: Hasta ve kontrol grubunun miR-193a-3p ekspresyon dağılımları

Hasta grubundaki miR-543 ekspresyon seviyesi, kontrol grubuna kıyasla belirgin bir şekilde daha yüksek görüldü ($p=0,0116$). Bu da, hasta grubunda miR-543'ün aş ırı regü lasyonunun (yüksek ekspresyonunun) olduğunu, hastalığın ilerlemesine ve geliş iminde önemli rol oynadığını göstermektedir (Ş ekil 8).



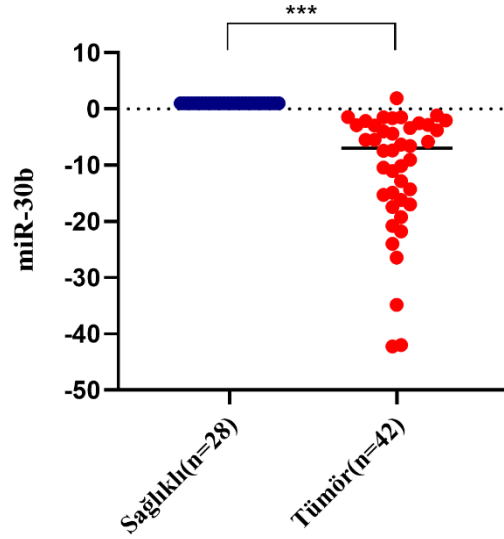
Şekil-8: Hasta ve kontrol grubunun miR-543 ekspresyon dağılımları

Hasta ve kontrol grubu arasındaki $p < 0,0001$ değeri istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi. Bu, hasta grubunda miR-622'nin ekspresyon seviyesinde önemli bir artış olduğunu veya kontrol grubuna göre dikkate değer bir farklılık olduğunu ifade etmektedir. Elde edilen bu sonuç, miR-622'nin hastalık prognozunda rol oynadığını, hastalıkla ilişkili biyolojik mekanizmalarda yer aldığını göstermektedir (Şekil 9).



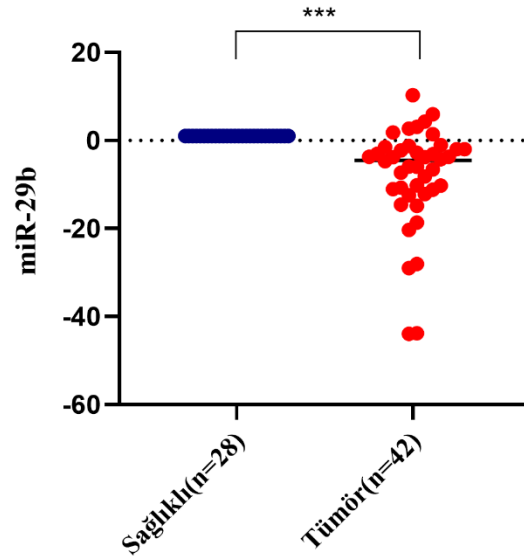
Şekil-9: Hasta ve kontrol grubunun miR-622 ekspresyon dağılımları

MiR-30b'nin ekspresyon seviyesi, hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ($p<0,0001$). Eldeki bu sonuç, miR-30b'nin hasta grubunda daha yüksek seviyede ifade edildiğini ve ekspresyon seviyesindeki bu yükseklik ilgili miRNA'nın potansiyel olarak hastalık süreciyle ilişkili olabileceğini göstermektedir (Şekil 10).



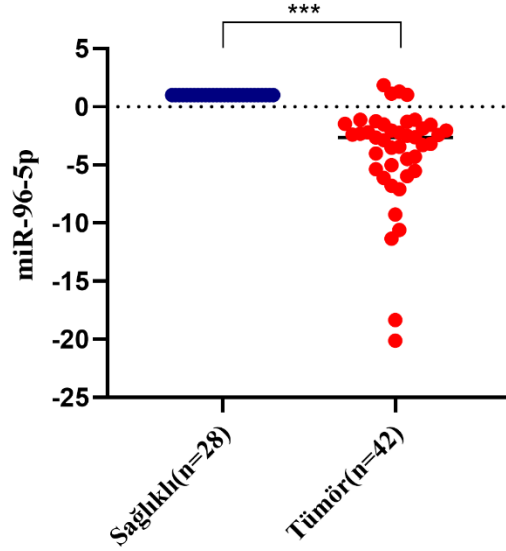
Şekil-10: Hasta ve kontrol grubunun miR-30b ekspresyon dağılımları

MiR-29b'nin ekspresyon düzeylerinin, hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0,0001$), (Şekil 11).



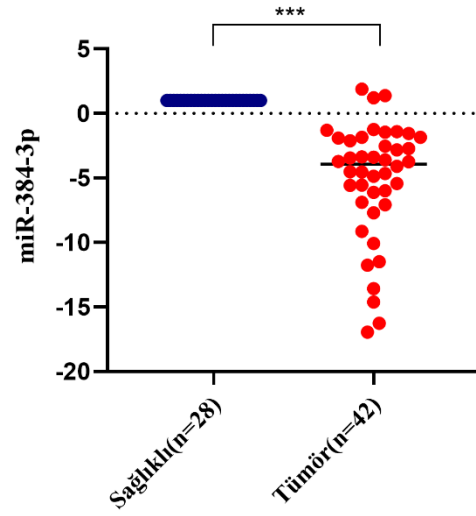
Şekil-11: Hasta ve kontrol grubunun miR-29b ekspresyon dağılımları

MiR-96-5p'nin hasta grubuna kıyasla kontrol örneklerinde daha yüksek düzeyde ifade edildiğini tespit edildi ($p<0,0001$), (Şekil 12).



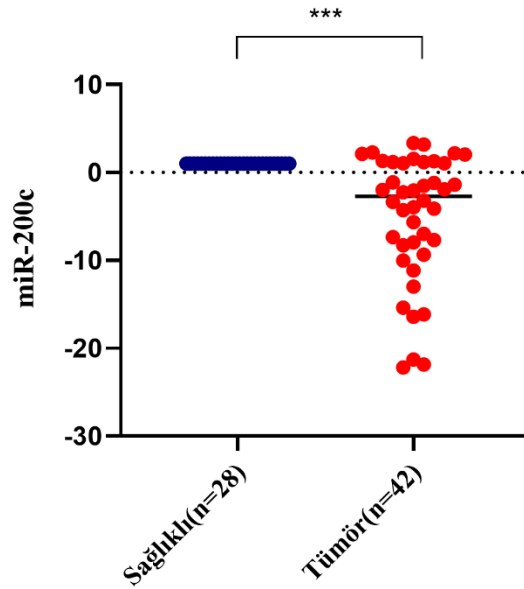
Şekil-12: Hasta ve kontrol grubunun miR-96-5p ekspresyon dağılımları

MiR-384-3p'nin ekspresyon seviyeleri kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı farklılık göstermektedir. Ekspresyon seviyesinin hasta grubunda yüksek olması ($p<0,0001$), ilgili miRNA'nın hastalık sürecine katkıda bulunduğu ya da hastalığın bir göstergesi olabileceği yönünde değerlendirilebilir (Şekil 13).



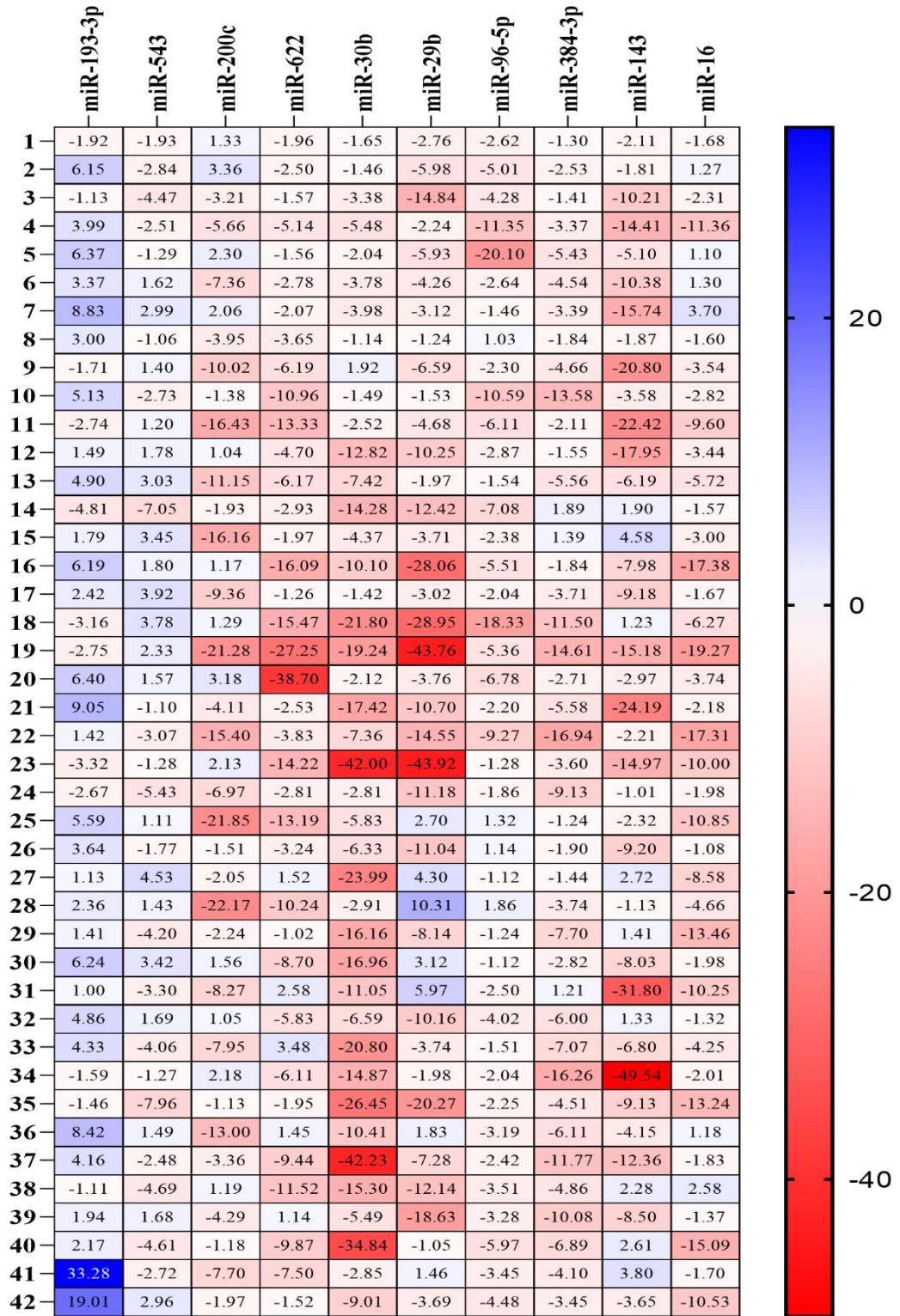
Şekil-13: Hasta ve kontrol grubunun miR-384-3p ekspresyon dağılımları

Hasta grubundaki miR-200c'nin ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 14).



Şekil-14: Hasta ve kontrol grubunun miR-200c ekspresyon dağılımları

Her bir miRNA'nın hasta gruplarındaki ifade seviyeleri ısı haritası ile gösterildi. Belirli miRNA'lar bazı hastalarda aşırı şekilde yukarı regüle edilirken (kırmızı), bazı hastalarda düşük düzeyde ifade edildi (mavi). Kırmızı görülen miRNA'lar hastalığa özgü regülasyon gösterdi. Bu miRNA'ların aşırı derecede yukarı regülasyonu, hastalıkla ilişkili biyolojik süreçlerde yer aldığını vurgulamaktadır. Özellikle miR-622 gibi miRNA'lar, bazı hastalarda önemli derecede yukarı regüle olmuştur (kırmızı). Bu miRNA'lar hastalığın ilerlemesinde veya patogenezinde kritik rol oynar. miR-143, miR-200c, miR-193a-3p gibi miRNA'lar da hastalar arasında bazı farklılıklar gösterdi. Özellikle bu miRNA'ların bazı hasta gruplarında artmış, bazı hasta gruplarında ise düşük düzeyde olduğu görüldü. miR-16, miR-143, miR-622 ve miR-96-5p gibi miRNA'lar hasta grubunda güçlü farklılıklar gösterdi (Şekil 15).



Şekil-15: Hasta bazlı miRNA ifade düzeylerinin ısı haritası

4.3. miR-16, miR-143, miR-193a-3p, miR-543, miR-200c, miR-622, miR-30b, miR-29b, miR-96-5p ve miR-384-3p Gen Ekspresyonları ile Bazı Klinikopatolojik Özellikler Arasındaki İlişkiye Yönelik Bulgular

Çalışmaya dahil edilen hastaların miRNA gen ekspresyonlarının artıp azalma sıklıkları ile cinsiyet, tümör lokalizasyonu ve metastaz durumu arasındaki ilişkiler incelendi. Hastaların miRNA ekspresyon seviyeleri ile cinsiyet arasındaki ilişki incelendiğinde; miR-543 kadınların %75,0'inde, erkeklerin ise %30,0'unda azalmıştı. Kadınların ve erkeklerin miR-543 gen ekspresyon azalma/artma sıklıklarındaki farklılık istatistiksel olarak dikkate değerdi($p=0,057$). Diğer miRNA'ların cinsiyet ve gen ekspresyon artma/azalma sıklıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo-5).

Tablo-5: Hastaların Cinsiyetine Göre miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

		Kadın	Erkek	p değeri
miR-193a	Arttı	4 (%33,3)	8 (%26,7)	0,715
	Azaldı	8 (%66,7)	22 (%73,3)	
miR-543	Arttı	3 (%25)	19 (%63,3)	0,057*
	Azaldı	9 (%75)	11 (%36,7)	
miR-200c	Arttı	8 (%66,7)	21 (%70)	>0,999
	Azaldı	4 (%33,3)	9 (%30)	
miR-622	Arttı	10 (%83,3)	27 (%90)	0,613
	Azaldı	2 (%16,7)	3 (%10)	
miR-30b	Arttı	12 (%100)	29 (%96,7)	>0,999
	Azaldı	0 (%0)	1 (%3,3)	
miR-29b	Arttı	9 (%75)	26 (%86,7)	0,387
	Azaldı	3 (%25)	4 (%13,3)	
miR-96-5p	Arttı	10 (%83,3)	28 (%93,3)	0,565
	Azaldı	2 (%16,7)	2 (%6,2)	

miR-384-3p	Arttı	12 (%100)	27(%90)	0,545
	Azaldı	0 (%0)	3 (%10)	
miR-143	Arttı	10 (%83,3)	23 (%76,7)	>0,999
	Azaldı	2 (%16,7)	7 (%23,3)	
miR-16	Arttı	10 (%83,3)	26 (%86,7)	>0,999
	Azaldı	2 (%16,7)	4 (%13,3)	

Hastaların tanı anında metastatik olup olmama durumuna göre miRNA ekspresyonlarının artıp azalma arasındaki ilişki incelendiğinde; miR-143 ekspresyonu tanı anında metastatik olan hastaların %68'inde artarken, %32'inde azaldığı görüldü, tanı anında metastazı olmayan hastaların ise %94,11'inde artarken %5,88'inde azalmıştı ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,043). Diğer miRNA'ların metastaz durumuna göre gen ekspresyon artma/azalma sıklıkları istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklılık göstermedi (Tablo-6).

Tablo-6: Hastaların Metastaz Durumuna Göre miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

		Metastatik	Non- metastatik	p değeri
miR-193a	Arttı	7 (%28)	5 (%29,4)	>0,999
	Azaldı	18 (%72)	12 (%70,5)	
miR-543	Arttı	13 (%52)	9 (%52,94)	>0,999
	Azaldı	12 (%48)	8 (%47,05)	
miR-200c	Arttı	18 (%72)	11 (%64,70)	0,871
	Azaldı	7 (%28)	6 (%35,29)	
miR-622	Arttı	21 (%84)	16 (%94,11)	0,632
	Azaldı	4 (%16)	1 (%5,88)	
miR-30b	Arttı	24 (%96)	17 (%100)	>0,999
	Azaldı	1 (%4)	0 (%0)	
miR-29b	Arttı	19 (%76)	16 (%94,11)	0,210
	Azaldı	6 (%24)	1 (%5,88)	
miR-96-5p	Arttı	23 (%92)	2 (%11,76)	>0,999
	Azaldı	2 (%8)	15 (%88,23)	
miR-384-3p	Arttı	23 (%92)	16 (%94,11)	>0,999
	Azaldı	2 (%8)	1 (%5,88)	
miR-143	Arttı	17 (%68)	16 (%94,11)	0,043*
	Azaldı	8 (%32)	1 (%5,88)	
miR-16	Arttı	21 (%84)	15 (%88,23)	>0,999
	Azaldı	4 (%16)	2 (%11,76)	

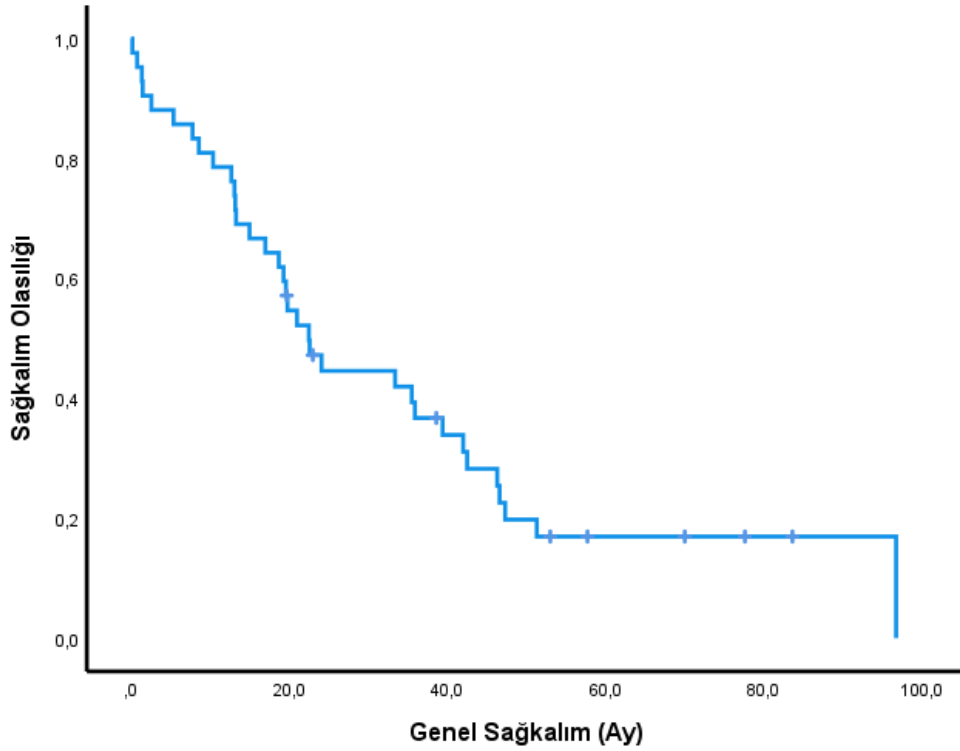
Çalışmaya dahil edilen hastaların tümör lokalizasyonunun sağ kolon ve sol kolon olma durumuna göre miRNA ekspresyonlarının artma/azalma sıklıkları arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo-7).

Tablo-7: Tümör Lokalizasyonuna Göre miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

		Sağ Kolon	Sol Kolon	p değeri
miR-193a	Arttı	4 (%28,57)	8 (%28,57)	>0,999
	Azaldı	10 (%71,42)	20 (%71,42)	
miR-543	Arttı	9 (%64,28)	13 (%46,42)	0,444
	Azaldı	5 (%35,71)	15 (%53,57)	
miR-200c	Arttı	11 (%78,57)	18 (%64,28)	0,485
	Azaldı	3 (%21,42)	10 (%35,71)	
miR-622	Arttı	11 (%78,57)	26 (%92,85)	0,313
	Azaldı	3 (%21,42)	2 (%7,14)	
miR-30b	Arttı	14 (%100)	27 (%96,42)	>0,999
	Azaldı	0 (%0)	1 (%3,57)	
miR-29b	Arttı	12 (%85,71)	23 (%82,14)	>0,999
	Azaldı	2 (%14,28)	5 (%17,85)	
miR-96-5p	Arttı	13 (%92,85)	25 (%89,28)	>0,999
	Azaldı	1 (%7,14)	3 (%10,71)	
miR-384-3p	Arttı	13 (%92,85)	26 (%92,85)	>0,999
	Azaldı	1 (%7,14)	2 (%7,14)	
miR-143	Arttı	10 (%71,42)	23 (%82,14)	0,451
	Azaldı	4 (%28,57)	5 (%17,85)	
miR-16	Arttı	13 (%92,85)	23 (%82,14)	0,645
	Azaldı	1 (%7,14)	5 (%17,85)	

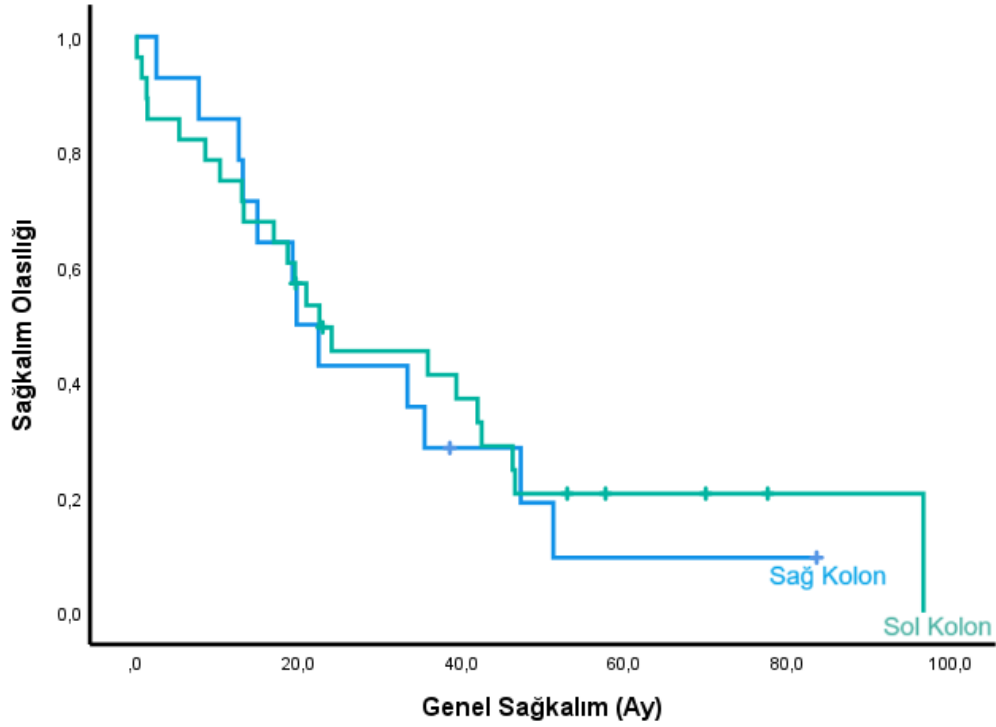
4.4. Sağkalım Verileri

Hastaların ortalama sağkalım süresi 22.5 ay olarak hesaplandı (Şekil 16). Çalışmamızdaki 42 hastadan 8 hasta yaşarken, 34 hasta ex oldu.



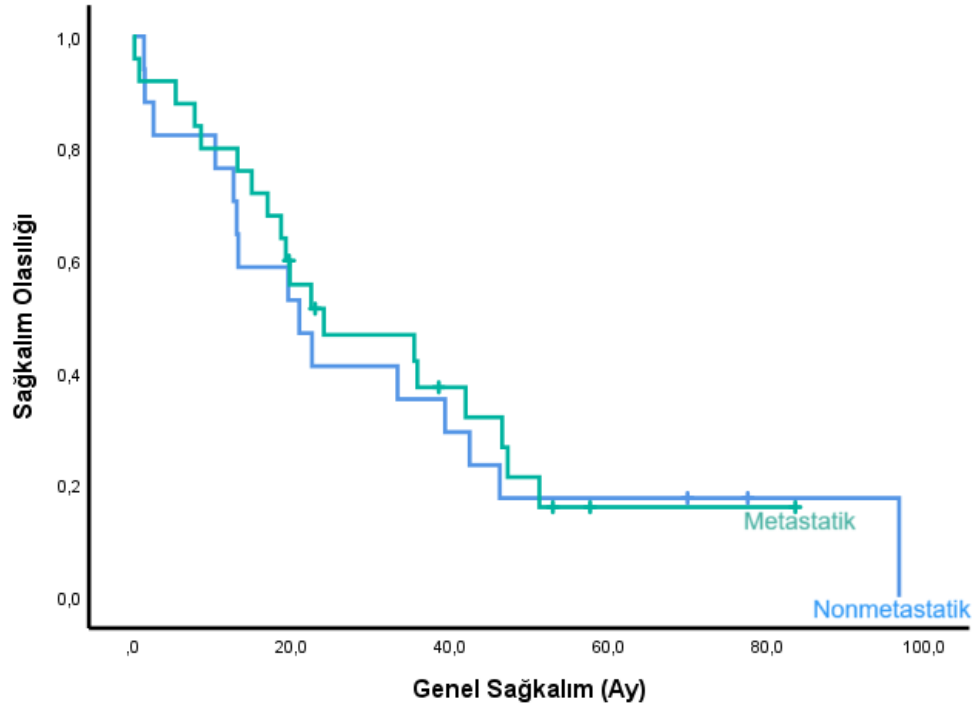
Şekil-16: Hastaların genel sağkalımları.

Çalışmamızdaki 14 hasta sağ kolon tümörüne, 28 hasta sol kolon tümörüne sahipti. Tümörü sağ kolonda lokalize olan hastaların ortalama sağkalım süresi 19,8 ay iken tümörü sol kolonda lokalize olan hastaların ortalama sağkalım süresi 22,6 ay olarak hesaplandı (Şekil 17) ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,665$).



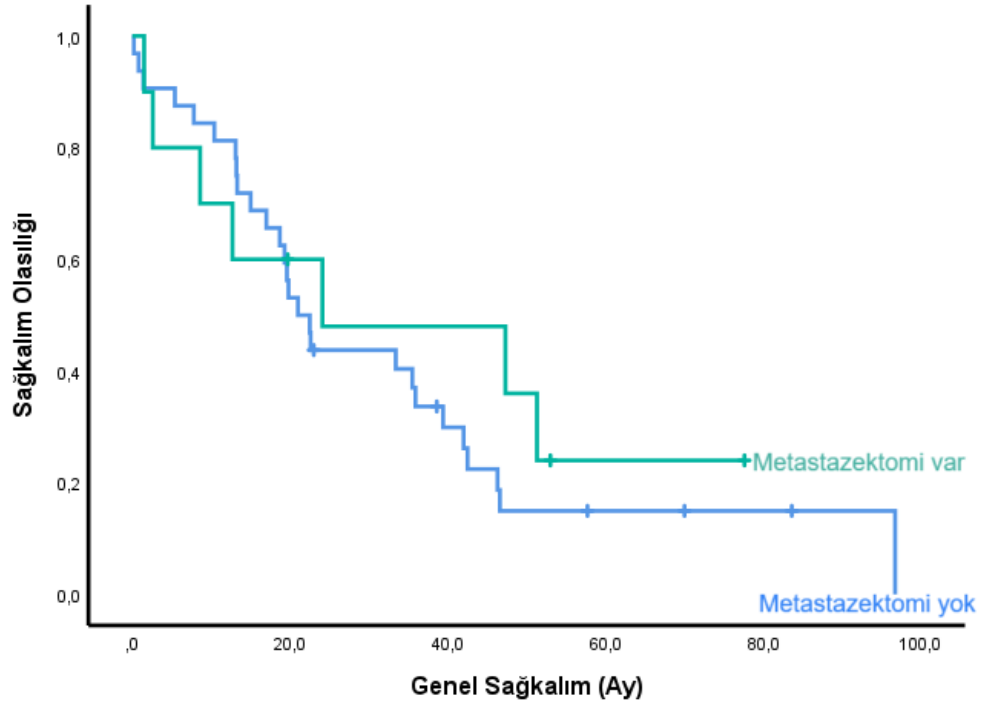
Şekil-17: Hastaların tümör lokalizasyonuna göre ortalama sağkalım süreleri

Çalışmaya dahil edilen hastaların 25'i tanı anında metastatik iken, 17 hastada sonradan metastaz gelişti. Tanı anında metastatik olan hastaların ortalama sağkalım süresi 24 ay, tanı anında metastazı olmayan hastaların ortalama sağkalım süresi ise 21 aydı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,772$) (Şekil 18).



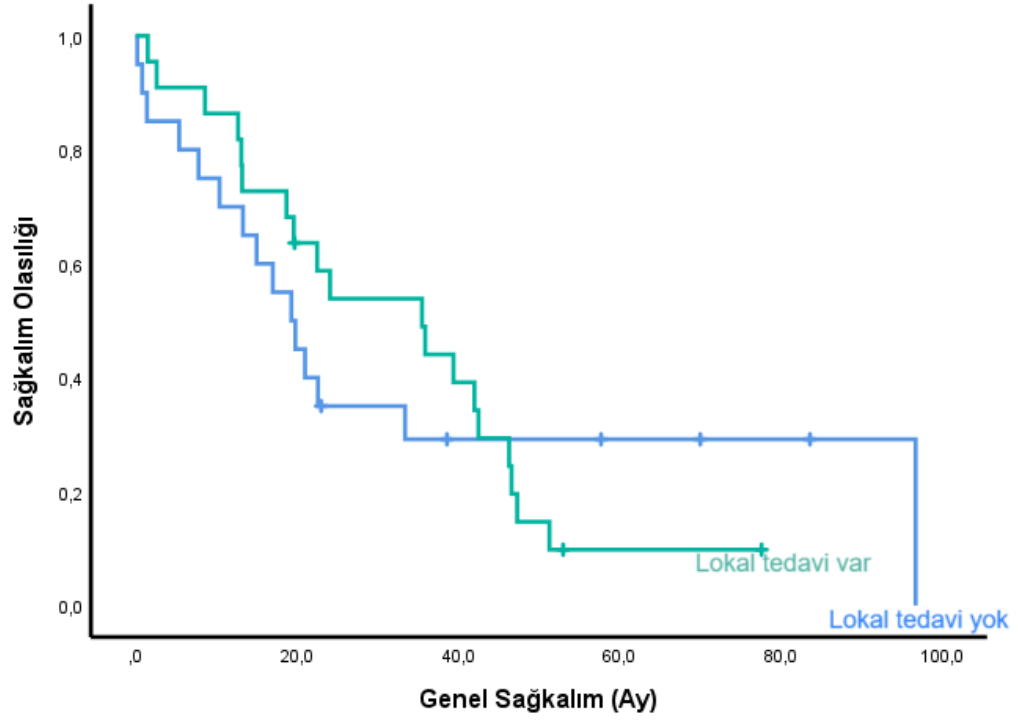
Şekil-18: Hastaların tanı anı metastaz durumuna göre ortalama sağkalım süreleri

Çalışmadaki 10 hastaya karaciğere yönelik metastazektomi yapılırken 32 hastaya yapılmamıştı. Karaciğere metastazektomi yapılan hastalarda ortalama sağkalım süresi 24 ay, metastazektomi yapılmayan hastalarda ortalama sağkalım süresi 21 ay olarak bulundu ve aralarında anlamlı istatistiksel fark gözlenmedi ($p=0,484$) (Şekil 19).



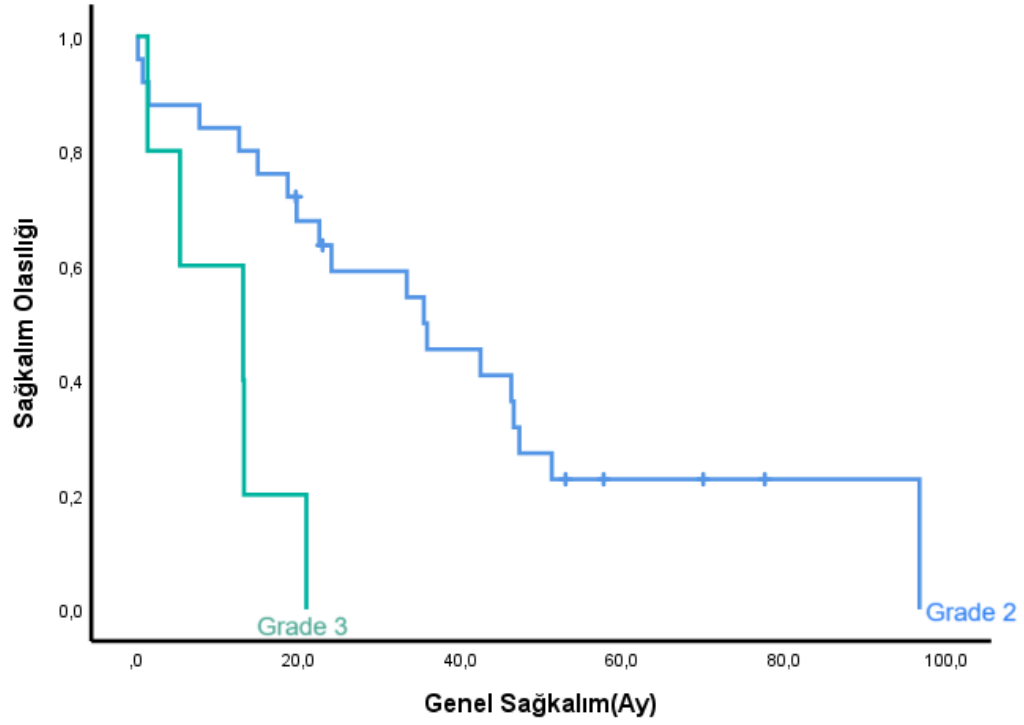
Şekil-19: Hastaların karaciğere metastazektomi yapılma durumuna göre ortalama sağkalım süreleri

Çalışmaya dahil edilen hastalardan 11'ine TAKE, 10'una metastazektomi ve 5'ine RF olmak üzere toplamda 22 hastaya karaciğer metastazına yönelik lokal tedavi uygulanmıştı, 20 hastanın karaciğer metastazına ise lokal tedavi uygulanmamıştı. Karaciğere lokal tedavi uygulanan hastaların ortalama sağkalım süresi 35,5 ay iken, lokal tedavi uygulanmayan hastaların ortalama sağkalım süresi 19,3 aydı ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,947$) (Şekil 20).



Şekil-20: Hastaların Karaciğere lokal tedavi alma durumuna göre ortalama sağkalım süreleri

Hastaların tümör derecesine göre sağkalımları incelendiğinde; grade 2 tümöre sahip hastaların ortalama sağkalım süresi 35,5 ay grade 3 tümöre sahip hastaların ortalama sağkalım süresi 13,2 aydı ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,002$) (Şekil 21).

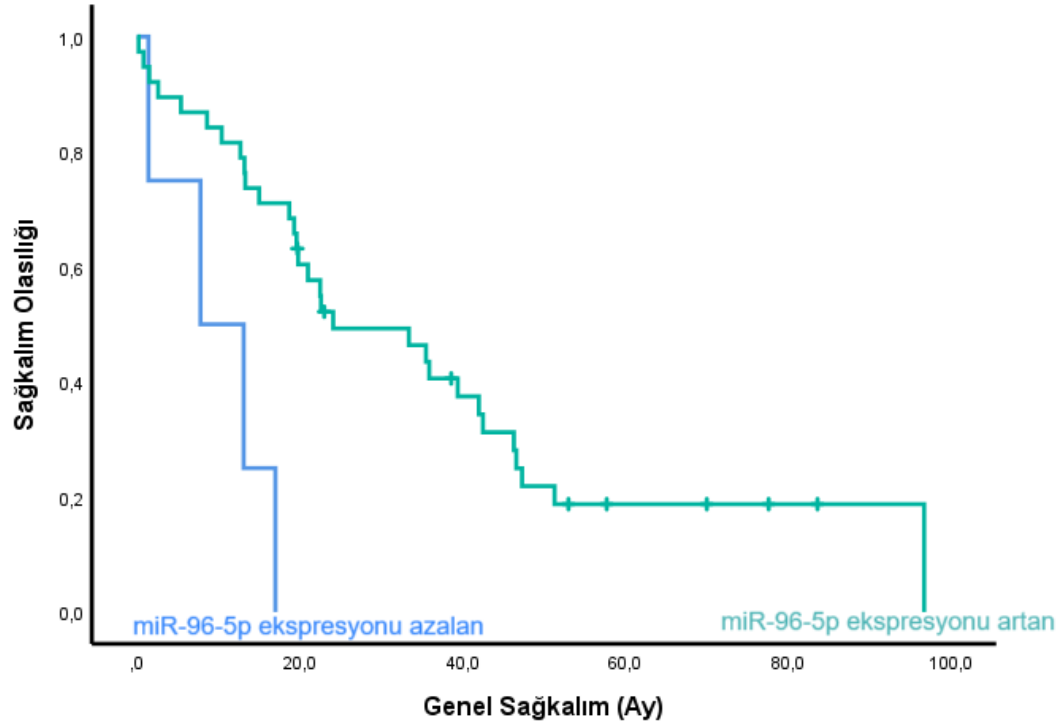


Şekil-21: Hastaların tümör grade durumuna göre ortalama sağkalım süreleri

Hastaların miRNA gen ekspresyonundaki artma/azalma ve ortalama sağkalım süresi arasındaki ilişki incelendiğinde, miR-96-5p ekspresyonu artan hastaların ortalama sağkalım süresi 24,1 ay iken miR-96-5p ekspresyonu azalan hastaların ortalama yaşam süresi 7,8 ay olarak bulundu ve aralarında istatistiksel açıdan önemli ölçüde fark mevcuttu ($p=0,02$) (Tablo-8). Hastalarda miR-96-5p ekspresyonu artıp azalmasına ilişkin ortalama sağkalım süreleri Şekil 22’de verilmiştir.

Tablo-8: miRNA ekspresyonlarının artıp azalma durumuna göre ortalama sağkalım süreleri

miRNA Alt Tipi	Arttı (mOS)	Azaldı (mOS)	p değeri
miR-193a	19,6 (0,0-40,1)	22,6 (0,0-46,2)	p=0,430
miR-543	22,5 (17,6-27,3)	21 (12,0-29,9)	p=0,417
miR-200c	19,3 (9,8-28,7)	35,9 (12,2-59,5)	p=0,546
miR-622	22,5 (17,2-27,7)	51,3 (1,3-101,2)	p=0,382
miR-30b	22,5 (6,03-38,9)	24,1 *	p=0,813
miR-29b	22,5 (17,3-27,6)	51,3 (0,0-129,6)	p=0,321
miR-96-5p	24,1 (7,6-40,5)	7,8 (0-19,2)	p=0,02*
miR-143	21 (16,6-25,3)	51,3 (8,8-93,7)	p=0,170
miR-16	19,6 (16,3-22,8)	42 (29,5-54,4)	p=0,116



Şekil-22: miR-96-5p ekspresyonu artan ve azalan hastalarda ortalama sağkalım süreleri.

Çalışmamızda OS'yi etkileyen faktörlerin analiz sonuçları Tablo-9'da verildi (Survival analizi ve Log-rank testi). Burada görüldüğü gibi; tanı yaşı, cinsiyet, tümör lokalizasyonu ve karaciğere lokal tedavinin OS üzerinde istatistik olarak anlamlı bir etkisi gözlenmedi. Bunun yanında grade in OS üzerinde istatistik olarak anlamlı bir etkisi gözlendi ($p=0,005$). Yine miRNA ekspresyonlarında miR96-5p'nin OS üzerinde istatistik olarak anlamlı bir etkisi gözlendi ($p=0,05$), miR-16'nın OS üzerinde istatistik olarak anlamlı bir etkisi gözlendi ($p=0,126$), miR-143 ekspresyonunda OS üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde etkisi gözlendi ($p=0,170$).

Tablo-9 : Kras mutant karaciğer metastazlı kolorektal kanserli hastalarda OS'yi etkileyen tek değişkenli ve çok değişkenli analiz değerlendirmesi

Faktör		Tek Değişkenli Analiz			Çok Değişkenli Analiz		
		HR	GA	p	HR	GA	p
Tanı Yaşı	Yıl	1,005	1,005-0,971	0,782			
Cinsiyet	Kadın(R)	0,692	0,334-1,434	0,322			
Tümör Lokalizasyonu	Sağ (R) vs. Sol	0,855	0,420-1,740	0,665			
Grade	2 (R) vs. 3	5,123	1,619-	0,005	4,198	1,266-	0,019
Karaciğere Lokal	Var (R)	0,977	0,487-1,956	0,947			
miR-193a	Arttı (R) vs.	1,349	0,640-2,844	0,431			
miR-543	Arttı (R) vs. Azaldı	1,331	0,666-2,661	0,419			
miR-200c	Arttı (R) vs. Azaldı	1,258	0,596-2,655	0,547			
miR-622	Arttı (R) vs. Azaldı	1,693	0,514-5,582	0,514			
miR-30b	Arttı (R) vs. Azaldı	0,785	0,106-5,841	0,813			
miR-29b	Arttı (R) vs. Azaldı	0,701	0,589-4,910	0,326			
miR-96-5p	Arttı (R) vs. Azaldı	0,188	0,059-0,601	0,05	0,141	0,023-0,878	0,036
miR-16	Arttı (R) vs. Azaldı	2,2777	0,794-6,529	0,126	2,047	0,582-7,207	0,265
miR-143	Arttı (R) vs. Azaldı	2,780	17,052-	0,170	0,974	0,384-2,729	0,961

Kısaltmalar: HR, hazard ratio; GA, güven aralığı; R, referans;

*Kalın yazı tipi istatistiksel anlamlılığı ortaya koymaktadır.**Cox regresyon modeli istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0001)

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolorektal kanser, dünya genelinde en sık görülen üçüncü ve en sık ölüme neden olan dördüncü kanser türü olup, yılda yaklaşık 1,2 milyon yeni vakaya ve 600.000 ölüme neden olmaktadır (2). KRK hastalarının yaklaşık %70-80'inde nüks ve/veya metastaz gelişir, metastazlar sıklıkla izole olarak meydana gelmektedir. Bu metastazların %80-90'ı ilk 2-3 yıl içinde, %5'inden azı ise 5 yıldan sonra görülmektedir (86). Metastatik bölgelerin %50'sinden fazlası karaciğerdedir. Kolorektal kanser karaciğer metastazı (KRKM), KRK'ya bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (6). Mevcut parametrelere göre KRAS mutasyonları, KRK'da en iyi çalışılan biyobelirteçlerden biridir ve sıklıkla somatik mutasyonlardan oluşur (7). KRAS mutasyonu tümör gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamasına rağmen, KRAS aracılı transkripsiyonel regülasyonun mekanizması hala tam olarak anlaşılmamıştır. Çok sayıda çalışma, transkripsiyon düzenleyicilerinin gen mutasyonlarının miRNA'ların düzensizliğiyle yakından ilişkili olduğunu ve bazı miRNA'ların etkilerini göstermek için KRK' daki mutant KRAS ile doğrudan etkileşime girdiğini göstermiştir (9). MiRNA'lar stabildir ve RNaz aracılı bozunmadan korunur, böylece biyolojik sıvılarda ve arşiv dokularında biyobelirteç çalışmaları için tespit edilebilir(87). Artan kanıtlar, düzensiz miRNA'ların ifadesinin, tümör baskılayıcıların veya belirli miRNA hedeflerinin ifadesini düzenlemek için onkogenler olarak hareket ederek KRK' nın ilerlemesinde ve metastazında işlevsel bir role sahip olduğu ve yüksek stabiliteleri nedeniyle, değerli bir biyobelirteç sınıfı olabileceklerini göstermektedir (88).

Bu doğrultuda, mevcut tez çalışmasında Bursa Uludağ Üniversitesi Hastanesi Onkoloji Bilim Dalı'nda takipli KRAS mutasyonuna sahip kolorektal karaciğer metastazlı 42 hasta retrospektif olarak incelendi. Çalışmaya dahil edilen hastalara ait tümörlü ve tümöre bitişik sağlıklı dokularda miR-16, miR-143, miR-193a-3p, miR-543, miR-200c, miR-622, miR-30b, miR-29b, miR-96-5p ve miR-384-3p'nin ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar değerlendirildi,

miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların ve olası etkilerinin açığa çıkarılması amaçlandı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların ortalama tanı yaşı 61 idi ve çoğunluğu erkekti. Çalışmamızla uyumlu olarak, ABD Ulusal Kansere Veritabanı'nda 2005 ile 2019 yılları arasında kolorektal kanserli 775.000 hastanın retrospektif kohort analizinde; KRK'nın en sık 50-79 yaş arasında görüldüğü ve erkeklerde daha sık görüldüğü tespit edilmiştir (89). Hastaların ortalama sağkalım süresi 22,5 ay olarak hesaplandı. 2004'ten 2019'a kadar Teksas Üniversitesi Anderson Kansere Merkezi'nde (UTMDACC) de novo metastatik KRK'lı 1420 hastayı retrospektif olarak incelenmesinde medyan OS, 22,6 ay olarak bizim çalışmamızla benzer bulunmuştur (90). Çalışma hastalarının tümör derecesine göre sağkalımları incelendiğinde; grade 2 tümöre sahip hastalar ile grade 3 tümöre sahip hastaların ortalama sağkalım süresi aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,002$) . Tümör derecesi veya histolojik derece, KRK'da evreden bağımsız olumsuz bir prognostik faktördür azalmış sağkalım ve artmış tekrarlama riski ile birlikte (34).

MiRNA ekspresyonları ile ilgili yapılan analizlerden elde edilen sonuçlara göre, hasta grubunda miR-16 ($p<0,0001$), miR-143 ($p<0,0001$), miR-200c ($p<0,0001$), miR-543 ($p=0,0116$), miR-622 ($p<0,0001$), miR-30b ($p<0,0001$), miR-29b ($p<0,0001$), miR-96-5p ($p<0,0001$) ve miR-384-3p ($p<0,0001$)'nin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılıkların olduğu belirlendi. Çalışmamız miR-16 ekspresyon düzeyinin kolorektal kanserli doku örneklerinde, sağlıklı doku örneklerine kıyasla belirgin şekilde daha düşük seviyede olduğu görüldü. Çalışmamıza benzer şekilde 2017 yılında Tian ve ark. 132 glioblastoma multiforme (GBM) hastası üzerinde yaptığı çalışmada glioblastoma hücrelerinde miR16 ekspresyon kaybı olduğunu ve miR16'nın glioma hücrelerinin göçünü ve invazyonunu engellediği bildirmiştir (91). Ekspresyon düzeyindeki bu düşüş, miR-16'nın gen regülasyonundaki potansiyel rolüyle ilgili olabilir. Ayrıca, miR-16 ekspresyon seviyesinin hasta grubunda düşük olması hastalığın moleküler ve biyolojik mekanizmalarında önemini belirtmektedir.

Elde ettiğimiz bir sonuçta tümör dokularında miR-143 ekspresyonunun kontrol grubuna göre daha düşük olmasıydı. 2009 yılında Clape ve ark. prostat kanserine yönelik sağlıklı ve tümörlü dokular üzerinde yaptığı çalışmada tümörlü dokularda miR-143 ekspresyon seviyesi normal dokulara kıyasla önemli ölçüde daha düşüktü (92). Yine Pichler ve ark. 2013 yılında 77 KRK hastasında yaptığı çalışmada; 77 tümörün 47'sinde (%61) miRNA-143'ün aşağı regülasyonu gözlemlendi ve yapılan analizlerle düşük miRNA-143 ekspresyon seviyelerinin kansere özgü sağkalımda bağımsız bir prognostik faktör olabileceği gösterilmişti (93). miRNA ekspresyon düzeylerine ilişkin son çalışmalar, miR-143'ün kanser dokularında sıklıkla azaldığını göstermiştir. Bu nedenle, miR-143'ün insan kanserlerinde önemli bir tümör baskılayıcı işlevi olduğu ileri sürülmektedir.

Çalışmamızdaki sonuçlardan birisi de hasta grubu ile kontrol grubu arasında miR-193a-3p 'nin ekspresyon seviyelerinde dikkate değer bir fark olmadığıydı. Birçok çalışmada miR-193a-3b'nin meme kanseri, gliyoma, prostat kanseri, pankreas kanseri, melanom, serviks kanseri ve Hepatosellüler kanser (HCC) gibi tümörlerde baskılama fonksiyonu vurgulanmıştır (94,95). Buna karşılık, bazı araştırmacılar da miR-193b'nin bir onkogen olarak görev yaptığını açıklamış ve bu miRNA'nın aşırı ekspresyonunun serviks kanseri ve kolorektal karsinomla ilişkili kanserlerde olduğunu bildirmiştir (96). Yapılan birçok çalışmada miR-193a-3p nin daha çok erken evre KRK tümörleri ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır, çalışmamızda miR-193a-3p ekspresyon seviyelerinde anlamlı fark bulunmaması hasta grubumuzun evre 4 hastalardan oluşması ile ilişkili olabilir.

Çalışmamızda hasta grubumuzdaki miR-543 ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla belirgin bir şekilde daha yüksek görüldü. Chuannan ve ark. Mart 2015 ile Şubat 2016 arasında Dalian Tıp Üniversitesi Hastanesinde primer KRK cerrahisi geçiren 92 hastanın tümör dokusu ve bu hastalardan 20'sinin tümör dışı dokuları ile yaptıkları çalışmada, miR-543'ün insan KRK dokularında aşırı ifade edildiğine dair sonuçlar elde ettiler (97). Yine 2016 yılında Güneş ve ark. da miR-543'ün KRK dokularında sürekli olarak yukarı regüle edildiğini ve aşırı ifadesinin tümör hücresi göçünü ve invazyonunu

desteklediğini bulmuştur (98)(98)Bu veriler miR-543'ün KRK hastaları için hematojen metastazın prognostik bir göstergesi olduğunu ve KRK'da onkojenik bir miRNA olarak hareket ettiğini güçlü bir şekilde göstermektedir.

Elde ettiğimiz bir diğer sonuçta hasta grubunda miR-622'nin ekspresyon seviyesinde önemli bir artış olduğunu ve kontrol grubuna göre dikkate değer bir farklılık gösterdiği yönündeydi. Dişi ve ark. 2015 yılında miR-622'nin ifade düzeyinin kolorektal tümör dokularında tümöre bitişik doku örneklerine göre çok daha düşük olduğunu bulmanın yanında miR-622'nin ekspresyon düzeyinin metastatik KRK dokularında metastatik olmayan örneklerle kıyasla anlamlı şekilde azaldığını gösterdiler. Ayrıca çalışmanın devamında ratlar ile in vivo ortamda yaptıkları deneylerle KRK dokularında miR-622 ve KRAS ekspresyonunun korelasyonunu incelediler sonuçta KRAS'ın miR-622'nin KRK hücre göçü üzerindeki inhibe edici etkisini önemli ölçüde tersine çevirdiğini gösterdiler (51). Buna karşı 2017 yılına Wang ve ark. ise Shenyang Tıp Fakültesi'ne bağlı Merkez Hastanesi'nde 119 KRK tanılı hasta ile yaptıkları çalışmada tam aksine miR-622 ekspresyonunun KRK dokularında ve hücre hatlarında, KRK olmayan dokulara ve normal insan kolon epitel hücre hattına kıyasla yüksek olduğunu buldular (99). MiR-622'nin meme kanseri, glioma, kolorektal kanser, hepatosellüler karsinom (HCC), akciğer kanseri, mide kanseri, melanom , yumurtalık karsinomu , prostat kanseri ve pankreas kanseri gibi çeşitli kanserlerde tümör baskılayıcı veya destekleyici olarak hareket ettiğine dair artan kanıtlar bulunmaktadır. miR-622 ekspresyonu bu tümörlerin klinik özellikleriyle ilişkilidir ve EGF/ERK sinyalleme ve KRAS sinyalleme dahil olmak üzere moleküler yolları düzenleyerek hücre çoğalmasını, apoptozu, göçü ve metastazı etkileyebilir (100). Elde edilen bu veriler, miR-622'nin hastalık prognozunda rol oynadığını, hastalıkla ilişkili biyolojik mekanizmalarda yer aldığını göstermektedir.

Çalışmamızda MiR-30b'nin ekspresyon seviyesi, hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. 2013 yılında Zhong ve ark. yapmış olduğu çalışma miR-30b'nin metastatik KRK hücre hatlarında ve metastatik dokularda önemli ölçüde aşağı düzenlendiğini göstererek miR-30a'nın insan KRK metastazındaki biyolojik rolüne dair ilk kanıtı sağladı ve aynı zamanda

PIK3CD'yi KRK hücre göçü ve invazyonunun miR-30a aracılı baskılanmasında potansiyel olarak rol oynayan bir hedef olarak tanımladı (101). Aynı yıl, Wen ve ark. (102) Çin Güney Tıp Üniversitesi'nde retrospektif olarak 40 KRK patoloji dokusu üzerinde, miR-30b'nin kolorektal tümör oluşumunun kontrolündeki klinik patolojik korelasyonları ve biyolojik işlevleri ortaya koyma amacı ile yaptıkları çalışma;miR-30b'nin aşırı ekspresyonunun in vitro KRK hücre proliferasyonunu ve in vivo tümör büyümesini baskıladığını gösterdi .Bunun yanında miRNA-30b ile onkogen KRAS, PIK3CD ve BCL2 arasında KRK patogenezinde işlevsel ve mekanik bağlantılar ortaya koydu (102). miR-30b ile ilgili araştırmalar arttıkça, KRK'da hücre çoğalması ve tümör büyümesinin düzenlenmesinde oynadığı önemli roller daha aydınlatılacaktır. Aynı zamanda KRK için potansiyel bir prognostik belirteç veya tedavi hedefi olabileceğini miR-30b ekspresyonunun yeniden artırılması, kötü prognozlu KRK'yı hedeflemek için umut vadeden bir tedavi yaklaşımı olabileceğine dair kanıtlarda artacaktır.

Bizim çalışmamızda MiR-29b'nin ekspresyon düzeyleri, hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. MiR-29 ailesi (miR-29a, miR-29b ve miR-29c), EMT'yi düzenleyerek tümör ilerlemesinde rol oynar. Özellikle, miR-29c'nin aşağı düzenlenmesi, in vitro EMT'yi baskılayarak KRK hücre invazyonunda hayati bir role sahiptir. Ayrıca, miR-29b, EMT'yi baskılar ve MAPK/ERK ve PI3K/AKT yollarını negatif olarak düzenleyerek hücre invazyonunda hayati bir rol oynar (103). 2019 da Sur ve ark. miR-29b ekspresyonunun prostat kanserinde önemli ölçüde daha düşük olduğunu ve prostat kanseri metastazını engellediğini gösterirken (55) 2020 yılında Yin ve ark. miR-29b ve miR-30d'nin meme tümör oluşumundaki işlevsel rollerini araştırmak için yaptıkları deneysel çalışmada meme kanseri hücrelerinin miR-29b, miR-30d ve kontrol grubu hücreleriyle transfekte ederek miR-29b ve miR-30d aşırı ekspresyonunu doğruladılar (56). Bu sonuçlar, metastatik kolorektal kanser için etkili terapötik stratejileri keşfetmede potansiyel yeni yollar açabilir.

Çalışmamızdaki sonuçlardan birisi de miR-96-5p'nin hasta grubuna kıyasla kontrol örneklerinde daha yüksek düzeyde ifade edilmesiydi. Ayrıca çalışmamızın sağkalım analizlerinde de miR-96-5p ekspresyonu artan

hastaların ortalama sağkalım süresi ile miR-96-5p ekspresyonu azalan hastaların ortalama sağkalım süresi aralarında istatistiksel açıdan anlamlı derecede fark mevcuttu. Çalışmamıza benzer şekilde Ress ve ark. 80 KRK hastasından alınan verilerle yapılan retrospektif bir çalışmada da tümör dokusundaki düşük miR-96-5p ekspresyon seviyeleri uzak metastaz ile ilişkilendirildi ve düşük miR-96-5p ekspresyonunun kolorektal kanser hastalarında kansere özgü sağkalım için negatif bir bağımsız öngörücü olduğunu doğruladı (59). Yine Xiaoqin ve ark. 2020 yılında miR-96-5p'nin in vivo tümör büyümesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için nazofarenk kanserli hastaların tümör dokusundan elde edilen miR-96-5p transfekte edilmiş erkek fareler üzerinde yaptığı deneysel çalışma sonuçları miR-96-5p'nin aşırı ifadesinin tümör taşıyan farelerde tümör ağırlığını ve boyutunu azalttığını ve kök hücre benzeri belirteç proteinlerin ve apoptozla ilişkili proteinlerin ifadesini inhibe ettiğini gösterdi (104). 2020 yılında Xu ve ark. gerçek zamanlı kantitatif PCR kullanılarak 30 T-ALL hastasının periferik kanındaki lösemik hücrelerde miR-96-5p'nin hücre canlılığı ve çoğalması üzerindeki etkilerini araştırdığı bir çalışmada miR-96-5p, sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldığında T-ALL hastalarının periferik kanında qPCR ile düşük ekspresyon seviyeleri gösterdiği ve miR-96-5p taklit transfeksiyonu ile yukarı regüle edildiğinde Jurkat hücrelerinin canlılığını ve çoğalmasını önemli ölçüde engellediği gösterildi (105). miR-96-5p ekspresyonu çeşitli kanser türlerinde sıklıkla değişir ve KRAS onkogeni miR-96-5p'nin potansiyel hedeflerinden biri olarak tanımlanmıştır. KRK'da daha önce bildirilen miR-96-5p ekspresyonunun değişmesi ve KRAS ekspresyonu üzerindeki etkisi göz önüne alındığında, prognoz üzerindeki potansiyel etkisinin ve EGFR hedefli ajanlarla tedavi edilen KRK hastalarında terapötik yanıtı tahmin etmedeki olası rolünün değerlendirilmesi büyük ilgi görmektedir (59).

Elde ettiğimiz bir diğer sonuçta miR-384-3p'nin ekspresyon seviyesinin hasta grubunda kontrol gruba kıyasla daha yüksek olmasıydı. 2018 yılında Yan ve ark. ise miR-384 ekspresyonunun tümör dışı örneklerle karşılaştırıldığında RCC örneklerinde aşağı düzenlendiğini gösterdiler (106). Wang ve ark. aynı yıl miR-384'ün mide kanseri hücre hatlarında ve normal bir

mide hücre hattında ifade düzeylerini ölçtü, miR-384, normal mide hücrelerine kıyasla kanserli hücre hatlarında önemli ölçüde aşağı düzenlenmiştir (107). 2016 yılında Wang ve ark. miR-384 ekspresyonu 100 primer KRK biyopsisi dokusunda ve bunların eşleştirilmiş bitişik normal dokularında gerçek zamanlı PCR ile tespit ettiler ve miR-384'ün eşleştirilmiş bitişik normal dokulara kıyasla KRK doku örneklerinde belirgin aşağı düzenlendiğini gösterdiler (61). Çalışmalar, miR-384'ün bazı insan tümörlerinde tümör baskılayıcı olarak görev yapabileceğini ima etmiştir. Ancak miR-384'ün KRK karsinogenez ve gelişim sürecindeki klinik patolojik korelasyonlar ve biyolojik işlevlerdeki rolleri hakkında çok az şey bilinmektedir (59). Ayrıca miR-384 için klinik çalışma olsa da miR-384-3p özelinde daha da kısıtlı araştırma mevcuttur, çalışmamız bu yönüyle de literatürde önem arz edecektir.

Son olarak çalışmamızda hasta grubundaki miR-200c'nin ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu bulduk. Son zamanlarda, çeşitli miR-200 üyelerinin inaktivasyonu ile ilişkili varsayımsal DNA metilasyonu, kanserde tanımlanmıştır. 2014 yılında Mi ve ark. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) hastaları ile yaptığı çalışmada kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, miR-200c ekspresyonu, KHDAK'li hastalarda önemli ölçüde yukarı regüle edildi (108). Kan ve ark. yüksek dereceli seröz epitelyal over kanserli hastaların ve sağlıklı bireylerin serum plazma örnekleri ile yaptığı bir çalışmayla miR-182, miR-200a, miR-200b ve miR-200c, normal insan over yüzey epitel hücrelerine kıyasla kanserli hücre hatlarında oldukça aşırı ifade edildiğini gösterdi (109). İnsan kolorektal kanser metastazının miR-200c ile ilişkisini inceleyen Kün Hur ve arkadaşları, metastazsız erken evre KRK'lar ile bitişik normal kolon mukozasının benzer miR-200c ekspresyonu gösterdiğini öte yandan, metastazlı geç evre KRK'ların bitişik normal kolon mukozasına kıyasla düşük miR-200c ekspresyonu gösterdiğini ayrıca karaciğere metastaz yapmış KRK dokuları, bitişik hepatositlerle karşılaştırıldığında çok yüksek miR-200c ekspresyonu gösterdi ve bu da yüksek miR-200c ekspresyonunun uzak metastatik bölgelerdeki tümör hücrelerinin konsolidasyonu ve kolonizasyonu için gereken aktif hücre çoğalmasına izin verdiğini düşündürdü (110). Roh ve ark. kolorektal tümörlerin

epitel bileşenlerinin seçici miR-200 hiper metilasyonuna uğradığını ortaya koydu (48). Bu bulgular ışığında miR-200 ailesinin insan tümörlerinin fenotiplerinin evrimleşmesine ve uyum sağlamasına katkıda bulunduğunu ve miR-200c nin kolonda EMT ve metastatik davranışın aracılık edilmesinde önemli bir rol oynayarak KRK'lı hastalar için potansiyel bir tanı belirteci ve tedavi hedefi olarak hizmet edebileceğini söylemek mümkün görünmektedir.

Tüm veriler bir araya getirilerek değerlendirildiğinde, özellikle miR-16, miR-96-5p, miR-143, miR-384, miR-29b, miR-30b, miR-622, miR-200c'nin $p < 0,0001$ değerleri ile hastalık üzerinde güçlü bir anlamlılık taşıdığını göstermektedir, elde edilen bu bulgular, miRNA ekspresyon düzeylerinde oluşan bu farklılıkların hastalığın agresivitesi ile ilişkili olabileceğini ve hastalık prognozunda potansiyel birer biyobelirteç veya terapötik hedefler olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar klinik anlamda hastanın takip ve tedavisine etki etme potansiyeli bulunan yararlı bir bilgidir ancak miRNA'ların klinik kullanıma girebilmesi ve tedavi hedefi olabilmesi için bu konuda daha fazla sayıda ve uzun takipli çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır. Araştırmadan elde edilen bulgular, gerçekleştirilmesi planlanan ileri çalışmalara yol göstericidir. Alınan bu veriler doğrultusunda hasta ve kontrol sayısının artırılarak daha ileri fonksiyonel analizlerin yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Connell LC, Mota M, Ignez Braghiroli M, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. *Options in Oncol*. 2017;18:23.
2. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet* 2014;383(9927):1490–502.
3. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Müdürlüğü. Türkiye Kanseri İstatistikleri 2018. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/Dokumanlar/Istatistikler/Kanser_Rapor_2018.pdf (Erişim tarihi:3 Mart 2020)
4. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: Results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28(3):466–74.
5. Huang S, Tan X, Huang Z, et al. microRNA biomarkers in colorectal cancer liver metastasis. *J Cancer* 2018; 9(21):3867–6873
6. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2010;375(9719):1030–47.
7. Afrăsânie VA, Marinca MV, Alexa-Stratulat T, et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer-practical implications for the clinician. *Radiol Oncol* 2019;53(3):265–74.
8. Schetter AJ, Okayama H, Harris CC. The role of microRNAs in colorectal cancer. *Cancer J* 2012;18(3):244–52.
9. Wu X, Li Z, Huang N, Li X, Chen R. Study of KRAS-Related miRNA Expression in Colorectal Cancer. *Cancer Manag Res* 2022; 14:2987–3008.
10. Lin M, Chen W, Huang J, et al. MicroRNA expression profiles in human colorectal cancers with liver metastases. *Oncol Rep* 2011 Mar;25(3):739–47.
11. Ibrahim H, Lim YC. KRAS-associated microRNAs in colorectal cancer. *Oncol Rev* 2020 Jul 7;14(2):86–97.
12. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem* 2009;55(4):623–31.
13. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(30):10513.
14. Shirafkan N, Mansoori B, Mohammadi A, et al. MicroRNAs as novel biomarkers for colorectal cancer: New outlooks. *Biomed Pharmacother* 2018; 97:1319–30.
15. Wang D, Liu J, Huo T, Tian Y, Zhao L. The role of microRNAs in colorectal liver metastasis: Important participants and potential clinical significances. *Tumor Biology* 2017;39(6).
16. Qureshi A, Verma A, Ross P, Landau D. Colorectal cancer treatment. *BMJ clinical evidence*, 2010
17. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, et al. Colorectal cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 2015, 1: 15065

18. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *The Lancet*. 2019 Oct 19;394(10207):1467–80.
19. Mármol I, Sánchez-De-Diego C, Dieste AP, et al. Molecular Sciences Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 2017; 18(1):197.
20. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044–58.
21. Burt RW, Disario JA, Cannon-Albright L. Genetics Of Colon Cancer: Impact of Inheritance on Colon Cancer Risk, *Annu. Rev. Med.* 1995;46(1)
22. Alberto Vaccaro C, Pavicic WH, Avellaneda N, et al. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina* 2023;59(9):1646.
23. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients* 2019;11(1):164.
24. Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;20(48):18151–64.
25. Turan M, Meydan N. Moleküler Patoloji ve Kalıtsal Kolorektal Kanser Sendromları. *Türkiye Klinikleri Tıbbi Onkoloji - Özel Konular* 2018;11(4):7–16.
26. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology* 2019;158(2):291.
27. Sullivan BA, Noujaim M, Roper J. Cause, Epidemiology, and Histology of Polyps and Pathways to Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics*, 2022;32(2):177-194.
28. Almeida-Lousada H, Mestre A, Ramalhete S, et al. Screening for Colorectal Cancer Leading into a New Decade: The “Roaring ‘20s” for Epigenetic Biomarkers? *Current Oncology* 2021;28(6):4874–93.
29. De’angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed* 2018;89(9-S):97–101
30. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006;7(5):335–46.
31. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature Genetics* 2006;38(7):787–93
32. Meng M, Zhong K, Jiang T, et al. NC-ND license, The current understanding on the impact of KRAS on colorectal cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2021; 140:111717.
33. Zhu G, Pei L, Xia H, Tang Q, Bi F. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Mol Cancer* 2021; 20:143.
34. Chen K, Collins G, Wang H, Toh JWT. Pathological Features and Prognostication in Colorectal Cancer. *Current Oncology* 2021;28(6):5356.
35. Chu PC, Lin Peng-Chan, Wu HY, et al. Mutant KRAS promotes liver metastasis of colorectal cancer, in part, by upregulating the MEK-Sp1-

- DNMT1-miR-137-YB-1-IGF-IR signaling pathway. *Oncogene* 2018; 37:3440–55
36. Huang S, Tan X, Huang Z, et al. microRNA biomarkers in colorectal cancer liver metastasis. *J Cancer* 2018;9.
 37. Cellura D, Pickard K, Quarantino S, et al. MiR-19-mediated inhibition of Transglutaminase-2 leads to enhanced invasion and metastasis in colorectal cancer. *Mol Cancer Res* 2015;13(7):1095
 38. Wang H. Molecular Sciences MicroRNAs and Apoptosis in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 2020;21(15):5353.
 39. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007;449(7163):682–8.
 40. Clapé C, Fritz V, Henriquet C, et al. miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PLoS One*. 2009;4(10):e7542.
 41. Khordadmehr M, Shahbazi R, Sadreddini S, Baradaran B. miR-193: A new weapon against cancer. *J Cell Physiol* 2019;234(10):16861–72.
 42. Pan C, Stevic I, Müller V, et al. Exosomal microRNAs as tumor markers in epithelial ovarian cancer. *Mol Oncol* 2018;12(11):1935–48.
 43. Oh-Hohenhorst SJ, Lange T. Role of Metastasis-Related microRNAs in Prostate Cancer Progression and Treatment. *Cancers (Basel)* 2021;13(17).
 44. Li L, Li Q. miR-543 impairs breast cancer cell phenotypes by targeting and suppressing ubiquitin-conjugating enzyme E2T (UBE2T). *Bioengineered* 2021;12(2):12394–406.
 45. Zhai F, Cao C, Zhang L, Zhang J. miR-543 promotes colorectal cancer proliferation and metastasis by targeting KLF4. *Oncotarget* 2017;8(35):59246–56.
 46. Byun Y, Choi YC, Jeong Y, et al. MiR-200c downregulates HIF-1 α and inhibits migration of lung cancer cells. *Cell Mol Biol Lett* 2019;24(1).
 47. Ren S, Liu J, Feng Y, et al. Knockdown of circDENND4C inhibits glycolysis, migration and invasion by up-regulating miR-200b/c in breast cancer under hypoxia. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2019;38(1):1–12.
 48. Roh MS, Lee HW, Jung SB, et al. Expression of miR-200c and its clinicopathological significance in patients with colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2018;214(3):350–5.
 49. Orlandella FM, Mariniello RM, Mirabelli P, et al. miR-622 is a novel potential biomarker of breast carcinoma and impairs motility of breast cancer cells through targeting NUA1 kinase. *British Journal of Cancer* 2020;123(3):426–37.
 50. Targhazeh N, Yousefi B, Asghari S, et al. MiR-622 acts as a tumor suppressor to induce cell apoptosis and inhibit metastasis in human prostate cancer. *Andrologia* 2021;53(9): e14174.
 51. Fang Y, Sun B, Li Z, Chen Z, Xiang J. MiR-622 inhibited colorectal cancer occurrence and metastasis by suppressing K-Ras. *Mol Carcinog* 2016;55(9):1369–77.

52. Croset M, Pantano F, Kan CWS, et al. miRNA-30 family members inhibit breast cancer invasion, osteomimicry, and bone destruction by directly targeting multiple bone metastasis-associated genes. *Cancer Res* 2018;78(18):5259–73.
53. Guo QS, Wang P, Huang Y, et al. Regulatory effect of miR-30b on migration and invasion of pancreatic cancer stem cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2019;99(38):3019–23.
54. Liao WT, Ye YP, Zhang NJ, et al. MicroRNA-30b functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting KRAS, PIK3CD and BCL2. *J Pathol* 2014;232(4):415–27.
55. Sur S, Steele R, Shi X, Ray RB. miRNA-29b Inhibits Prostate Tumor Growth and Induces Apoptosis by Increasing Bim Expression. *Cells* 2019;8(11):1455.
56. Yin H, Wang Y, Wu Y, et al. EZH2-mediated Epigenetic Silencing of miR-29/miR-30 targets LOXL4 and contributes to Tumorigenesis, Metastasis, and Immune Microenvironment Remodeling in Breast Cancer. *Theranostics* 2020;10(19):8494.
57. Inoue A, Yamamoto H, Uemura M, et al. MicroRNA-29b is a Novel Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2015;22 (Suppl 3):1410–8.
58. Anderson O, Guttilla Reed IK. Regulation of cell growth and migration by miR-96 and miR-183 in a breast cancer model of epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2020;15(5): e0233187.
59. Ress AL, Stiegelbauer V, Winter E, et al. MiR-96-5p influences cellular growth and is associated with poor survival in colorectal cancer patients. *Mol Carcinog* 2015;54(11):1442–50.
60. Guo Q, Zheng M, Xu Y, Wang N, Zhao W. MiR-384 induces apoptosis and autophagy of non-small cell lung cancer cells through the negative regulation of Collagen α -1(X) chain gene. *Biosci Rep* 2019;39(2):20181523.
61. Wang YX, Chen YR, Liu SS, et al. MiR-384 inhibits human colorectal cancer metastasis by targeting KRAS and CDC42. *Oncotarget* .2016;7(51):84826.
62. Polat FR, Duran Y, Günay İ, et al. What Has Changed in the Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancer? *Namık Kemal Medical Journal*. 2021;9(1):6–8.
63. Hirano D, Urabe Y, Tanaka S, et al. Early-stage serrated adenocarcinomas are divided into several molecularly distinct subtypes. *PLoS One*. 2019 20;14(2):e0211477.
64. Baxter NN, Sutradhar R, Forbes SS, et al. Analysis of administrative data finds endoscopist quality measures associated with postcolonoscopy colorectal cancer. *Gastroenterology* 2011;140(1):65–72.
65. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2018;25(6):1454–5.
66. Dursun N, Paşaoğlu E. Kolon-rektum tümörlerinde amerikan ortak kanser komitesi 8. basım evrelemesi ve amerikan patologlar akademisi protokolündeki değişiklikler ve güncellemeler. *Güncel Patoloji Dergisi* 3 2018;2(3): 78-84.

67. Haraldsdottir S, Einarsdottir HM, Smaradottir A, Gunnlaugsson A, Halfdanarson TR. Colorectal cancer-review. *Laeknabladid*. 2014;100(2):75–83.
69. Ohishi T, Kaneko MK, Yoshida Y, et al. Current Targeted Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2023;24(2).
70. Tirendi S, Marengo B, Domenicotti C, et al. (2023). Colorectal cancer and therapy response: a focus on the main mechanisms involved. *Frontiers in Oncology*,2023;13: 1208140.
71. Yun JA, Huh JW, Park YA, et al. The role of palliative resection for asymptomatic primary tumor in patients with unresectable stage IV colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2014;57(9):1049–58.
72. Sun Z, Thacker JM. Contemporary Surgical Options for Metastatic Colorectal Cancer. *Curr Oncol Rep* 2015;17(4):1–7.
73. Bismuth H, Adam R, Lévi F, et al . Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Annals of surgery*, 1996;224(4), 509-522.
74. Lykoudis PM, O'Reilly D, Nastos K, Fusai G. Systematic review of surgical management of synchronous colorectal liver metastases. *British Journal of Surgery* 2014;101(6):605–12.
75. Hoff PM, Ansari R, Batist G, et al. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: Results of a randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology* 2001;19(8):2282–92.
76. Cunningham D, Pyrhönen S, James RD et al. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 1998;352(9138):1413–8.
77. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, et al. Phase III Multicenter Randomized Trial of Oxaliplatin Added to Chronomodulated Fluorouracil-Leucovorin as First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18(1):136–47.
78. Shin AE, Giancotti FG, Rustgi AK. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2023;44(4):222.
79. Roy J. Future prospects for the pharmaceutical industry. *An Introduction to Pharmaceutical Sciences*. 2011;357–84.
80. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, Phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: The PRIME study. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28(31):4697–705.
81. Price TJ, Peeters M, Kim TW, et al. Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): A randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *Lancet Oncol* 2014;15(6):569–79.
82. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):22.

83. Lenz HJ, Parikh AR, Spigel DR, et al. Nivolumab (NIVO) + 5-fluorouracil/leucovorin/oxaliplatin (mFOLFOX6)/bevacizumab (BEV) versus mFOLFOX6/BEV for first-line (1L) treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): Phase 2 results from CheckMate 9X8. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(4_suppl):8–8.
84. Saoudi Gonzalez N, Salvà F, Ros J, et al. Up-to-date role of aflibercept in the treatment of colorectal cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2021;21(10):1315–24.
85. Majithia N, Grothey A. Regorafenib in the treatment of colorectal cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2016;17(1):137–45.
86. Bonnot PE, Passot G. RAS mutation: site of disease and recurrence pattern in colorectal cancer. *Chin Clin Oncol*. 2019;8(5):55
87. To KKW, Tong CWS, Mingxia W, Cho WCS. MicroRNAs in the prognosis and therapy of colorectal cancer: From bench to bedside. *World J Gastroenterol*. 2018;24(27):2949–73.
88. Balacescu O, Sur D, Cainap C, et al. The Impact of miRNA in Colorectal Cancer Progression and Its Liver Metastases. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19(12):3711.
89. Gefen R, Emile SH, Horesh N, Garoufalia Z, Wexner SD. Age-related variations in colon and rectal cancer: An analysis of the national cancer database. *Surgery* 2023;174(6):1315–22.
90. Zeineddine FA, Zeineddine MA, Yousef A, et al. Survival improvement for patients with metastatic colorectal cancer over twenty years npj Precision Oncology 2023;7(1):1–9.
91. Tian R, Wang J, Yan H, et al. Differential expression of miR16 in glioblastoma and glioblastoma stem cells: their correlation with proliferation, differentiation, metastasis and prognosis. *Oncogene* 2017;36(42):5861.
92. Clapé C, Fritz V, Henriquet C, et al. miR-143 Interferes with ERK5 Signaling, and Abrogates Prostate Cancer Progression in Mice. *PLoS One* 2009;4(10):e7542.
93. Pichler M, Winter E, Stotz M, et al. Down-regulation of KRAS-interacting miRNA-143 predicts poor prognosis but not response to EGFR-targeted agents in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 2012;106(11):1826–32.
94. Wu C, Wang C, Guan X, et al. Diagnostic and Prognostic Implications of a Serum miRNA Panel in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* 2014;9(3):e92292.
95. Xu JH, Zhao JX, Jiang MY, et al. MiR-193 promotes cell proliferation and invasion by ING5/PI3K/AKT pathway of triple-negative breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(6):3122-3129.
96. Jiménez-Wences H, Martínez-Carrillo DN, Peralta-Zaragoza O, et al. Methylation and expression of miRNAs in precancerous lesions and cervical cancer with HPV16 infection. *Oncol Rep*. 2016;35(4):2297-305.
97. Zhai F, Cao C, Zhang L, et al. miR-543 promotes colorectal cancer proliferation and metastasis by targeting KLF4. *Oncotarget* 2017;8(35):59246–56.

98. Sun J, Zhou J, Dong M, et al. Dysregulation of MicroRNA-543 expression in colorectal cancer promotes tumor migration and invasion. *Mol Carcinog* 2017;56(1):250–7.
99. Wang Y, Sun J, Wei X, et al. Decrease of miR-622 expression suppresses migration and invasion by targeting regulation of DYRK2 in colorectal cancer cells. *Onco Targets Ther* 2017; 10:1091–100.
100. Lu J, Xie Z, Xiao Z, et al. The expression and function of miR-622 in a variety of tumors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 146:112544.
101. Zhong M, Bian Z, Wu Z. miR-30a Suppresses Cell Migration and Invasion Through Downregulation of PIK3CD in Colorectal Carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2013;31(2–3):209–18.
102. Liao WT, Ye YP, Zhang NJ, et al. MicroRNA-30b functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting KRAS, PIK3CD and BCL2. *J Pathol*,2014;232(4):415–27.
103. Ahadi A. The significance of microRNA deregulation in colorectal cancer development and the clinical uses as a diagnostic and prognostic biomarker and therapeutic agent. *Noncoding RNA Res*. 2020;5(3):125–34.
104. Luo X, He X, Liu X, Zhong L, Hu W. miR-96-5p Suppresses the Progression of Nasopharyngeal Carcinoma by Targeting CDK1. *Onco Targets Ther* 2020;13:7467.
105. Xu K, Yan X, Ouyang G, et al. Upregulated miR-96-5p inhibits cell proliferation by targeting HBEGF in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line. *Folia Histochem Cytobiol* 2020;58(3):219–26.
106. Yan L, Wu K, Du F, et al. miR-384 suppressed renal cell carcinoma cell proliferation and migration through targeting RAB23. *J Cell Biochem* 2019;120(2):1420–6.
107. Wang F. miR-384 targets metadherin gene to suppress growth, migration, and invasion of gastric cancer cells. *J Int Med Res*,2019;47(2):926–35
108. Kim MK, Jung SB, Kim JS, et al. Expression of microRNA miR-126 and miR-200c is associated with prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Virchows Archiv* 2014;465(4):463–71.
109. Kan CWS, Hahn MA, Gard GB, et al. Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 2012;12.
110. Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut* 2013;62(9):1315–26.

TEŞEKKÜR

Tez hazırlık sürecim boyunca bilgisini, tecrübelerini ve desteğini esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Doç.Dr.Adem DELİGÖNÜL'e,

Asistanlık eğitimim süresince engin bilgi, görgü ve tecrübeleri ile ufkumu genişleten, hekimliğime katkı sunan tüm değerli İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı hocalarıma ve yan dal uzmanlarıma,

Hayatım boyunca tüm fedakarlıkları ve özverileri ile her daim yanımda olan, maddi-manevi hiçbir desteği esirgemeyen ve bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan anneme, babama, abime, Tuğba'ya ve kıymetlilerim Halil İbrahim ile Hümeysra'ya,

Sonsuz şükranlarım sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

yılında doğdum. İlk ve ortaöğretimi Akhisar Cumhuriyet İlköğretim Okulu'nda okudum. Lise eğitimimi Akhisar Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladım. 2012 yılında Tokat Gaziosman Paşa Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni kazandım. 2012-2018 yılları arasında tıp eğitimimi tamamladım. Mezuniyet sonrasında 6 ay Manisa Gölarmara Devlet Hastanesi'nde pratisyen olarak çalıştıktan sonra istifa ettim. Tıpta uzmanlık sınavına hazırlanıp tercih sürecinden sonra 2.kez 4 ay kadar Muş Devlet Hastanesi'nde pratisyen olarak çalıştım.

Temmuz 2020'de Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım.