



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLOREKTAL KANSERDE PERİTONEAL
KARSİNOMATOZİSE VE KARACİĞER
METASTAZINA ETKİ EDEN HÜCRE İÇİ
SİNYAL YOLAKLARI VE MİKRORNA
EXPRESYONUN İLİŞKİSİ**

MEHMET AZİRET

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MUSTAFA DUMAN**

**MOLEKÜLER ONKOLOJİ ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER ONKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ
EYLÜL/2023**

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

(İmza)

Mehmet Aziret

22/09/2023

İTHAF

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Moleküler Onkoloji Bilim Dalında “Kolorektal kanserde peritoneal karsinomatозise ve karaciğer metastazına etki eden hücre içi sinyal yolakları ve mikroRNA ekspresyonun ilişkisi “ başlıklı doktora tezimi yetişmemde büyük katkıları olan Annem, Babam ve Eşime” ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Moleküler Onkoloji doktora eğitimimde ve tezimi hazırlarken bana her türlü desteği fazlasıyla veren değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Duman'a, tezimin pratik kısmında sağladığı imkanlardan dolayı Prof. Dr. Erdal Polat'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Gamze Güney Eskiler'e, Patoloji Kliniği uzman doktor Uz. Dr. Gözde Çakırsoy Çakar'a verdikleri desteklerden dolayı minnertalığımı sunarım.

Hayatım boyunca bana destek olan, sevgili eşim Zeynep'e; güzel kızım Elif Dilara'ya, oğlum Ömer Selim'e ve diğer tüm aile bireylerine teşekkürler ederim.

Doktora tezi için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projelerinden (BAP onay numarası; 2021/105) proje desteği alınmıştır.

Doç Dr Mehmet Aziret

İstanbul-2023

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ÖZET	xivi
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. KOLON EMBRİYOLOJİSİ	4
2.2. KOLON VE REKTUM ANATOMİSİ.....	4
2.1.1. Kolorektal Arteryal Dolaşım	9
2.1.2. Kolorektal Lenfatik Dolaşım	11
2.3. KOLON FİZYOLOJİSİ VE METABOLİZMASI	12
2.4. KOLOREKTAL KARSİNOM	14
2.4.1. Giriş	14
2.4.2. Epidemiyoloji.....	14
2.4.3. Risk Faktörleri	16
2.4.4. Kolorektal Karsinom Karsinogenezisi.....	17
2.4.4.1. Kromozomal instabilite.....	20
2.4.4.2. Mikrosatellit instabilite	27
2.4.4.3. CpG ada metilatör fenotipi yolu	28
2.4.4.4. Karsinogeneziste önemli rol oynayan genler	29
2.4.5. Karaciğer Metastazı Moleküler Mekanizması	37
2.4.5.1. Epiteyal tümörlerde organotropizm	37
2.4.5.2. Tümör biyolojisi	37
2.4.5.3. İnflamasyon ve tümör çevresi.....	38
2.4.5.4. Tümör hücrelerinin uzak organa taşınması ve bağlanması	39
2.4.6. Peritoneal Karsinomatozis moleküler mekanizması.....	42
2.4.7. MikroRNA'lara Genel Bakış	50
2.4.7.1. MiRNA oluşumu.....	50
2.4.7.2. MiRNA ve kanser	51
2.4.7.3. Tümör supressör miRNA'lar	52

2.4.7.4. Onkojenik miRNA'lar	53
2.4.7.5. MiRNA'ların KRK progresyonu ve metastazındaki ayrıntılı rolleri	55
2.4.7.6. Güvenilir biyobelirteçler olarak miRNA'lar.....	62
2.4.8. Kolorektal Kanseri Tanı ve Tarama.....	64
2.4.9. Kolorektal Kanseri Histopatoloji	66
2.4.10. Evreleme	68
2.4.11. Laboratuvar	69
2.4.12. Kolorektal Kanseri Tedavisi	70
2.4.12.1. Cerrahi tedavi.....	70
2.4.12.2. Primer hastalıkta sistemik tedavi	71
2.4.12.3. Metastatik hastalık	73
2.4.12.4. Peritoneal karsinomatozis yönetimi	75
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	77
3.1. HASTALAR VE ETİK.....	77
3.2. ARAŞTIRMAYA DAHİL EDİLME VE EDİLMEME KRİTERLERİ.....	77
3.3. HİSTOPATOLOJİK ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	78
3.4. HİSTOPATOLOJİK İŞLEMLER.....	78
3.4.1. Işık Mikroskopik Kesitlerin Elde Edilmesi	78
3.4.2. Hematoksilen Eozin Boyama İşlemi.....	79
3.4.3. İmmünohistokimyasal Yöntem.....	79
3.4.3. İmmünohistokimyasal Skoring Sistemi	80
3.5. MUTASYON TANIMLAMA.....	80
3.5.1. Mutasyon Analiz Tekniği	80
3.6. MİRNA ANALİZİ.....	81
3.6.1. Hasta Populasyonu.....	81
3.6.2. Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR.....	81
3.6.2.1. Deparafinizasyon-RNA izolasyonu	82
3.6.2.2. cDNA sentezi	82
3.6.2.3. RT-PCR analizi.....	82
4. BULGULAR.....	85
4.1. KLİNİK ÖZELLİKLER	85
4.2. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	89
4.3. MİRNA EXPRESYON DÜZEYLERİNDE DEĞİŞİMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	89
4.4. SAĞKALIMA ETKİ EDEN FAKTÖRLER	105
5. TARTIŞMA	111
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	116

KAYNAKLAR	118
EK	124



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: KKR'nın gen ekspresyonu ve biyolojik farklılıklar	19
Tablo 2: Peritoneal metastazına moleküler bakış	42
Tablo 2.3: Mirna'lar ve hedefleri	56
Tablo 2.4: Kolon kanseri TNM evrelemesi (8. Edisyon., 2017).....	66
Tablo 2.5: Rektum kanseri TNM evreleme (8. Edisyon., 2017).....	67
Tablo 3.1: RT-PCR karışımın hazırlanışı	80
Tablo 3.2: RT-PCR reaksiyon içeriği	81
Tablo 4.1: Hastaların genel özellikleri.....	83
Tablo 4.2: Hastaların ameliyat öncesi özellikleri	86
Tablo 4.3: Hastaların histopatolojik değerlendirmesi	87
Tablo 4.4: KRAS geni fenotipi ve Akt skorlama sistemi dağılımı	88
Tablo 4.5: AKT geni immunhistokimyasal skorlama sistemi	94
Tablo 4.6: KRAS mutasyon durumuna göre hastaların özellikleri.....	95
Tablo 4.7: Gruplar arası klinik ve patolojik verilerin değerlendirmesi	96
Tablo 4.8: KKR, PK ve KCM'li dokuların normal dokuyla kıyaslamaları	98
Tablo 4.9: PK ve KCM dokularında tümör doku ile karşılaştırması	100
Tablo 4.10: KRAS açısından olguların miR-99b, miR-135b ve Akt değişimleri.....	101
Tablo 4.11: Genel sağkalım sonuçları miR-99, miR-135 ve akt cut-off noktaları	105
Tablo 4.12: Genel sağkalım üzerinde etkili faktörler ve Cox'un regresyon modeli.....	106

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Kolon ve rektumun anatomisi	7
Şekil 2.2: Kolon ve rektumun arteriyal dolaşımı	11
Şekil 2.3: Cinsiyete göre seçilmiş kanserler için insidans oranlarındaki eğilimler.....	14
Şekil 2.4: Tanıda ırk ve evreye göre seçilmiş kanserler	15
Şekil 2.5: Kolorektal adenokarsinom dizisi için çok aşamalı genetik model.....	20
Şekil 2.6: KRK patogenezinde yer alan moleküler yollar	22
Şekil 2.7: İnvazyon-metastaz kaskadı	44
Şekil 2.8: Peritoneal karsinomatoz gelişimine ayrıntılı bakış	48
Şekil 2.9: KRK gelişimi ve ilerlemesi ile KCM’de yer alan spesifik mirna’lar	49
Şekil 2.10: MiRNA biyogenezi	50
Şekil 2.11: KRK tarafından iletilen eksozomlar	58
Şekil 4.1: Evreye göre yaşın dağılımı (a) ve kutu grafiği (b)	83
Şekil 4.2: Cinsiyete göre evrelerin dağılımı	84
Şekil 4.3: Tümör anatomik tarafı ve yaş özellikleri	84
Şekil 4.4: Tümörün lokalizasyonuna göre kıyaslama	85
Şekil 4.5: Amerikan ortak kanser komitesi’ne göre evreler	87
Şekil 4.6: İmmunohistokimyasal değerlendirmede akt’nin boyanma grade histogramları	88
Şekil 4.7: KRK, PK, karaciğer metastazı ve normal doku akt İHK boyama (a-i)	88
Şekil 4.8: KRK, PK ve karaciğer metastazı dokularında normal dokuya kıyaslamaları.....	96
Şekil 4.9: PK ve karaciğer metastazı dokularında tümör doku ile karşılaştırması.....	97
Şekil 4.10: Hastaların Kaplan-Meier sağkalım eğrisi	101
Şekil 4.11: Kaplan Meier eğrisi ile gruplararası sağkalım analizi	101
Şekil 4.12: Kaplan Meier eğrisi ile farklı akt düzeyleri ileri sağkalım analizi.....	102

Şekil 4.13: Kaplan Meier eğrisi ile farklı KCM akt düzeyleri ile sağkalım analizi analizi	
.....	102



SİMGELER VE KISALTMALAR

Aİİ: : Arteria iliaca interna

AJCC : Amerikan Kanser Ortak Komisyonu

ATP : Adenozin trifosfat

ADP : Adenozin difosfat

APC : Adenomatosis Poliposis Coli

CA19-9 : Karbonhidrat antijen 19-9

CIN : Kromozomal İstabilite

COX-2 : Siklooksigenaz enzimi 2

CEA : Carsinoembriyogenik antijen

CTC : Dolaşımda tümör hücreleri

DCC : Deleted in colorectal cancer

DNA : Deoksiribonükleik Asit

EMT/TEM : Epitelden mezotele transformasyon / Mezotelden epitele transformasyon

EGFR : Epidermal Growth Faktör reseptörü

FN-1 : Fibronektin-1

FOLFOX: Folinik asit, fluorourasil ve oxaliplatin

FOLFIRI: Folinik asit, fluorourasil ve irinotekan

GIST : Gastrointestinal Stromal Tümör

HER : Human epidermal growth faktör reseptör

HIF : Hypoxia-inducible faktör

HNPCC : Herediter nonpoliposis coli

İMV : İnférieur mesenterik ven

IGF-1 : İnsülin growth faktör 1

KRK	: Kolorektal Kanser
KRAS	: Kirsten rat sarcoma
LOH	: Heterozigot kaybı
LFA-1	: Lenfosit işleviyle ilişkili antijen
miRNA	: MikroRNA
MMR	: Missmatch repair
MSI/S	: Mikrosatellit İnstabilite/Stabil
mTOR	: Memeli rapaimisin reseptör kompleksi
MMP	: Matriks metallopeptenaz
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
PK	: Peritoneal karsinomatozis
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
RNA	: Ribonükleik Asit
SMAD4	: Mothers against decapentaplegic homolog
SRC	: Sitoredüktif Cerrahi
SMV	: Süperior mesenterik ven
TME	: Total Mezorektal Eksizyon
TNM	: Tümör derinliği Lenf nodu Metastaz
TP53	: Tümör Protein 53
TSG	: Tümör Supresör Gen
TEX	: Tümör kaynaklı eksozom
VEGF	: Vasküler endotel growth faktör
5-HT4	: 5-Hidroksitriptamin reseptör
µL	: Mikro litre

KOLOREKTAL KANSERDE PERİTONEAL KARSİNOMATOZİSE VE KARACİĞER METASTAZINA ETKİ EDEN HÜCRE İÇİ SİNYAL YOLAKLARI VE MİKRORNA EXPRESYONUN İLİŞKİSİ

ÖZET

Amaç: Kolorektal kansere (KRK) bağlı peritoneal karsinotosis (PK) ve karaciğer metastazlarında (KCM) miR-99b, miR-135b'un analiz edilmesi, KRAS ve Akt genleri gibi hücre içi sinyal yollarının incelenmesi ve elde edilen sonuçların sağkalıma etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya KRK'ya bağlı PK ve KCM'li hastaların malign dokuları ve normal dokuları incelenerek arasındaki farklı yol gen ekspresyonunu değerlendirmek ve bu genlerle ilişkili miRNA'ları belirlemek için toplam 74 hastadan elde edilen verileri kullandık. KCM ve PK gelişen hastaların klinik verileri, KRAS ve Akt geni, miR-99b ve miR-135b seviyeleri ve sağkalıma etki eden faktörler kıyaslandı.

Bulgular: KRK, PK ve KCM'li dokulardaki AKT geni immunhistokimyasal grade sınıflama skoru ve yoğunluk oranı normal dokuya göre daha yüksekti ($P<0,001$). KRK'lı dokularda miR-99b ve miR-135b ekspresyon düzeyi normal dokuya göre arttığı belirlendi ($P<0,05$). Ayrıca, normal dokuya kıyasla PK ve KCM'ye ait dokularda miR-99b ve miR-135b ekspresyon seviyelerinin arttığı görüldü ($P<0,05$). KRK'lı doku ile kıyaslandığında PK ve KCM'de miR-99b ekspresyon düzeyinin azaldığı, miR-135b ekspresyon düzeyinin arttığı analiz edildi. Genel sağkalım üzerinde en fazla belirleyici olan etkenler; ana tümörde miR-99b ($P=0,045$), Akt ($P=0,006$) ve nüks varlığı ($P=0,012$) idi.

Sonuç: KRK'ya bağlı gelişen PK ve KCM'li dokularda yüksek ifade edilen miR-99b, miR-135b ve artmış Akt geni seviyelerinin normal dokuya göre önemli derecede farklı çıkması karsinomatosis ve metastazda önemli rol oynadığını göstermektedir. Primer tümörde miR-99b'in en yüksek iken, karaciğer metastazında düzeyinin düşmesi miR-99b'nin karaciğer metastazını koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan miR-135'nin ana dokuya göre en yüksek peritonda ve karaciğer metastazında tespit edilmesi karsinomatosisi ve metastazı progrese ettiğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akt, Karaciğer Metastazı, Kolorektal Kanser, KRAS, mikroRNA, Peritonitis Karsinomatoza.



THE RELATIONSHIP BETWEEN INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAYS AND MICRORNA EXPRESSION AFFECTING PERITONEAL CARCINOMATOSIS AND LIVER METASTASIS IN COLORECTAL CANCER

ABSTRACT

Aim: To evaluate miR-99b and miR-135b in peritoneal carcinoma (PC) and liver metastases (LVM) associated with CRC and examine intracellular signaling pathways such as KRAS and Akt genes and investigate their effects on survival.

Materials and Methods: The present study examined malignancy and normal tissues from 74 CRC-associated PC and LVM. The KRAS and Akt gene, miR-99b, miR-135b levels, and factors affecting survival were compared in colorectal cancer-associated PC and LVM.

Results: CRC tissue had the highest miR-99b and miR-135b expression levels (**P<0.05**). Moreover, the expression levels of miR-99b and miR-135b increased in PC and LVM when comparing normal tissue (**P<0.05**). On the other hand, the present study stated that the expression level of miR-99b decreased, and the expression level of miR-135b increased in PC and LVM compared to tumor tissue. MiR-99b (**P=0.045**) and Akt (**P=0.006**) in CRC, and recurrence (**P=0.012**) were risk factors affecting the overall survival rate.

Conclusion: The fact that the high levels of miR-99b, miR-135b,, and increased Akt genes, which are highly expressed in primary tumor, PC, and LVM tissues, are significantly different from those in normal tissue, indicates that they play an important role in carcinomatosis and metastasis. While miR-99b is highest in the primary tumor, its decrease in LVM suggests that miR-99b may have a protective effect against LVM. On the other hand, detection of miR-135 in the highest peritoneum and liver metastasis compared to the main tissue suggests that it progresses carcinomatosis and metastasis.

Key Words: Akt, Colorectal cancer, KRAS, Liver metastasis, Micro-RNA, Peritonitis carcinomatosis.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser (K RK), gastrointestinal sistem tümörleri içerisinde en sık görülen kanser türü olup, dünyada en sık görülen üçüncü kanser tipidir (1). Bu hastalarda en önemli ölüm nedeni başta karaciğer, periton, ve akciğer üzere organ metastazlarıdır. Son zamanlara kadar peritona metastaz yapmış kolorektal kanserlerde uygulanan tedavi yöntemleri oldukça kısıtlıydı ve beklenen sağkalım oldukça kısaydı (2). Son yıllarda uygulanmaya başlayan sitoredüktif cerrahi (SRC) ve hipertermik intraperitoneal kemoterapi (HİPEK) uygulamaları; tedavi açısından olumlu sonuçlar elde edilmesi ve uzayan sürviye neden olması nedeniyle gittikçe artan öneme sahip olmaya başlamıştır. Ancak hala kolorektal kanserlerde peritona metastazı ve prognozu gösteren, tüm dünyaca kabul edilmiş bir biyobelirteç mevcut değildir (2,3).

Kanserli hücrelerde genetik ve epigenetik düzeyde oluşan hatalar kontrolsüz hücre bölünmesine yol açar (4,5). 2000’li yıllarda insan genomu projesinin sonuçlandırılması ve yeni nesil dizileme ile mikroarray teknolojilerinin geliştirilmesi kanser oluşum ve gelişim mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli rol oynamıştır (6). Kanser tanısı, kanser moleküler patolojisinin aydınlatılması ve tedavisine yönelik yapılacak araştırmaların önemi, vaka sayısındaki artış nedeniyle daha iyi anlaşılmaktadır. Şimdiye kadar yapılan araştırmaların kanser tedavisine yönelik çok büyük katkısının olduğunun ispatı olarak kanser insidansının 1975’ten günümüze düzenli bir artış oranı göstermesine rağmen mortalitenin düşmesi gösterilebilir. Dolayısıyla, kansere bağlı ölümlerin azaltılabilmesi, kansere yakalanan bireylerin yaşam kalitelerinin artırılması adına kanserin moleküler patolojisinin aydınlatılması büyük önem arz etmektedir (1,2,7).

Peritoneal kanser kolorektal kanserin geç evresinde görülmesine rağmen, sadece az bir hastada senkron ya da metakron karaciğer metastazı ile birlikte peritoneal karsinomatosis (PK) saptanmaktadır. Bu durum, primer K RK’nın moleküler karakteristiğine bağlı sebeplerden dolayı olabildiği varsayılmaktadır (5,8). Metastatik yayılma, K RK’nın ortak bir özelliği olarak kabul edilmektedir. K RK vakalarının yaklaşık %20’si primer tanı anında bile uzak metastaz ile başvurmaktadır (9).

İleri evre K RK tanısı alan hastaların yaklaşık %60’ının 5 yıl içinde uzak metastaz geliştirdiği tahmin edilmektedir (10). Karaciğer metastazları, K RK’daki tüm uzak metastaz yerlerinin yaklaşık üçte birini oluşturur (3,10). Uzak yayılmanın bir başka ygın

bölgesi peritondur ve yaklaşık dört hastadan biri hastalık sırasında periton karsinomatozu geliştirmektedir. Önemli olarak, PK hastalığın geç bir evresini yansıtsa da sadece az sayıda hasta senkron veya metakron hematojen, yani karaciğer metastazı ile başvurmaktadır (3,5).

Mikro-RNA (miRNA, miR), protein kodlayan genlerin ekspresyonunun yarısından çoğunda modülasyonundan sorumlu olan kodlamayan RNA'lardır (11). miRNA'ların en önemli özelliklerinden biri, tek bir miRNA'nın 200'e kadar mRNA'yı hedefleyebilmesi ve farklı miRNA'ların aynı mRNA hedefini modüle edebilmesi gibi çoklu hedef potansiyellerinden oluşur ve kanser ile ilişkisi ortaya konmuştur (12). Heublein ve ark (13), primer tümörün kök hücre özelliklerinin metastaz yolunu yönlendirebileceğini vurgulamıştır (7, 13). Karaciğere yayılacak olan KRK'lar, belirgin bir kök hücre benzeri immüno-fenotip sergilerken, peritona metastaz yapacak olanlarda görülmemektedir (7). Sadece PK gelişen fakat hematojen metastaz gelişmeyen primer KRK vakalarının disseminasyon için gerekli kök hücre özelliklerinden yoksun olduğu varsayılmıştır. Ancak bu fenomen tam olarak aydınlatılamamıştır. Dolayısıyla Heublein ve ark. primer tümör dokusunun miRNA profili, KRK'da senkronik veya metakronik metastatik yayılma yerinin belirlenmesi ile potansiyel olarak ilişkili olan miRNA'ları tanımlamak için kullanılmıştır (13). Sonuç olarak, bahsedilen literatür çalışması, kolorektal kanser primer tümör dokusunun miRNA ekspresyonunun, senkron veya metakron metastatik yayılma yerini tahmin edebileceğini bulmuştur (13). Ayrıca, ilk tanı sırasında veya takip sırasında peritoneal karsinomatoz tanısı konan KRK olgularında hsa-miR-31-5p'nin aşırı eksprese edilebileceği belirlenmiştir (14). Bununla birlikte, miR31'in, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve hematojen metastatik yayılmada önemli bir rol oynadığı bilinen bir kinaz olan c-MET 'in ekspresyonunu bastırdığı gösterilmiştir (15,16).

KRK'ya bağlı PK prognozu mevcut tedavilere rağmen tatmin edici düzeyde değildir. Dolayısıyla, çalışmamızda elde ettiğimiz (MAP Kinaz yolağı mediatörleri KRAS, NRAS, PI3K yolağı ürünleri AKT) ve bunlar ile ilişkili miRNA'lar KRK'ya bağlı peritoneal kanser ve karaciğer kanserinin erken tanısında ve tedavisinde yardımcı olabilecektir. KRK'da peritoneal kanser ve karaciğer metastazındaki ilişkili miRNA'lar değerlendirildi. PK ve karaciğer metastazında miRNA'lar arasında korelasyon olup olmadığı ispatlanmaya çalışıldı. Ayrıca AKT ve miRNA'lar arasında etkileşimin değerlendirilmesi planlandı. Bu şekilde literatüre özgün katkıları sağlayabilecek ve

literatüre yeni aday biyomarker sunulması hedeflendi. Ayrıca bu proje sonuçlarının alınması ile kolorektal kanserin moleküler biyolojisi daha iyi anlaşılmış olacak ve başka projelere de öncülük edilecektir. Aynı zamanda elde edilen sonuçların kullanılmasıyla ileride peritona metastazlı kolorektal kanserlerde tedavi yolları geliştirilebilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

Sağlam cerrahi karar verme ve ameliyat planlaması, sonuçlar ve performansta mükemmelliğin temel taşlarıdır. Patolojik süreç bilgisinin ötesinde, hastalık veya işlev bozukluğundan etkilenen bölgenin anatomisi ve fizyolojisinin derinlemesine anlaşılmasını gerektirirler.

2.1. KOLON EMBRİYOLOJİSİ

Gastrointestinal sistem embriyolojik olarak, tübüler bir yapıya katlanan viseral ve torasik organların ilgili epitelyal ve parankimatöz dokularını oluşturmak üzere ön bağırsak (foregut), orta bağırsak (midgut) ve arka bağırsak (hindgut) olarak farklılaşan endodermden türetilir (17). Kas ve bağ dokusu bileşenleri mezodermden elde edilir. Endodermin her iki ucunda ektoderm ile bağlantıyı sağlamak için füzyon bölgelerinin oluşması gerekir. Sefal ağız ucunda yer alan stomatodeum; kaudat aboral ucunda proctodeum bulunur. Embriyonik midgut, hindgut ve kloak gelişimi gebeliğin dördüncü haftasında başlar. Bu embriyolojik yapıların her biri büyük bir vasküler pedikül tarafından sağlanır ve çevresinde büyür; bunlar daha sonra tamamlanmış anatomide önemli noktalar haline gelir. İnce bağırsak epiteli, apendiks, çıkan kolon ve transvers kolonun proksimal üçte ikisi orta barsaktan köken alır. Midgut'ın vasküler beslenmesi superior mezenterik arteri (SMA) oluşturur. Gebeliğin altıncı haftasında, midgut geçici olarak karın boşluğunun dışında fitiklaşır ve SMA çevresinde saat yönünün tersine 270° döner; daha sonra 10. haftada karın boşluğuna geri döner (18).

Inferior mezenterik arter (İMA), distal transvers kolonun, inen ve sigmoid kolonun, rektum ve proksimal anüsün kaynağı olan hindguta kan beslemesini sağlar. Distal anüs ektodermden köken alır ve kan beslemesini internal pudendal arterden alır. Dentate (dişli) çizgi, endoderm temelli hindgut ile ektodermal anal kanal arasındaki ayrımı işaretler (18).

2.2. KOLON ve REKTUMUN ANATOMİSİ

Kolon yaklaşık 150 cm uzunluğundadır. Bununla birlikte, kolonoskopi sırasında aletin yerleştirme uzunluğu, oryantasyon için oldukça güvenilir bir parametredir ve aynı yer için yerleştirme ve geri çekme sırasında oldukça farklı olabilir; bu nedenle,

cerrahi rezeksiyondan önce bir patoloji bölgesinin doğru tanımlanması için daha kesin işaretler veya tatuaj (dövme) gereklidir. Kolon çapı çok değişkendir ancak genellikle çekumda (6 ila 8 cm) en büyüğüdür ve sigmoid kolona (2,5 ila 4,0 cm) doğru olan seyri boyunca azalır. Daha küçük lümen ile birlikte sol taraftaki daha biçimli gaita ve genel olarak daha yüksek bir patoloji (neoplazma, divertikülit) insidansı, sigmoid kolonda sık görülen bir kalın bağırsak tıkanıklığı noktası haline getiren faktörler arasındadır. Koloanal anastomoz için dar bir sigmoid kullanımı yeterli depolama kapasitesinden yoksundur ve yüksek frekanslı bağırsak fonksiyonu ile ilişkilidir (low anterior rezeksiyon sendromu); daha düşük basınçlı bir rezervuar oluşturulması (örneğin, bir kolonik J poş aracılığıyla) savunulmaktadır ve ilk 12 ila 24 ayda faydalı olduğu kanıtlanabilmektedir. Kolon duvarı beş katmandan oluşur: mukoza, submukoza, muskularis propria, adventisya ve serosa. Klinik bir ortamda, duvar mimarisi en iyi endorektal veya endoskopik ultrasonografi aracılığıyla görüntülenebilir. Beş ayrı katman, eşmerkezli halkalar olarak ayırt edilebilir: arayüz/temas bölgesi (iç beyaz), mukoza ve muskularis mukoza (iç siyah), submukoza (orta beyaz), muskularis propria (dış siyah) ve adventisya/yağ (dış beyaz). En güçlü tabaka submukozadır, bunu belli bir mesafeden takip eden muskularis propria, her ikisi de yeterli gücü sağlamak için herhangi bir bağırsak anastomozuna dahil edilmelidir. Bağırsak duvarına tümör invazyonunun derinliği esastır. T evresi için ve Amerikan Kanser Ortak Komisyonu (AJCC) tarafından TNM sistemine göre kolon kanseri evrelemesinin ayrılmaz bir parçasıdır (18).

İnce bağırsağın aksine, kolorektal mukoza herhangi bir villus oluşturmaz, ancak arka arkaya dizilmiş ve tek sıra silindirik hücrelerle kaplı kriptlerden oluşur. İç içe geçmiş, rektuma doğru sayıları artan, mukus üreten kadeh hücreleridir. 4 ila 8 gün içinde, yeni hücrelerin bazal membranında yapıldığı ve yüzeye göç ettiği sonunda döküldükleri doğal bir hücre döngüsü vardır. Sağlıklı koşullar altında, kriptler arasındaki interstisyum çok incedir ve yalnızca sınırlı sayıda hücre içerir, bunların hiçbirisi polimorfonükleer beyaz kan hücreleri içermemektedir. Tenia coli, haustra ve apendiks epiploikaları kolonun tanımlayıcı özellikleridir. Dış uzunlamasına kas, tüm kolonun ön duvarı boyunca hareket eden üç tenia koliye ayrılır. Tenia apendiks tabanında çekumda birleşir, rektumda genişler ve birleşir. Divertikülit için sigmoid rezeksiyon sırasında, tenyaların yaklaşması, elde edilmesi gereken minimal distal rezeksiyon sınırını işaret eder, aksi takdirde tekrarlayan atak riski çok daha yüksektir. Kolonik haustra, kolonun karakteristik sakküler (keseli) kaba görünümüyle sonuçlanan fonksiyonel segmentasyonlarıdır. Radyolojik

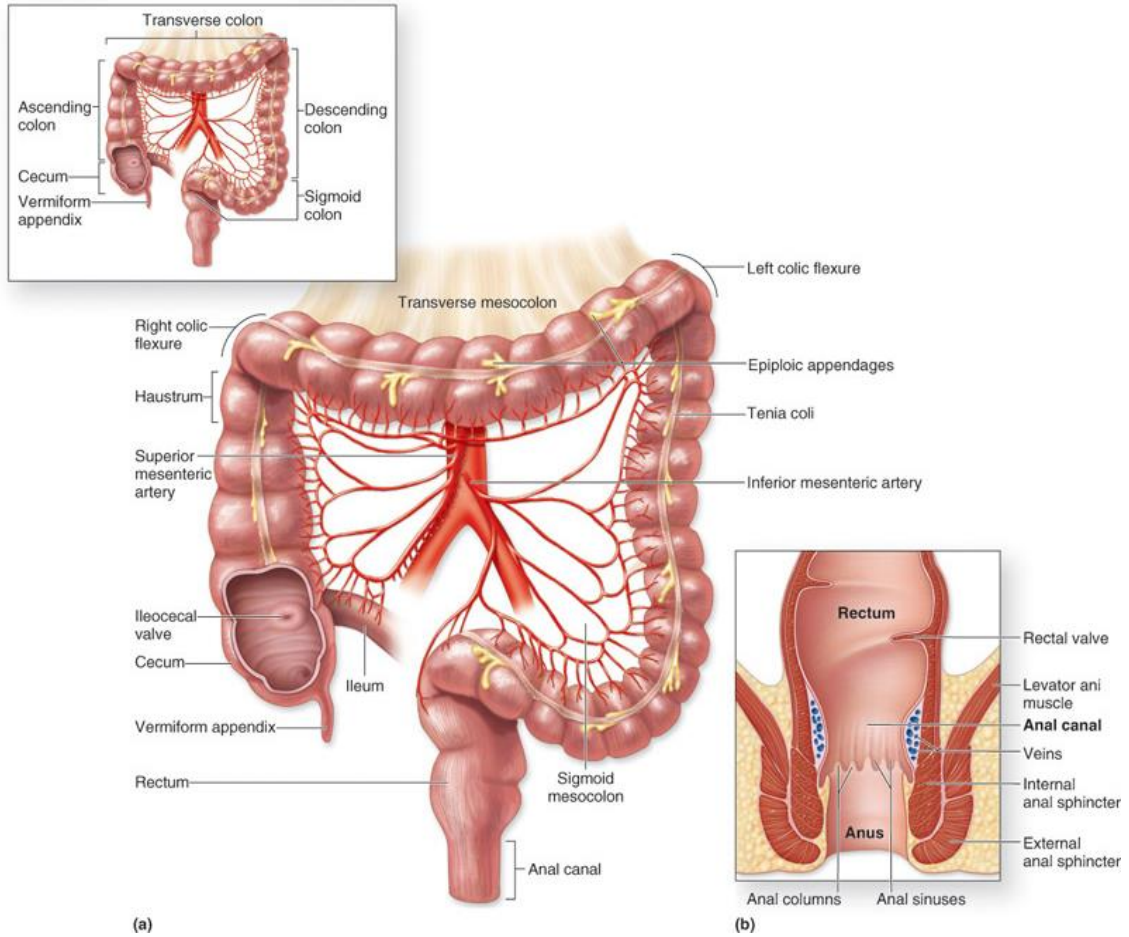
görüntülemeye, kolonun bu hastrasyonu, plika sirkülerleri ve daha az çap varyasyonu gösteren ince bağırsaktan ayırt edilmesini sağlar. Bununla birlikte, kullanılmayan (diversiyon) kolit veya "yanmış" ülseratif kolitin karakteristik olarak haustra kaybına (kurşun boru görünümü) yol açtığına dikkat edilmelidir (18). Dış kolon yüzeyi, seroza kaplı saplı yağ yastıkçıkları olan değişen derecelerde apendiks epiploikalarına sahiptir; bunlar en çok sol kolonda yaygındır ve tamamen intraperitoneal kolon segmentlerinde (transvers ve sigmoid kolon) daha belirgindir ve hastanın vücudunu ve yağ habitusunu yansıtır. Bu apendikslerin iltihaplanması, torsiyonu veya iskemisi (karakteristik olarak orta yaşlı bireylerde) bazen ani başlangıçlı yaygın veya lokal karın ağrısı ile epiploik apandisit ile sonuçlanabilir ve diğer ayırıcı tanılar arasında akut apandisit veya divertikülit taklit edebilir. Bununla birlikte, bilgisayarlı tomografi (BT) bir taramada, hiç veya çok az kolonik duvar kalınlaşması yoktur, ancak karakteristik olarak parakolonik, parakolik yağ bükümlü bir parakolonik, kenarla güçlendirilmiş oval yapı vardır (18). Patoloji, genellikle 5 gün içinde düzelen ve herhangi bir cerrahi müdahale gerektirmeyen, kendi kendini sınırlayan bir süreçtir (Şekil 1) (19).

Rektum, kalın bağırsağın son ve kısmen ekstraperitoneal segmentidir. Periton, rektumun üst 1/3'ünü ön ve lateral yönlerinde kaplar ve öne doğru orta 1/3'e uzanır, alt 1/3'ü ise tipik olarak tamamen ekstraperitonealdır. Rektumun tam uzunluğu çeşitli şekillerde tanımlanmıştır. Eski (çünkü çok değişken) tanımlar, peritoneal refleksiyonun konumunu (bireysel rektumun kendi etrafında değişen ve örneğin rektal prolapsus, tipik olarak pelvik tabanda çok düşüktür veya sakral promontoryum seviyesindedir (rektum harekete geçtiğinde değişir).

Cerrahi bir bakış açısından, kabul edilebilir sadece iki tanım vardır. Sigmoid kolon ile rektumun başlangıcı arasındaki en iyi sınır, üç kolonik tenyanın birleştiği (rektum) noktadır. Bu sadece intraoperatif olarak görüntülenebildiğinden ve tedavi kararları ameliyattan önce verilmesi gerektiğinden ve rektum ile sigmoid/kolon kanserleri için farklı olduğundan, rektum sadece uzunluk ile de tanımlanabilir (17,19).

Lokal olarak ilerlemiş rektum kanserleri, önce cerrahi ile tedavi edilen sigmoid ve diğer kolon kanserlerinin aksine, genellikle neoadjuvan kemoradyoterapi ile tedavi edilir. Bu nedenle Ulusal Kanser Enstitüsü (The National Cancer Institute), rijit sigmoidoskopi ile ölçüldüğü üzere rektumu anal sınırdan 12 ila 15 cm arası olarak tanımlamıştır (23).

Rektum düz bir tüp değildir, ancak retrograd yönde yukarıda posterior bir eğri ile başlar. puborektal askı (anorektal aç), ardından sakrumun içbükey ön yüzeyini buruna doğru takip eder, pelvik girişte keskin bir aç oluşturmadan önce (rektosigmoid aç) enine yönde üç fonksiyonel kıvrımla (Houston valfleri) kesilir (19) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kolon ve rektum anatomisi (19)

Ayrıca, tipik olarak sıkı pelvik tabanın üzerindeki açılar, rektal yabancı cisimlerin uçları anal kanalın ötesine geçtiğinde neden kaybolduklarına ve tipik olarak dışarı çıkmadıklarına dair bir açıklama sağlar: dönerler ve dolayısıyla farklı bir yönde sıkışır. Cerrahiden ve hastalık davranışı perspektifinden bakıldığında, rektal anatomi ile ilgili neredeyse hiçbir şey, doğru bir cerrahi diseksiyonun anatomik işaretlerini temsil eden pelvik fasyaların tam olarak anlaşılması kadar önemli değildir. Bu gergin fibröz doku düzlemleri mezorektal fasya gibi temel pelvik kompartmanları tanımlar. Mezo-rektal fasya (rektumun fasya propriası), rektal neoplazmların yayılması için aşılması olmasa da

önemli bir sınırı temsil eder. Total mezorektal eksizyon (TME) sırasında bu bölmenin bütünlüğünün korunmasının, gelişmiş cerrahi tekniğin ve sonucun kilit unsuru olduğu gösterilmiştir. Kılıfın hasar görmesi, bölme bütünlüğünü bozar ve kanser hücrelerinin ya çıkarılmamış halde kalmasına ya da ameliyatı kontamine etmesine izin verir, dolayısıyla lokal nüks riskini artırır. Amerikan Patologlar Koleji (College of American Pathologists) tarafından belirtildiği gibi, patoloğ, fasyal bütünlük açısından bir rezeksiyon örneğinin kaba görünümünü değerlendirmede önemli bir rol oynar. Endopelvik fasya tüm pelvisi kaplar ve avasküler bir areolar boşlukla ayrılan bir viseral ve bir parietal yapraktan oluşur.

Posterior tarafta, visseral fasya (fasya propria), rezeke edilen örnekte düz, parlak ve simetrik bir görünüme sahip olması gereken ve bilobar yağlı konveksiteye sahip olması gereken mezorektumu sarar. Endopelvik fasyanın parietal tabakası (presakral fasya) sakrumu, orta sakral arteri (aortik bifürkasyonda posterior dalı) ve rektumun mobilizasyonu çok posteriora gerçekleştirilirse potansiyel ciddi pelvik kanama kaynağı olan presakral venleri kapsar (19). İki fasya tabakası koksiksin birkaç santimetre üzerinde birleşir ve Waldeyer fasyasını oluşturur. Rektumun pelvik taban seviyesine tam mobilizasyonu Waldeyer fasyasının rektumun arkasında keskin bir şekilde ayrılmasını gerektirir. Ön tarafta, Denonvilliers fasyası, peritoneal refleksiyonda başlayan ve rektumun önündeki boşluğu sırasıyla prostat/seminal veziküller veya posterior vajinadan ayıran ekstraperitoneal bağ dokusu tabakasıdır (17,19). Lateral düzlemde, rektum bu kadar net bir ayırma tabakası göstermez, ancak hipogastrik ve pelvik sinirleri içeren bağ ve yağ dokusu ile pelvik yan duvarlardan kaynaklanan hipogastrik kan damarları ile çevrilidir. Bir bağın histolojik öğelerine sahip olmamasına rağmen, bu doku- özellikle eski terminolojide- "lateral bağlar" olarak anılırdı. Rektumun üst ve orta seviyesindeki mezorektum önemli bir kesit hacmine sahip olmasına rağmen, pelvik tabana yaklaştıkça distal üçte birlik kısım daralır. Mezorektumun parietal fasya içinde İMA'nın terminal dalları ve sınırlı sayıda lenf nodu vardır; normal şartlar altında, bu lenf düğümleri 4 ila 5 mm'den küçüktür ve tipik olarak kesitsel görüntülemelerde (endorektal ultrasonografi, MRI veya BT gibi) çevreleyen yağdan ayırt edilemez. İnflamasyon ve metastatik hastalık boyutu ve ekojeniteyi artırır. Rektum kanseri için tedavi öncesi evreleme sırasında lenf düğümlerinin (su içeriği) daha fazla saptanabilir olmasını sağlar. Pozitron emisyon tomografisi (PET) hücre metabolizmasında artan aktiviteyi saptayabilir (18F-florodeoksiglukoz (FDG) alımı) ancak genellikle lokal hastalığın değerlendirilmesinden çok uzak metastatik hastalığın saptanması üzerinde daha büyük bir etkiye sahiptir.

Üst ve orta rektumda doğru fasyal tabakaların ve alt kısımda Waldeyer ve Denonvilliers fasyasının belirlenmesi, doğru bir TME gerçekleştirmek için kritik öneme sahiptir. Bu spesmen-odaklı teknik, mezorektal zarfın areolar doku boyunca ve pelvik tabana doğru direkt görüş altında keskin bir şekilde diseksiyonunu içerir, bu sayede bilateral hipogastrik sinirler fasya propriadan hafifçe saptırılır. TME tekniği, 1979'da bu avasküler düzlem olarak adlandırılan Heald tarafından “Kutsal Rektal Cerrahi Düzlemi” olarak mükemmelleştirildi ve desteklendi (20). Radyasyon eklenmeden, bu tekniğin tek başına uygulanması, yerel nüks oranını %28'den %8'e (21) ve İsveç Rektum Kanseri Denemesinin aşağıdakilerin radyasyonun eklenmesiyle elde edebildiğinden daha benzer hatta daha iyi bir büyüklükte düşürdü (radyasyon + cerrahi ile %11, tek başına cerrahi ile %27) (22). Ayrıca, hipogastrik sinirler genellikle görünür ve presakral fasyanın üstünde korunduğu için diseksiyon düzlemlerine saygı gösterilmesi otonom sinirler üzerindeki olumsuz etkiyi en aza indirir, dolayısıyla cinsel ve mesane işlevi üzerindeki olumsuz etkiyi sınırlandırır. Çevresel radyal sınır, rektum kanseri tedavisinden sonra lokal nüks için önemli bir prognostik faktör olarak kabul edilmiştir. Pelvik MRG, bu amaç için tercih edilen görüntüleme aracı olarak gelişmiştir oysa ultrasonografi T düzeyinin değerlendirilmesinde tercih edilmeye devam etmektedir. Tekniklerin hiçbirisi (BT, MRI, ultrasonografi, PET) nodal tutulumu değerlendirmede üstünlük göstermemiştir. PET taramaları, uzak metastazların saptanması ve skar dokusu ile lokal nüks arasındaki farkın saptanmasıyla ilgilidir.

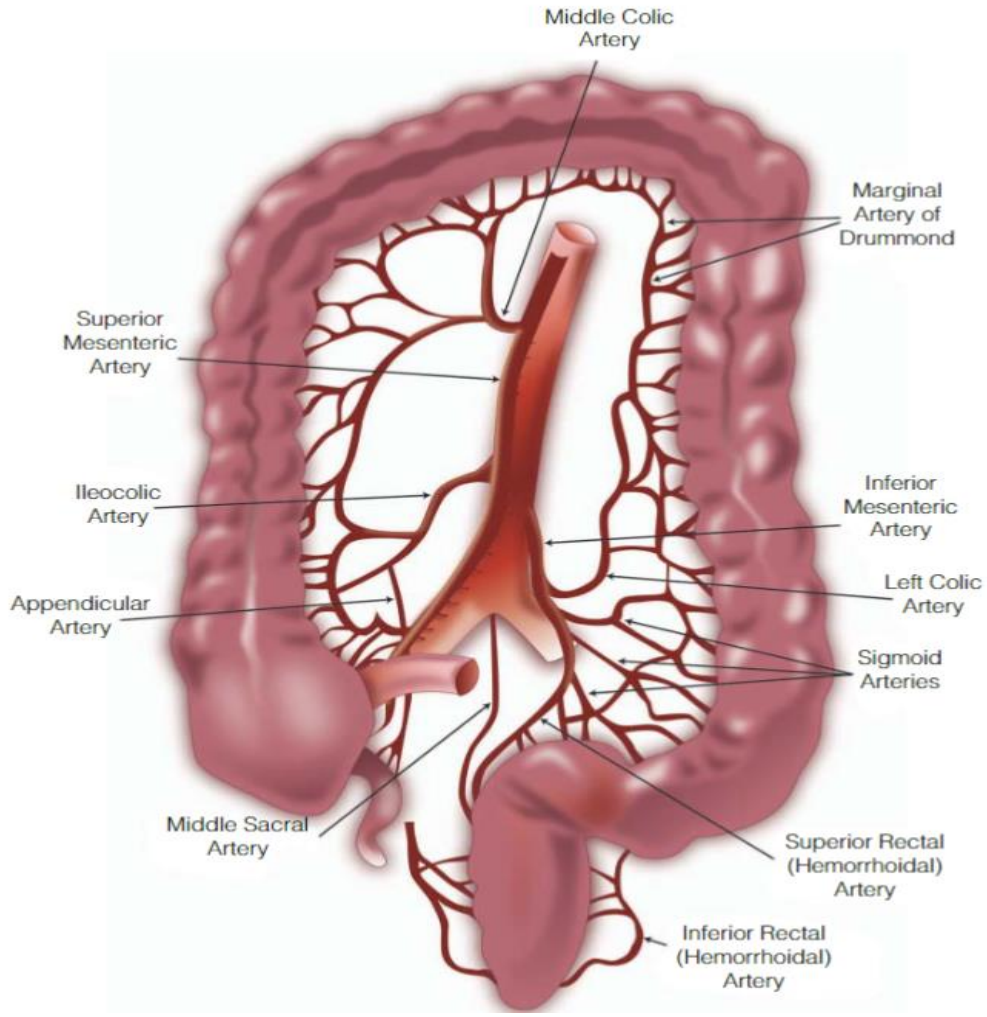
2.2.1. Kolorektal Arteriyel Dolaşım

Kolona kan beslemesi tamamen viseral arterlerden (üst ve alt mezenterik arterler) kaynaklanır ve portal ven sistemine akar (Şekil 2.1). Buna karşılık, rektum ayrıca somatik dolaşımdan ve somatik dolaşıma kan temininin önemli bir bileşenine sahiptir. Embriyoloji bölümünde bahsedildiği gibi, sağ taraftaki kolon, splenik fleksuraya yakın bir “watershed” (su havzası) alanına kadar arteriyel kan akışını SMA'dan alır. Pankreatikoduodenal dallardan sonra, SMA'nın bir sonraki ve ikinci dalı, transvers kolonu besleyen midkolik arterdir, yani paradoksal olarak, daha proksimalde yer alan ince barsak ve sağ taraflı kolon segmentleri SMA'dan daha uzak arteriyel dallara ayrılır. Önemli ölçüde değişkenlik gösteren, SMA'nın kolonik dalları ileokolik arteri (appendiküler arter dahil), sağ kolik arteri ve daha önce bahsedilen orta kolik arteri içerir (17).

İMA, splenik fleksura “watershed” alanından rektuma ve anüsün bir kısmına kadar sol kolonu besler. İMA sol kolik artere (splenik fleksura ve sol kolonu besleyen), rektosigmoid ve proksimal anüse giden superior hemoroidal/rektal artere ayrılır.

Süperior ve inferior mezenterik arter sistemleri, değişken güçte sınırlı sayıda kollateral aracılığıyla bağlanır: Riolan arkı üst ve alt mezenterik arterleri daha merkezi olarak birbirine bağlarken, marjinal arter kolonun kenarına yakın çalışır (19). Nispeten sınırlı kollaterilasyon nedeniyle, “watershed” iki ana arteriyel besleme alanının ara yüzünde bulunur ve iskemik olaylar için karakteristik yerlerdir: en ünlüsü splenik fleksuradadır: Drummond'un marjinal arterinin küçük ve ince olduğu (veya bazen bulunmadığı) SMA ve İMA arasındaki havza alanını yansıtan Griffith noktası'dır. Dar kan akımı nedeniyle splenik fleksurada transvers kolostomi oluşturmamak önemlidir. Tarihsel önemi olan Sudeck, rektosigmoid kavşakta iskekiye yatkın olabilecek kritik bir noktayı (1906) tanımladı; ancak 1956'da Griffith, iki sistem arasında kollateral olduğunu göstererek bunu çürütmüştür (18).

Rektum üçlü bir arteriyel beslenmesi vardır ve bu nedenle iskemiden çok daha az etkilendir. İMA'nın bir dalı olan superior hemoroidal/rektal arter, rektumun ana arteriyel kaynağıdır. Orta ve alt hemoroidal/rektal arterler distal rektuma ve anüse ulaşır. Her ikisi de internal iliak arterden, ya doğrudan (orta) ya da Alcock kanalından (inferior) geçen internal pudendal arter yoluyla dolaylı olarak köken alırlar. Periferdeki venöz harita arteriyel beslemeyi takip eder, ancak viseral kan akışı portal sistem yoluyla karaciğere yönlendirildiği için merkezi olarak belirgin bir farklılığa sahiptir. İnferior mezenterik venin (İMV) seyri İMA'dan farklıdır ve pankreasın alt kenarındaki splenik vene drene olur. Superior mezenterik ven splenik ven ile birleşerek portal veni oluşturur. Rektumun venöz drenajı hem visseral hem de sistemik bir patern izler: süperior hemoroidal ven inferior mezenterik vene akar, orta ve alt hemoroidal venler ise internal iliyak venden inferior vena kavaya ve sistemik dolaşıma akar.



Şekil 2.1. Kolon ve rektumun arteriyal dolaşımı (17)

2.2.2. Kolorektal Lenfatik Dolaşım

Lenf drenajı, ilişkili lenf düğümleri ile birlikte vasküler anatomiye takip eder. Lenfatik pleksus submukozada başlar ve bağırsak duvarının subserozasına kadar uzanır (17). Kanser vasküler veya lenfatik yapılara erişim yoluyla yayıldıkça, bu “kanserli” polipi olan hastaların tedavisi için önemlidir. Bağırsak duvarına kanser invazyonunun derinliği (T evresi), nodal hastalığa sahip olma olasılığı ile doğrudan ilişkilidir. Bir pT1 kanseri (submukozayı istila eder, ancak muskularis propria'yı işgal etmez) %7 ila %10'luk bir lenf nodu metastazı riski taşır. Sapın tabanına ulaşmayan saplı polipteki kanser daha düşük risk taşırken, düz, “kanserli” bir polip hemen lenf damarları seviyesindedir ve uygun risk analizi gerektirir. Sırasıyla parakolik veya mezorektal lenf düğümleri birinci seviyedir; bununla birlikte, lenf nodu seviyeleri sorunsuz bir şekilde paraaortik lenf

nodlarına ve rektum durumunda ayrıca lateral pelvik yan duvar lenf nodlarına geçtiği için kesin bir sınır yoktur (18). Viseral lenf damarları ağı, diğer anatomik bölgelerdeki kadar kesin bir şekilde organize değildir ve bu nedenle daha az tahmin edilebilir. Meme kanseri veya melanom ile ilgili olan sentinel lenf düğümü kavramına ilişkin olarak, bu özel yönün kabul edilemez derecede yüksek bir yanlış negatif oranında yansıtıldığı görülmektedir. Bu nedenle, diğer kanserler için kullanılan metodolojinin kolorektal kanser için herhangi bir çekiş kazanmamış olmasının temel nedenlerinden biridir (20). Onkolojik bir rezeksiyon, tedavi ve prognostik yönler için ilgili lenf düğümlerinin yeterli şekilde çıkarılmasını sağlamalıdır. Tümörün uygun evrelemesini belirlemek için en az 12 lenf nodu (LN) incelenmeli ve rapor edilmelidir (her vasküler segment için). Çok az istisnalar dışında (örneğin, radyasyondan sonra), daha az sayıda LN, yetersiz bir cerrahi veya patoloji analizini temsil edebilir. Her iki eksiklik de sorunludur, çünkü bunlar ya lokal nüks riskini artırır ya da potansiyel olarak tümörün evresinin altında kalır; ek lenf düğümlerinin çıkarılması ve incelenmesi evre göçüne neden olabilir.

2.3. KOLON FİZYOLOJİSİ VE METABOLİZMASI

Kolon, besin maddelerinin emilimine katkıda bulunmaz. İki temel işlevi, vücut atıkları için geçici bir depolama alanı olarak hizmet etmek ve su ve enerjiyi korumaktır. Kolon, suyu ve bazı elektrolitleri (diğerlerinin karşılığında) ve ayrıca kolonositler için enerji taşıyıcılarını emer (23). Kolon, ortalama olarak, terminal ileumdan 600 ila 1.000 mL (bazen 2 L'ye kadar) atık alır ve %60 ila 90'ını yeniden emerek gaitada 100 ila 300 mL su bırakır. Moleküllerin vücudun diğer transmembran translokasyonlarında olduğu gibi, kolonik mekanizma da hücre zarı boyunca bir elektro-kimyasal gradyan ile sonuçlanan iyon konsantrasyonlarındaki pasif veya aktif enerji odaklı farklılıkların bir kombinasyonuna dayanır (23). Kolonositlerin bazolateral tarafında (interstisyel boşluğa ve kan damarlarına yönelik), bir Na^+/K^+ -ATPase pompası potasyum alımıyla aktif olarak sodyumu hücreden dışarı pompalar. Sonuç olarak, kolonositler, barsak lümenine yönlendirilen apikal membranda sodyum iyonları elektrokimyasal gradyanı takip edecek ve sodyum kanallarından hücreye difüze olacak şekilde düşük hücre içi sodyum konsantrasyonunu korurlar. Sodyum hücre içine difüze olurken, su onu takip eder ve dolayısıyla gaitadan emilir (23). Sodyum alımının iki ek mekanizması, Na^+/H^+ ve $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ değişimi ve Cl^- /butirat değişimidir (23). Hayvanlarda, bir Na^+/H^+ ve $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ değişimi, kolonositin apikal yüzeyinde bulunur ve net sodyum emilimini sağlar.

Sodyum ve klorür, HCO_3^- ve H^+ 'nin lümene atılması karşılığında elektrolite özgü kanallar tarafından hücre içine emilir. İnsan hücre fizyolojisinin hayvan modelleriyle karşılaştırılabilir olup olmadığının belirlenmesi gerekecektir. Kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyicisi (CFTR), Cl^- 'nin fizyolojik ve sekretagog kaynaklı sekresyonunda yer alan bir protein kanalıdır. Kistik fibroz hastalarında klorür salgılama yeteneği azalır veya yoktur ve çeşitli organ sistemlerini etkiler. Gastrointestinal sistemde yenidoğanların %10'unda mekonyum-ileus ve ileri yaşlarda mekonyum eşdeğeri ile sonuçlanır.

Cl^- /bütirat değişimi, sodyum emilimini uyardığına inanılan kısa zincirli yağ asitlerine (KZYA'lar) dayanır (17,23). Bütirat ve klorür membran boyunca emilirken bikarbonat salınır. Özellikle aldosteron mevcut olduğunda, lümen atıklarının absorpsiyonu günde 5 ila 6 L'ye kadar arttırılabilir. Aldosteron, artan sodyum/su absorpsiyonuna izin veren kolonosit membranındaki sodyum kanallarının upregülasyonunu uyarır (23). Kolonosit, enerjisinin %60'ını lümen içi bakterilerle simbiyotik bir ilişki içinde lümen içeriğinden alır. Kolon, kolonik metabolizmada (mikrobiyom) temel bir işleve hizmet eden 400'den fazla bakteri türü ile kolonize edilmiştir. Bir gram ıslak gaitada 10^{12} bakteri bulunur. Bakterilerin çoğu anaerobtur, ancak aeroblar, gram pozitif ve gram negatif bakteriler de vardır. Bacteroides kolonda en sık görülen anaerob bakteri ve Escherichia coli kolondaki en yaygın aerob bakteridir. Bu bakteriler, çözünmeyen karbonhidratları fermente ederek, kolonosit için birincil enerji kaynağı olan KZYA 'ları oluşturur. Asetat, propiyonat ve bütirat birincil KZYA 'lardır. Bütirat, kolondaki tüm KZYA 'ların sadece %20'sini oluşturmasına rağmen, kolonosit için ana enerji kaynağıdır (23). Ayrıca, bütiratın kolonik inflamasyonu ve karsinogenezi inhibe ettiği, kolon mukozasında oksidatif hasarı azalttığı ve kolonosit büyümesi ve farklılaşmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (17,23). Fekal diversiyonunun bir sonucu olarak KZYA 'ların yokluğu, mukozal bütünlüğün kaybıyla mukozal bütünlüğün (diversiyon koliti/proktit) azalmasına yol açabilmektedir.

Çok gevşek veya çok sık gaitalama olarak tanımlanan diyare, çeşitli nedenlerle (örneğin bulaşıcı, diyet, toksik, farmakolojik, içsel/enterohumeral, hipermotilite) tetiklenebilir. Bunlar, artan motilite, kolonun tükenmiş emilim kapasitesi (aşırı miktarda ince bağırsak atıklarından dolayı), yetersiz absorpsiyona karşı artan kolonik sekresyon veya fiziksel mukozal gibi bir dizi izole dengesizlik veya daha sıklıkla bunların kombinasyonları ile sonuçlanır (23). Isıya dayanıklı enterotoksinler, transmembranöz

reseptör guanilil siklaz C'yi uyarabilir ve salgısal diyareyi tetikleyebilir. Clostridium difficile'nin toksin üretmeyen filamentleri kommensal kolonik bakterilerdir. Bununla birlikte, toksin A (enterotoksik) ve/veya B (sitotoksik) üreten virulent zincirlerin edinilmesi, asemptomatik taşıyıcıdan morfolojik anormalliği olmayan kronik diyare, psödomembranoz kolit veya ölümcül fulminan kolite kadar geniş bir klinik sunum yelpazesine neden olabilir.

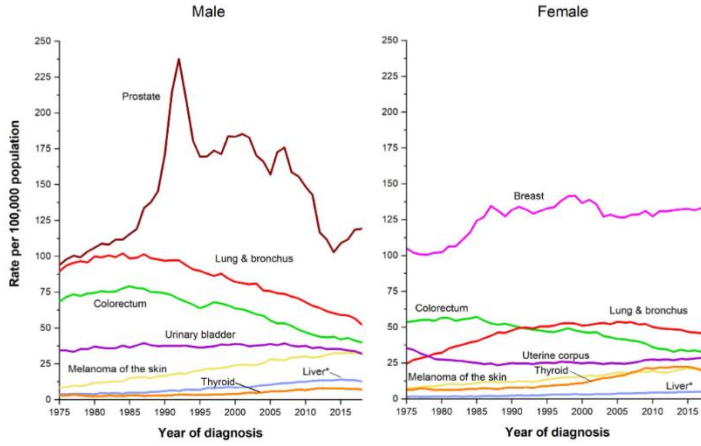
2.4. KOLOREKTAL KARSİNOM

2.4.1. Giriş

KRK teşhisi her yıl 1,2 milyondan fazla hastaya konulmakta ve 600.000'den fazlası bu hastalıktan ölmektedir. İnsidans, küresel olarak büyük ölçüde değişir ve batı yaşam tarzının unsurlarıyla yakından bağlantılıdır. İnsidans cinsiyete göre benzerdir ve yaşla birlikte güçlü bir şekilde artar; ortanca tanı yaşı, gelişmiş ülkelerde yaklaşık 70'tir. Güçlü kalıtsal bileşenlere rağmen, çoğu kolorektal kanser vakası sporadiktir ve adenom-karsinom dizisi boyunca birkaç yıl içinde yavaş gelişir. Tedavinin temel taşları cerrahi, neoadjuvan radyoterapi (rektum kanserli hastalar için) ve adjuvan kemoterapi (evre III/IV ve yüksek riskli evre II kolon kanseri hastalar için). 5 yıllık rölatif sağkalım, evre I hastalığı olan hastalarda %90'dan fazla iken, evre IV hastalığı olan hastalarda %10'dan biraz fazladır. Taramanın kolorektal kanser insidansını ve mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir, ancak çoğu ülkede organize tarama programları hala uygulanmamaktadır (24).

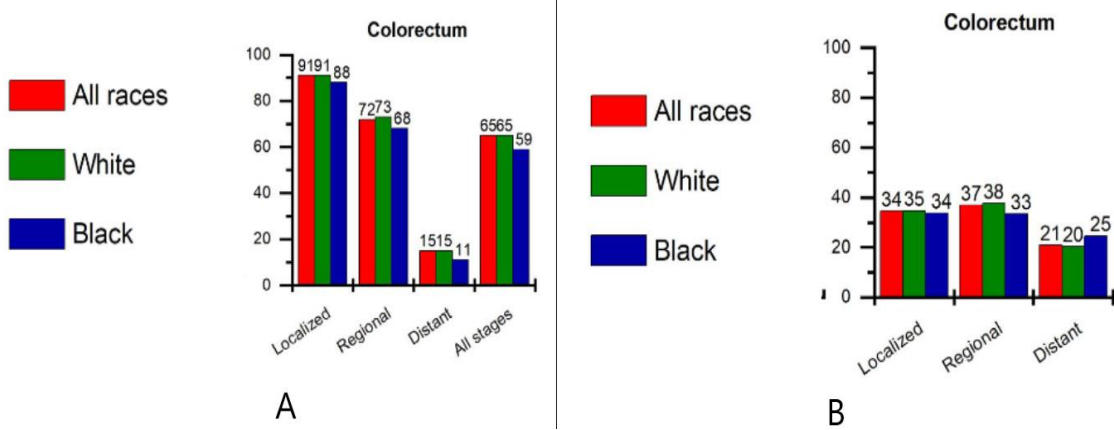
2.4.2. Epidemiyoloji

KRK Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yılda en yaygın üçüncü kanser ve kansere bağlı ölümün üçüncü en yaygın nedenidir. 2014-2019 yıllarında, yıllık insidansı 36,5/100000'dir (Erkek/Bayan 42,1/31,6). Mortalite oranları açısından kabaca 13,4/1000'dir. ABD'deki cinsiyete göre seçilmiş kanserler için insidans oranlarındaki eğilimler Şekil 2.3'de gösterilmiştir (1).



Şekil 2.3. Cinsiyete göre seçilmiş kanserler için insidans oranlarındaki eğilimler, Amerika Birleşik Devletleri, 1975'ten 2018'e kadar. Oranlar, 2000 ABD standart popülasyonuna göre yaşa ve raporlamadaki gecikmelere göre ayarlanmıştır. *Karaciğer, intrahepatik safra kanalını içerir (1).

KRK insidans paternleri cinsiyete göre benzerdir ancak yaşa göre farklılık gösterir; 2014'ten 2018'e kadar olan oranlar 50 yaş ve üzerindeki kişilerde yılda yaklaşık %2 azalırken, 50 yaşından küçük yetişkinlerde yılda %1,5 artar. Tarama çağındaki yetişkinlerdeki düşüşler 1980'lerin ortalarında başladı ve 2000'li yıllarda yaygın kolonoskopi alımının ardından hızlandı. Amerika Birleşik Devletleri'nde ve diğer bazı yüksek gelirli ülkelerde genç erişkinlerde 1990'ların ortalarından bu yana artan insidansın nedenleri bilinmemektedir, ancak büyük olasılıkla 1950 dolaylarında doğan nesillerle başlayan yaşam tarzı maruziyetleriyle ilgilidir. ABD'de tanıda ırk ve evreye göre seçilmiş kanserler için beş yıllık göreceli hayatta kalma Şekil 2.4'de gösterilmiştir (1).



Şekil 2.4. Tanıda ırk ve evreye göre seçilmiş kanserler için beş yıllık göreceli hayatta kalma, amerika birleşik devletleri, 2011-2017. beyaz ve siyah ırk kategorileri hispanik etnik kökene ait değildir (A). Seçilmiş kanserler için ırklara göre evre dağılımı, amerika birleşik devletleri, 2014 - 2018. Beyaz ve siyah ırk kategorileri hispanik etnik kökene göre değildir. Evre kategorileri, tüm vakaları aşamalandırmak için yeterli bilgi bulunmadığından %100'e eşit değildir (1).

2.4.3. Risk Faktörleri

Dünya çapında, KRK'dan muzdarip olma olasılığı yaklaşık %4-5'tir. Ayrıca, birçok kişisel özellik veya alışkanlık, polip veya kolorektal kanser geliştirme şansını artırdığı için risk faktörleri olarak kabul edilir. KRK için ana risk faktörü yaştır: yaşamın beşinci on yılından sonra, KRK geliştirme riski belirgin şekilde artarken, elli yaşın altındaki kolorektal kanserin başlangıcı nadirdir (kalıtsal kanserler dışında) (25). Yaşa ek olarak, değiştirilemeyen başka doğal risk faktörleri de vardır. Kişisel bir kolorektal kanser veya inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) öyküsü olan—ülseratif kolitli hastalarda risk %3,7 (25) artarken, Crohn hastalığından muztarip kişilerde kolorektal kanser geliştirme riski %2,5 daha yüksektir (17) — kolorektal kanser gelişimi için de önemli risklerdir. İBH'de bulunan kronik inflamasyon sıklıkla displazi olarak bilinen anormal hücre büyümesi üretir. Displastik hücreler henüz kötü huylu olmasalar da, anaplastik olma ve tümöre dönüşme şansları daha fazladır. Bu gruba dahil edilebilecek diğer bir risk faktörü, akrabalarda, özellikle tanı anında elli yaşın altındaki akrabalarda pozitif bir aile öyküsünün varlığıdır. Aile öyküsü nedeniyle artan risk, kalıtsal mutasyonlardan veya çevreden kaynaklanabilir (25).

Yaşam tarzı ile ilgili diğer bazı risk faktörleri, diyet ve fiziksel aktivite alışkanlıkları açısından mütevazı yaşam tarzı değişiklikleri uygulanarak azaltılabilir. Örneğin, KKK ve hareketsizlik arasındaki ilişki tam olarak tanımlanmamasına rağmen, hareketsiz bir yaşam tarzının kolorektal kanser geliştirme riskini artırabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, orta düzeyde fiziksel aktivitenin metabolik hızları ve bağırsak hareketliliğini arttırdığı ve uzun vadede metabolik verimliliği artırdığı ve kan basıncını düşürdüğü kanıtlanmıştır (17).

Hareketsiz bir yaşam tarzı, kolorektal kanser için bir başka önemli risk faktörü olan obezite ile de ilişkilidir. Dikkat çekici bir şekilde, bu artan risk hem gıda alımıyla hem de kolon ve rektumdaki inflamatuvar durum, insülin direnci ve adiponektin veya lektin gibi metabolik enzimlerin modülasyonuna neden olarak proinflamatuvar sitokinlerin salgılanması yoluyla kolorektal kanser gelişimini destekleyebilen hormonal olarak aktif bir toplam vücut yağı bileşeni olan visceral yağ dokusunun artan seviyeleriyle bağlantılıdır (17). Bu bağlamda diyet, kolorektal kanser riski ile güçlü bir şekilde bağlantılıdır, öyle ki sağlıksız beslenme alışkanlıkları kolorektal kanser geliştirme şansını %70'e kadar artırır (17). Örneğin, kırmızı et, lipoperoksidasyon yoluyla kanserojen nitrozo bileşiklerinin yanı sıra sitotoksik ve genotoksik aldehitlerin oluşumunu artıran bağırsakta heme gruplarını serbest bırakır ve yüksek sıcaklıklarda pişirilen et, sindirimden sonra potansiyel kanserojen olarak kabul edilen heterosiklik aminler ve polisiklik hidrokarbonlar üretir (25). Ayrıca, sigara ve alkol tüketiminin de KKK riskini arttırdığı gösterilmiştir. Alkol tüketimi durumunda, asetaldehit (etanolün ana metaboliti), alkol metabolizma enzimlerinin polimorfizmlerine bağlı olarak popülasyonlar arasında kolorektal kanser gelişme riskini artırarak kanserojen olarak tanımlanmıştır (17). Ancak, alkol tüketimi ile KKK arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Tütün içimi ise, metabolitleri kolayca bağırsağa ulaşabilen ve polip oluşturabilen nikotin gibi yüksek kanserojen içeriği nedeniyle KKK'dan muzdarip olma şansını %10,8'e kadar artırabilir (17). Sigara içmek KKK riskini artırsa da sigarayı bırakmış olsun ya da olmasın sadece uzun süreli sigara içenler arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (17).

2.4.4. Kolorektal Karsinom Karsinogenezi

KKK, kolon ve rektum olmak üzere iki tür oldukça agresif ve yaygın kanser türünü kapsar. Dünya genelinde kolon kanseri dördüncü en yaygın malignite iken, rektum kanseri sekizinci sırada yer almaktadır (26). Toplu olarak, KKK dünya çapında en sık

teşhis edilen üçüncü kanser türünü sunar ve teşhis edilen tüm kanser vakalarının %11'ini oluşturur (26). Ek olarak, KKK dünya çapında en ölümcül ikinci kanserdir (26).

KKK için iki moleküler patolojik sınıflandırma tanımlanmıştır (27). Kanser Genom Atlası (KGA) projesi ilk olarak KKK'yı entegre moleküler analiz (dizi tabanlı ve dizileme teknolojileri (array)) kullanarak iki gruba ayırdı (27). İlk grup, ya kusurlu uyumsuzluk (mismatch) onarımı (MMR) (~%13) nedeniyle mikrosatellit instabilite (MSI) ya da DNA Polimeraz Epsilon veya Delta 1 (POLE veya POLD1) eksonükleaz alanı (düzeltme okuması) mutasyonları (EDM) (~%3) ile ultra mutasyona uğramış tümörler ile yaklaşık olarak hipermutasyona uğramış tümörlerden (~%16) oluşur. İkinci grup, hipermutasyona uğramamış tümörler (~%84), yüksek sıklıkta DNA somatik kopya sayısı değişiklikleri (SCNA'lar) olan mikrosatellit stabil (MSS) kanserler ve *Adenomatous polipozis koli (APC)*, *Kirsten ras (KRAS)*, *Fosfatidilinositol-4,5- Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Birimi Alfa (PIK3CA)*, *Küçük anneler dekapentaplejik 4 (SMAD4)* ve *Tümör proteini 53 (TP53)* dahil olmak üzere genlerde sık mutasyonlara sahip düzensiz Wnt yolundan oluşuyordu (27).

Öte yandan Guinney ve ark. (2016) (29) 18 farklı KKK kullanarak gen ekspresyonu veri kümelerini topladı ve KKK'nın dört konsensüs moleküler alt tipini (CMS) tanımladı: CMS1 (MSI-immün), CMS2 (kanonik), CMS3 (metabolik) ve CMS4 (mezenkimal) (Tablo 2.1). Amerikan Ortak Kanser Komitesi'ne göre, KKK yayılımının derecesini belirlemek için, KKK evrelemesi tümör-lenf nodu-metastaz (TNM) sistemine göre yapılmaktadır (29).

KKK patogenezi oldukça karmaşık ve çeşitlidir ve sporadik, ailesel ve kalıtsal dahil olmak üzere çeşitli risk faktörleri tarafından indüklenir (29). Sporadik vakalar, KKK vakalarının %70'ini oluşturur ve çevresel ve diyet faktörlerinden (sigara içimi, aşırı alkol tüketimi, hareketsiz yaşam tarzı, obezite ve yağ oranı yüksek ve lif oranı düşük diyetler) oluşur. Ailesel KKK vakaları, vakaların %25'ini oluşturur ve ailede KKK öyküsü olan bireyleri etkiler (29). Son olarak, genetik veya kalıtsal vakalar vakaların sadece %5-10'unu oluşturur ve kolon poliplerinin varlığına veya yokluğuna göre kategorize edilir (29). Polipozisi olan hastalıklar arasında ailesel adenomatöz polipozis (FAP), MUTYH ile ilişkili polipozis (MAP), hamartomatöz polipozis sendromları (Peutz-Jeghers, juvenil polipozis (30) ve Cowden sendromu bulunurken, polipozisi olmayan hastalıklar kalıtsal nonpolipozis KKK (HNPCC); Lynch sendromu mevcuttur. Diğer risk faktörleri, Crohn

hastalığı veya bunun gibi uzun süredir devam eden İBH veya ülseratif kolit gibi mevcut hastalıkların varlığını içerir.

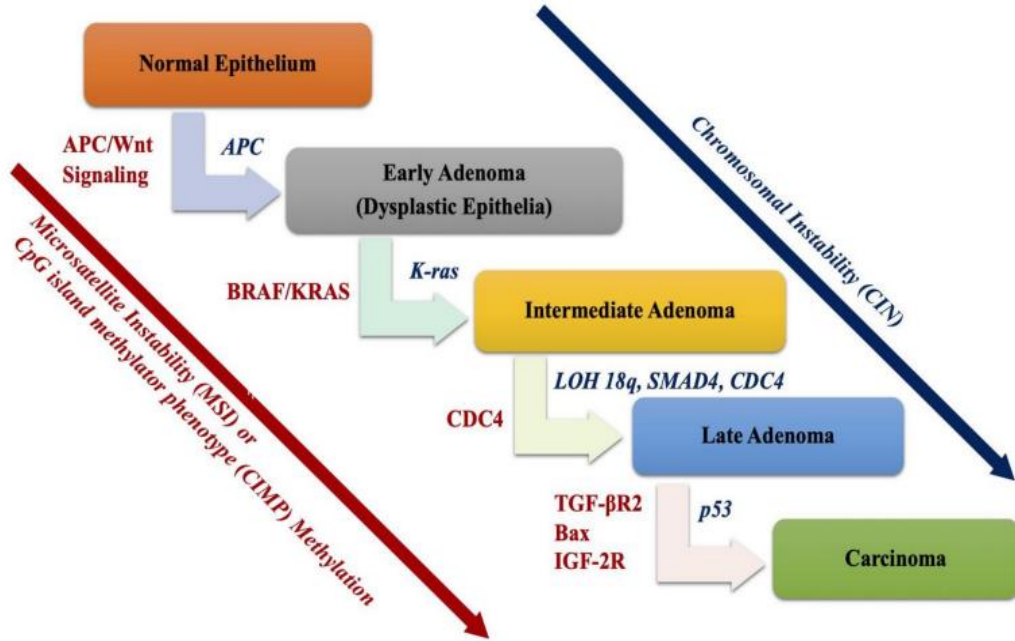
Tablo 2.1. KKR'nın gen ekspresyonuna dayalı moleküler alt tiplerindeki biyolojik farklılıklar (30)

Subtype	Gene Expression	Prognosis	Reference
CMS1 (MSI immune)	- Deregulated DNA mismatch repair, MSI and MLH1 silencing - CIMP-high with common <i>Serine/threonine-protein kinase B-Raf (BRAF)</i> mutations and low number of SCNAs - Immune infiltration and activation	Very poor survival rate after relapse	[4]
CMS2 (Canonical)	- Express epithelial signatures with Wingless (Wnt) and <i>MYC</i> signaling activation - Frequently exhibit loss of TSGs and overexpression of oncogenes than the other subtypes	Better survival rate after relapse in comparison to other subtypes	
CMS3 (Metabolic)	- Fewer SCNAs as compared to CMS2 and CMS4 - Epithelial signatures - Metabolic dysregulation in a variety of pathways with frequent <i>KRAS</i> mutations - Slightly higher presence of CIMP-low	Better survival rate after relapse in comparison to other subtypes	
CMS4 (Mesenchymal)	- Activation of Transforming growth factor-β (TGF-β) - Upregulated expression of EMT genes - Enhanced expression of genes regulating inflammation, matrix remodeling, stromal invasion and angiogenesis	Worse overall and relapse-free survival as compared to other subtypes	

CIMP: CpG island methylator phenotype; EMT: epithelial-mesenchymal transition; MSI: microsatellite instability; SCNA: somatic copy number alterations.

Öte yandan, malign evrelere doğru ilerleyen sağlıklı epitelin neoplastik dönüşümünün başlamasına yol açan olaylarda genetik ve epigenetik değişiklikler rol oynar; 1990'da Fearon ve Vogelstein, KKK oluşumunun genetik paradigmasını tanımladılar (5). Çok aşamalı genetik modellerinde, KKK oluşumu, tümör baskılayıcı gen (TSG)'lerin susturulması ve onkogenlerin aktivasyonu ile ilgili anahtar genlerde birkaç genetik ve epigenetik değişikliğin birikmesi nedeniyle meydana gelir (5,29). Bu bağlamda, KKK oluşumu için iki ana yol tanımlanmıştır. Birinci yol, TSG ekspresyonunu ve APC'yi inhibe etmeyi içerir. Bu, tüm KKK'nın %85'ini oluşturur ve FAP'li hastaların germ hattında mutasyona uğrar. Diğer yol, MMR'de (MSH2, MLH1 ve PMS2) yer alan proteinlerin mutasyonel inaktivasyonu yoluyla ve tüm sporadik vakaların ve HNPCC

sendromunun yaklaşık %15'ini oluşturur (5,29). Farklı yollar, farklı genetik instabilite modelleri, müteakip klinik belirtiler ve patolojik özellikler ile karakterize edilir. Bununla birlikte, KRK vakalarının çoğu, geniş bir heterozigot kaybı (LOH) ve büyük kromozomal anormallikler ile karakterize edilen kromozomal kararsızlık (CIN) yolunu takip eder (29).



Şekil 2.5. Kolorektal adenokarsinom dizisi için çok aşamalı genetik model (31). Adenokarsinom dizisini düzenleyen üç yol vardır: kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilite (MSI) ve CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) hipermetilasyonu.

Sonuç olarak; KRK'ların çoğu, adenokarsinoma dönüşen adenoma gibi öncü lezyonlardan kaynaklanır. Üç moleküler karsinogenez yolu tanımlanmıştır; (1) kromozomal instabilite, (2) mikrosatellit instabilite ve (3) CpG adası metilatör fenotipi (CIMP). Prognoz, TNM evresi, tümörün yeri ve histolojik alt tipler dahil olmak üzere birçok faktör tarafından belirlenir (29).

2.4.4.1. Kromozomal instabilite: Kromozomal instabilite veya kararsızlık, kromozomların tamamının veya büyük bölümlerinin kazanımında veya kaybında önemli bir artışı ifade eder ve KRK'da en yaygın olarak meydana gelen genetik kararsızlıktır. CIN, adenokarsinom geçişlerinin yaklaşık %85'inde bulunur (29) ve onkogenlerin aktivasyonu (KRAS ve BRAF), TSG'lerin inaktivasyonu (APC ve TP53) ve kromozom 18'in uzun kolu için heterozigotluk kaybı (18q LOH) ile karakterize edilir ve böylece KRK tümör oluşumunu teşvik eder (30).

Fearon ve Vogelstein (5) tarafından tanımlanan çok aşamalı genetik modele göre, ilk adım APC'nin susturulmasını, ardından adenomatöz aşamada onkojenik KRAS mutasyonlarını ve son olarak, 18q kromozomunun silinmesini ve geçiş sırasında meydana gelen TP53'ün inaktivasyonunu içerir. maligniteye (Şekil 2.5) (5,30). Ek olarak, yakın zamanda, TGF- β R ve PI3KCA'daki genetik anormalliklerin adenokarsinom dizi modelinde rol oynadığı bulunmuştur.

Ayrıca dizi tabanlı karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ve tek nükleotid polimorfizm teknikleri tanımlanmıştır. KRK'daki tüm kromozomal kollarda sıklıkla tekrarlanan birkaç alel kaybı, 1p, 5q, 8p, 17p, 18p, 18q, 20p ve 22q kromozom kollarındaki kayıpları içerir. Öte yandan, kromozomal kazanımlar kromozom 7'de ve kromozomal kollar 1q, 8q, 12q, 13q ve 20q'da tanımlanmıştır. Malzemenin alelik kaybı veya kazanımı, sırasıyla aday TSG'lerin veya onkogenlerin varlığını gösterir, böylece mutasyona uğramış hücrelerin büyümesine izin vererek normal hücrelerin kanserli hale dönüşmesine yol açar (29).

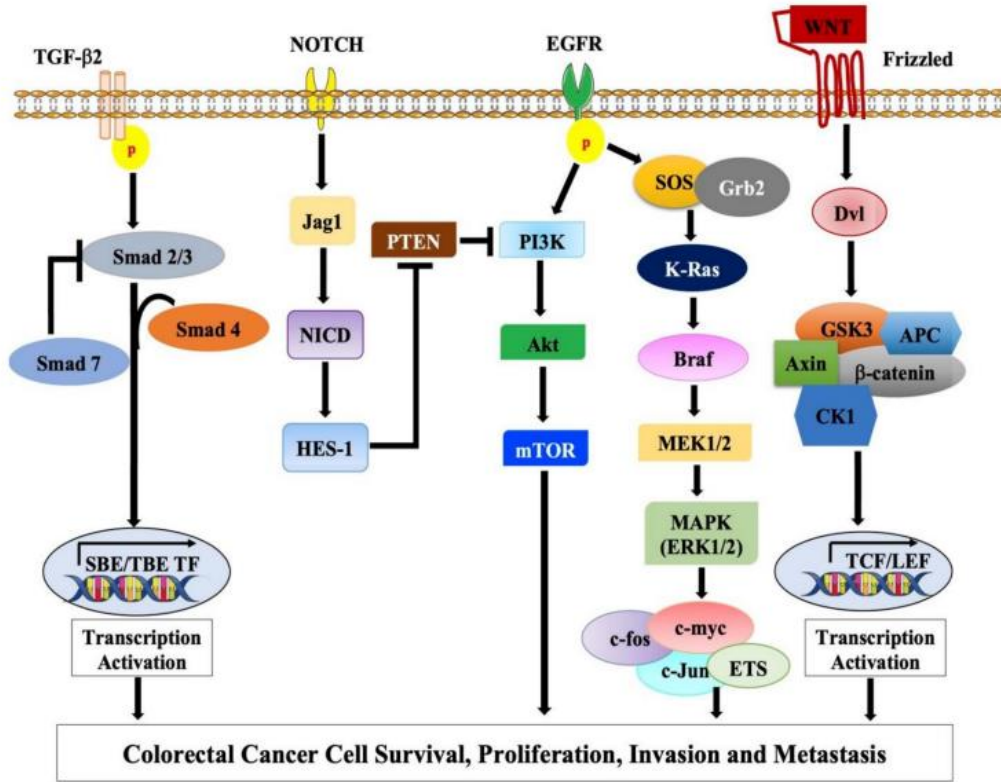
2.4.4.1.1. Mitojen aktive protein kinaz yolağı: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), ErbB/HER ailesine aittir ve dört üyeden oluşur; ErbB1 (EGFR/HER1), ErbB2 (Neu/HER2), ErbB3 (HER3) ve ErbB4 (HER4) (29). EGFR yolunun aktivasyonu, hücre büyümesi, hayatta kalma ve göçü düzenlemek için RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT ve JAK/STAT3 yolları dahil olmak üzere birkaç hücre aşağı akış sinyal yolunu tetikler. Düzensiz EGFR ekspresyonu, KRK dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde mevcuttur; artmış EGFR ekspresyonu, KRK kanserlerinin %25-77'sinde mevcuttur (29). EGFR'nin aktivasyonu, mitojenle aktive olan protein kinazın (MAPK veya MEK) fosforilasyonuna ve hücre dışı sinyalle ilişkili kinazın (ERK) aktivasyonuna yol açan RAS-RAF aktivasyonunu indükler (31).

MAPK yolu, KRAS ve BRAF'ı içerir; RAS/RAF/MAPK yolu hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz ve yaşlanmanın düzenlenmesinde rol oynar. MAPK aktivasyonu, RAS, RAF ve MEK'i içerir; RAS, fosfoinositol kinazlar (PI3K) ve ayrıca RAF aracılığıyla sinyalleşme kaskadını uyarır. PI3K aktivasyonu apoptozu inhibe eder, RAS aktivasyonu hücre proliferasyonu tetikler, böylece hücre sağkalımını ve tümör invazyonu ve metastazı teşvik eder. KRAS mutasyonları, ekson 2 üzerindeki kodon 12 ve 13 ve ekson 3 üzerindeki kodon 61'i; kodon 12, aspartat (p.G12D ve p.G13D) dahil olmak üzere, missense (yanlış anlamlı) mutasyonlardan (31) en sık etkilenendir ve p.G13D vakaların %58'ini oluşturur. KRAS, NRAS ve HRAS ile birlikte RAS ailesine ait onkogenlerdir. KRAS yaygın olarak sporadik KRK'larda (%35–45) (31) mutasyona uğrar ve kötü prognozla ilişkilidir (29); adenokarsinom dizisine göre, KRAS mutasyonları PC mutasyonlarından sonra ortaya çıkar (5).

Öte yandan, RAF serin/treonin kinaz ailesinin bir üyesi olan BRAF, RAS-RAF-MAP kinaz yolu yoluyla büyüme sinyallerine verilen hücre tepkileri düzenler. BRAF'taki aktive edici mutasyonlar, metastatik KRK'nın yaklaşık %5-10'unda bulunur, ancak bunlar, KRK'nın Lynch sendromu formlarında nadirdir. Ayrıca, BRAF mutasyonları MSI-H'nin %40'ında ve MSI-L tümörlerinin %4'ünde tanımlanmıştır. BRAF mutasyonlarının çoğu, hotspot nokta mutasyonu V600E'yi (Val600Glu) içerir ve KRK hastalarında kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur.

Yeni kan damarlarının gelişimi olan anjiyogenez, tümör başlangıcı, büyümesi ve metastazında yer alır ve vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF'ler) dahil olmak üzere çeşitli faktörleri içerir. KRK'da VEGF seviyeleri ve VEGFR aktivitesi artar ve kötü

prognoz ile ilişkilidir. Yüksek VEGF seviyeleri, kolorektal neoplazinin (adenom) çok erken evrelerinde görülür; bununla birlikte, kanserin sonraki bir evresinde (metastatik evre) önemli ölçüde yükselmiştir. Aberrant KRAS ve TP53'ün yanı sıra COX-2 ekspresyonu, VEGF-VEGFR aktivite değişikliğini düzenler, böylece kanser büyümesini ve göçünü teşvik eder. KRK'nın patogenezinde yer alan moleküler yollar şekil 2.6'da gösterilmektedir.



Şekil 2.6. KRK'nın patogenezinde yer alan moleküler yollar (29)

2.4.4.1.2. Fosfatidilinositol 3-kinaz yolağı: Fosfatidilinositol 3-kinazlar (PI3K), ilk olarak 1985'te keşfedilen ve üç grupta sınıflandırılan bir enzim ailesidir (33). Sınıf I PI3K'ler en iyi karakterize edilenlerdir; metabolizma, inflamasyon, hücre motilitesi, kanser progresyonu ve hücre farklılaşması da dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerdeki rolleri göz önüne alındığında kanserle ilişkilendirilmiştir (32). PI3K'ler, büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar dahil olmak üzere bir dizi uyaran tarafından, EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) ve PDGFR (trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü) içeren reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler) gibi çeşitli membran reseptörleri yoluyla aktive edilebilir. PI3K'nın aşağı akışında (downstream), AKT (diğer

adı protein kinaz B veya PKB) PI3K tarafından aktive edilir. Başlangıçta hücre içi sinyallemenin bir bileşeni olarak tanımlanan AKT, memeli rapamisin kompleksi 1'in hedefinin (mTOR, Raptor mLST8 ve PRAS40) 4; ribozomal S6 kinazlar; proapoptotik FOXO proteinleri; NFkB transkripsiyonel aktiviteyi indükleyen IKK; CREB (cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein) hücrenin hayatta kalmasını etkileyen bir hücrel transkripsiyon faktörü; ve apoptozun başlamasında rol oynayan BAD (Bcl-2-ilişkili ölüm promotörü)'dır (34). Bir tümör baskılayıcı gen olan PTEN (fosfataz ve tensin homologu), bu yolu inaktive edebilir ve ayrıca çoklu kanserler ile apoptozis ve hücre döngüsü düzenlenmesindeki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir.

2.5.4.1.3 Adenomatosis poliposis coli geni ve wnt sinyal yolağı: 5q21-q22 kromozomu üzerinde bulunan APC geni, 21 ekzonu kapsayan 8535 nükleotitten oluşur ve 310 kDa'lık bir proteini kodlar (33). Kodlama dizisinin yaklaşık %75'i, APC'nin hem germline hem de somatik mutasyonları için en sık görülen bölge olan ekson 15'te bulunur (33). APC, farklı alanları aracılığıyla çeşitli bağlayıcı proteinlerle etkileşime girdiğinden, APC, kromozom ayrılması, hücre göçü, apoptoz, adezyon, çoğalma ve farklılaşma dahil olmak üzere hücrel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. APC mutasyonları neoplazinin başlangıç evrelerinde mevcuttur ve büyük ölçüde klasik tübüler adenom yolu ve CIN kanserleri ile bağlantılıdır (33). β -katenin kaderinlerle ilişkili sitoplazmik bir moleküldür. Sitoplazmik β -katenin seviyeleri normalde baskılayıcı APC genleri ile bağlantılı genlerin multiprotein kompleksi tarafından kontrol edilir. Bu kompleksin yok edilmesi, β -katenin fosforilasyonu ile sonuçlanır. Wnt sinyal yolu, bu kompleksin bozulmasını etkisiz hale getirerek β -katenin stabilizasyonuna yol açar. Wnt sinyal yolundaki kazanılmış mutasyonlar, bu sinyal yolunun sürekli uyarılmasına neden olur ve kontrolsüz epitel hücre proliferasyonu ile KRK ile sonuçlanır. APC gen mutasyonları KRK vakalarının %80'inde gözlenir ve bu ilk olarak FAP hastalarında tanımlanmıştır. Bununla birlikte, pek çok in vivo çalışma, APC gen inaktivasyonunun adenom gelişimi ile sonuçlandığını ortaya çıkarılmıştır.

APC germ-line mutasyonları, FAP sendromuna, atenü FAP'a, Gardner sendromuna, Turcot sendromuna ve KRK'ya yol açan diğer majör kalıtsal yatkınlık olaylarının geliştirilmesine yol açar. Otozomal dominant bir genetik bozukluk olan FAP, 10-25 yaş arası bireylerde kalın bağırsakta yaklaşık 1000 prekanseröz kolon polipinin gelişmesi ile karakterizedir. Germline mutasyonu FAP'li ailelerin %60-80'inde bulunur

(29). CIN'in FAP'da tümör oluşumunu uyardığı da bilinmektedir. Atenü FAP formu (AFAP), kolonun daha proksimal kısmında 100'den az adenom veya polip ile karakterizedir. Germline mutasyonları, APC geninin 50 veya 30 bölgesinde meydana gelir. Daha da önemlisi, 100'den az polipi olan hastaların %16-40'ı, MUTYH ile ilişkili polipozis olarak adlandırılan bir durum olan MUTYH tabanlı eksizyon onarım geninin bialelik inaktivasyonunu gösterir (29,63). AFAP ve MAP fenotipik olarak birbirine çok benzer. Gardner sendromu FAP'nin alt tipi olup osteomlar ve yumuşak doku tümörleri ile bağlantılıyken, Turcot sendromu, merkezi sinir sistemi tümörleri ile birlikte kolon polipleri ile karakterizedir. Öte yandan, sporadik KRK'ların %70-80'inden fazlasında somatik APC mutasyonları (çerçeve kayması veya anlamsız mutasyonlar) mevcuttur ve KRK vakalarının yaklaşık %40'ında 5q LOH bildirilmektedir.

Hem ailesel hem de sporadik KRK'larda, APC/ β -katenin/Wnt-Tcf yolu, KRK karsinogenezinin başlangıcında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. APC geni, hücre döngüsünün G0/G1'den S fazına geçişi engeller. Wnt sinyal yolu, kolon kriptlerinin tabanındaki farklılaşmamış kök hücreleri koruyarak hem normal hem de kanser kök hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar (29). Bu bağlamda, β -katenin'in Wnt sinyal yolunun ana denetleyicisi olduğu iyi bilinmektedir. Wild tip APC proteini, transkripsiyon faktörü β -katenin'in ubiquitin aracılı proteazomal parçalanmasını düzenleyerek Wnt sinyalini negatif olarak kontrol eder. APC proteininin bozulması, Wnt hedefli genlerin transkripsiyonunu uyaran ve hücre büyümesi, farklılaşması, yayılması ve kolorektal hücrelerin yapışmasında artış ile TCF hedeflerini artıran hücre içi β -katenin stabilizasyonu ile artan Wnt sinyali ile sonuçlanır. APC mutasyonları olmayan KRK hücrelerinde APC/ β -katenin/Tcf yolunda yer alan genlerdeki mutasyonlar da sporadik CIN tümörlerinde mevcuttur. β -katenin (CTNNB1) genindeki aktive edici mutasyonlar, APC tarafından düzenlenen yıkımı bloke eder ve kolorektal neoplazide bulunur. CTNNB1 mutasyonları adenomlarda (%12.5) invaziv kanserden (%1.4) daha yaygın olmasına rağmen, bunlar KRK patogenezinin ön evrelerinde bulunur ve kanser başlangıcı ve ilerlemesinde makul bir şekilde APC mutasyonlarının yerini alır. Ek olarak, APC/ β -katenin/Wnt yolunun farklı birimleri, yapısal olarak β -katenin veya Tcf'yi tetikleyerek doğrudan veya dolaylı olarak değiştirilebilir. APC ile hareket eden farklı düzenleyici genler arasında, mitotik kontrol noktası proteini BubR1 hayati bir rol oynar. BubR1, Bub1, Bub3, Mad1, Mad2, Mad3, Mps-1, CENP-E ve hücre bölünme döngüsü 20 (CDC20) ile birlikte mitotik kontrol noktası makinesinin bir parçasıdır. BubR1'in

Cdc20'ye bağlanması, bir “bekleme anafaz” sinyalini tetikleyerek APC aktivitesini bloke eder, böylece poliploid hücrelerin gelişimine, uzun süreli hücre sağkalımına ve kontrolsüz hücre proliferasyonuna katkıda bulunur ve KRK'nın sporadik formlarında CIN'nin başlangıçta makul bir patojenik mekanizma olduğunu düşündürür (34).

Öte yandan, β -katenin aktivitesi, aktivitesini farklı seviyelerde kontrol eden onkogenlerdeki aberasyonlar tarafından dolaylı olarak tetiklenebilir. β -katenin, hücre farklılaşmasının hayati düzenleyicileri olan ve KRK karsinogenezinde rol oynayan Notch yolunun çeşitli üyeleri ile karşılıklı olarak etkileşime girer. Kwon ve meslektaşları, Notch1'in, ligand-reseptör aktivasyonunun yokluğunda aktif β -katenin proteininin birleşmesini uyardığını gösterdi (35). β -katenin aktivitesini modüle eden diğer genetik değişiklikler, CDK8 (sikline bağımlı kinaz-8) gen amplifikasyonunu içerir ve KRK vakalarının %60'ından fazlasında meydana gelir. Artmış CDK8, hem β -katenin hem de Notch1'i artırır, böylece transkripsiyon ve hücre farklılaşmasını uyarır (29).

2.4.4.1.4. TP53 yolağı: 17. kromozomun kısa kolunda yer alan TP53 geni, “genomun koruyucusu” olarak bilinir ve hücre döngüsü, DNA onarımı, yaşlanma ve apoptozu düzenleyen proteinleri kodlar (36). TP53 mutasyonları veya fonksiyon kaybı, KRK vakalarının %50-75'inde rapor edilmiştir; p53 aracılı apoptoz yollarının kaybı, adenomdan malign tümöre ilerlemenin önemli bir belirleyicisidir. p53 fonksiyon kaybı, kolorektal karsinogenezde önemli bir adım olan yüksek hücre proliferasyon aktivitelerini ve kontrolsüz hücre döngüsünü artırır. KRK'daki en yaygın TP53 mutasyonları olarak GC'nin yerine AT'yi ikame eden yanlış anlamlı mutasyonları (%48) (%48), ardından CpG bölgelerinde geçişli nokta mutasyonlarını (%37.5) göstermiştir (36). P53 ayrıca siklooksijenaz-2 (COX-2) ile etkileşime girer ve inflamasyonu ve KRK hücre proliferasyonunu artırmada rol oynar. İlginç bir şekilde, COX-2-pozitif tümörler, p53 durumundan bağımsız olarak kansere özgü mortalite ile önemli ölçüde bağlantılıdır, bu nedenle COX-2'nin bağımsız bir KRK prognostik faktörü olduğunu düşündürür (36).

2.5.4.1.5. 18q Heterozigotluk kaybı (LOH): Heterozigotluk kaybı (LOH), bir genin iki kopyasından veya alelinden birinin yokluğu anlamına gelir ve kalan alel sıklıkla mutasyondan etkilenir (4). 18q bölgesindeki LOH en yaygın olarak ileri KRK'de gözlenir, vakaların yaklaşık %70'ini oluşturur (37) ve KRK'de kötü prognoz ile ilişkilidir. 18q'de LOH, Kolorektal Karsinomda silinmiş (Deleted in Colorectal Carcinoma) (DCC), SMAD2 ve SMAD4'te dahil olmak üzere birçok TSG'nin varlığını gösterir; 18q LOH ekspresyonunun kaybı, KRK patogenezinde önemli bir rol oynar.

18q21.2 kromozomunda yer alan DCC, netrin-1'i kodlar ve makul bir TSG olarak belirtilir; DCC gen bölgesindeki LOH, KRK'ların yaklaşık %70'inde mevcuttur. Ayrıca, DCC'deki birkaç somatik mutasyon, KRK'da bulunur. Netrin-1, kolorektal mukozanın kriptoları içinde inşa edilmiştir; epitel hücre farklılaşması netrin-1 ekspresyonunun kaybıyla sonuçlanır. Ayrıca DCC genindeki mutasyon, netrin-1'in DCC transmembran proteinine bağlanmasını inhibe ederek anormal hücre sağkalımına yol açar. Öte yandan, SMAD2 ve SMAD4, KRK ilerlemesi sırasında kaybedilen yaygın bölge olan 18q21.1'de mevcuttur ve fare modellerinde adenom gelişimi ve adenokarsinom ilerlemesi ile ilişkilidir, bu nedenle SMAD genleri için makul bir tümör baskılayıcı rolü olduğunu düşündürür (37). Ayrıca, immünohistokimyasal analiz, KRK'ların >%50'sinde, lenf nodu metastazlarıyla ilişkili bir SMAD4 ekspresyonu kaybı bildirmiştir. SMAD2 ve SMAD4'teki somatik mutasyonların sıklığı KRK'da nispeten düşük olduğundan, kromozom 18q kaybından diğer TSG'ler sorumlu olabilir. Araştırmalar, SMAD genlerinin TGF- β 'yı kodladığını göstermiştir. TGF- β sinyalinin düzensizliği, KRK'ların çoğunda meydana gelir. Ek olarak, KRK'da TGF- β R1, TGF- β R2 ve TGF- β süper aile üyeleri Activin Reseptör tip 2 (ACVR2) dahil olmak üzere reseptör genlerindeki inaktive edici mutasyonlar rapor edilmiştir. Fonksiyonel olarak, TGF- β R2'deki belirgin mutasyonlar, tüm KRK vakalarının ~%30'unda mevcuttur ve geç adenomların malign transformasyonu ile ilişkilidir. TGF- β R2 mutasyonları en sık MSI tümörlerinde görülür; bununla birlikte, MSS tümörlerinin yaklaşık %15'inde de bulunurlar (37).

2.4.4.2. Mikrosatellit instabilite: KRK'daki diğer bir genomik instabilite türü, kanserli hücrelerin ayırt edici bir özelliği olan mikrosatellit instabilitedir. MSI, HNPCC veya Lynch sendromunun ayırt edici özelliğidir ve HNPCC vakalarının >%95'inde görülür (37). Bununla birlikte, sporadik KRK'lerin çoğunda, CIN'in altında yatan mekanizma henüz yeni oluşmaya devam etmektedir ve MSI, tüm KRK vakalarının sadece %15-20'sini oluşturmaktadır (37).

DNA mismatch repair system (yanlış eşleşme tamir sistemi), hücrenin DNA hasarlarını onarmak için kullandığı mekanizmalardan biridir. Bu DNA tamir sistemini kodlayan genlerde mutasyon olduğunda DNA yanlış eşleşme tamiri eksikliği gelişir ve mikrosatellit adı verilen yanlış eşleşmiş DNA dizileri birikir. Sonuç, mikrosatellit instabilitedir. MSI kanser hücreleri gibi DNA'larında görünen, bu hücrelerdeki mikrosatellitlerin aynı bireyin normal hücrelerinde var olan DNA'daki tekrarlarından farklılık gösterdiği bir durumdur.

≥%30 belirteçlerinde kararsız lokuslara sahip bir tümör alt kümesi "Mikrosatellit yüksek" (MSI-H) olarak tanımlanır, %10-29 kararsız lokuslara sahip bir tümör alt kümesi "Mikrosatellit düşük" (MSI-L) olarak sınıflandırılır ve "mikrosatellit" (MSS), kararsız işaretleyiciler olmadan işaretlenmiştir (37). MSI-H'li kanserlerde, küçük eklemeler/silmeler, TSG'lerin veya onkogenlerin kodlama bölgelerindeki tekrarlayan yollar içinde çerçeve kayması mutasyonları ile sonuçlanır ve ayrıca tümörigeneze katkıda bulunur. Mori et al. (38) mikro uyduların kodlama bölgesinin geniş ölçekli genomik taraması yaptı ve dokuz lokusta (TGF-βR2, Bax, MSH3, ActRIIB, SEC63, AIM2, NADH-ubikinon oksidoredüktaz, COBLL1 ve EBP1) tümörlerin >%20'sinde mutasyonlar buldu. TGF-βR2 en yaygın mutasyona uğramış lokustur ve TGF-βR2'nin poli-adenin yolundaki kararsızlık MSI-H KRK'ların yaklaşık %85'inde mevcuttur (38). Ayrıca, sıklıkla mutasyona uğrayan diğer gen olan Bax'ın, MSI-H KRK'nın neredeyse %50'sinde poliguanin sekansı içinde çerçeve kayması mutasyonlarına sahip olduğu ve bunun Bax'ın inaktivasyonu ve apoptozun inhibisyonu ile sonuçlandığı bulunmuştur.

MSI, Lynch sendromu dışında poliplerde nadiren bulunur. Ayrıca, Lynch sendromlu bireyler, germ hattı mutasyonları nedeniyle sıklıkla MSI KRK'ları geliştirir. MMR genlerinden birinde (MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2); MLH1 veya MSH2 genindeki mutasyonlar kanser gelişme riskinde artışa (%70-80) yol açarken, MSH6 veya PMS2 genindeki mutasyonlar nispeten daha düşük kanser gelişimi riskine (%25-60)

sahiptir (28) Aksine, sporadik MSI KKR'lar sıklıkla anormal DNA metilasyonu ile MLH1 susturulması nedeniyle MMR aktivitesinde kayıp gösterir (38).

2.4.4.3. CpG ada metilatör fenotipi yolu: Epigenetik kalıtıma, genellikle DNA metilasyonu ve protein metilasyonu ile katkı bulunur. DNA metilasyonu omurgalılarda karakteristik olarak CpG bölgelerinde (Sitozin-Fosfat-Guanin bölgeleri; demek oluyor ki DNA dizilerinde Sitozinin hemen ardından Guaninin geldiği bölgelerdir) bu metilasyondan dolayı Sitozinden 5-metil sitozin oluşmaktadır. CpG dizileri seyrek görülmektedir ancak gen promotör bölgelerinde normalden yüksek oranda görülürler ve toplu olarak bu bölgelere CpG adaları denir. CpG bölgelerinin metilasyonu gen ekspresyonuna büyük etkide bulunur.

Protein metilasyonu karakteristik olarak protein dizisindeki lizin veya arjinin aminoasit kalıntılarındaki yer alır. Daha çok histonlarda çalışılmıştır. Çevrim sonrası bir değişimdir, yani protein translasyonundan sonra kimyasal değişime uğramasıdır.

DNA metilasyonu, CpG transkripsiyonu olarak adlandırılan promotör bölgesi içindeki bir CG dinükleotit sekansı içindeki kovalent bağ yoluyla DNA metiltransferazları tarafından katalize edilen 50 pozisyonundaki sitozine bir metil grubunun eklenmesidir (39). Normal hücrelerde, CpG bölgelerinin çoğu yoğun şekilde metillenirken, genellikle genlerin promotör bölgelerinde bulunan CpG adaları metillenmemiştir. Bununla birlikte, kanser başlangıcını takiben, promotör bölge içindeki hipermetilasyon, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna yol açabilirken, global hipometilasyon, genomik instabilite ve kromozomal anormallikler ile ilişkilidir. KKR'daki epigenetik instabilite, CpG adaları içeren lokusların hipermetilasyonu olarak gösterilir ve buna genellikle global DNA hipometilasyonu eşlik eder. Metilasyon modelindeki değişiklikler, TP53, TGF β /SMAD, Wnt, NOTCH ve hücre döngüsü regülasyonu, transkripsiyon regülasyonu, DNA stabilitesi, apoptoz, hücre-hücre adezyonu, anjiyogenez, hücre invazyonu ve metastazında yer alan reseptör tirozin kinazlar dahil hemen hemen tüm sinyal yollarını etkileyebilir (39).

2.4.4.4. Karsinogeneziste rol oynayan önemli genler:

2.4.4.4.1. Kirsten rat sarkoma (KRAS): RAS, GTPaz adı verilen bir protein sınıfına ait tüm hücre organlarında eksprese edilen bir protein ailesidir ve rolü hücreler içinde sinyalleri iletmektir. Bu sinyaller sonunda hücre proliferasyonunu uyarır. RAS tarafından düzenlenen sinyal yolları, hücre çoğalması, hücre farklılaşması, hücre yapışması, apoptoz ve hücre göçü gibi süreçleri kontrol eder. Mutasyona uğradıklarında, hücrenin invazyon ve metastaz potansiyeli artar. RAS ailesinin ana üyeleri KRAS ve NRAS mutasyonlarıdır (41). Bunlar, tek bir nükleotid bazının bir DNA dizisinden değiştirildiği, eklendiği veya silindiği nokta mutasyonlardır. Ayrıca, bunlar sıklıkla somatik mutasyonlardır (yaşam boyunca edinilir) (41). Metastatik ortamda, KRAS mutasyonları vakaların yaklaşık %40'ında, özellikle ekson 2, kodon 12 (%70-80) ve 13'te (%15–20) oluşur. Farklı KRAS mutasyonları esas olarak ekson 3, kodon 59-61'de ve ekson 4, kodon 117 ve 146'da bulunur. Ekson 2'de mutasyonlar 12. kodonlarda yaygındır: G12D, G12V ve G12C; ekson 3'te, etkilenen kodonlar Q61H ve Q61R iken, ekson 4'te dahil olan kodonlar A146T ve A146V'dur (41).

RAS mutasyonlarının coğrafi dağılımı eşit değildir. Klinik araştırmalarda KRAS mutasyonunun dağılımı Batı Avrupa ülkelerinde %44,7, Doğu Avrupa ülkelerinde %35,8, hastaların %19,5'i Ortadoğu'dandı. Ayrıca, Zekri ve diğerleri tarafından yapılan bir Orta Doğu çalışmada, mutasyonların yüzdesi ülkeye bağlı olarak %13 ila %45 arasında değişmektedir (40). Verilerin çoğu, coğrafi dağılımın, bu tür mutasyonların kodonlarda nasıl konumlandığı konusunda önemli bir faktör olmadığını göstermektedir. Irk dağılımına gelince, bazı araştırmalar Afrikalı-Amerikalı hastaların RAS tümörlerine (%68) Kafkasyalılarından daha sık sahip olduğunu göstermiştir. Bu tür coğrafi ve ırksal farklılıkların genetik arka plandan mı yoksa çevresel ve yaşam tarzı farklılıklarından mı kaynaklandığı açık değildir (40).

Cinsiyetle ilgili olarak, veriler sonuçsuz kalmıştır. Kafatos ve arkadaşları tarafından yapılan bir meta-analizde, RAS mutasyonları erkekler ve kadınlar arasında neredeyse eşit olarak dağılmıştır: erkeklerde %43,8 ve kadınlarda %43,3, ($P=0.006$) (42). Kwak ve diğerleri tarafından yapılan başka bir çalışmada, mutasyonlar kadınlarda erkeklere göre anlamlı derecede daha yüksekti (%46'ya karşı %34,4, $P=0.03$). Kodon 12 mutasyonları kadınlarda erkeklere göre daha yaygındı (%73,4'e karşı %66,2). Aynı çalışmada, KRAS mutasyon alt tiplerinin ortaya çıkışının cinsiyete bağlı olmadığı

($P=0.592$) ve kadınlarda erkeklere karşı kodon 12 ve kodon 13 mutasyonları açısından anlamlı bir fark görülmedi ($P=0.166$, $P=0.122$) (43).

RAS geni ekzonları 2, 3 ve 4'ün tam analizi, bu mutasyonların, eksonlar ve kodonlar üzerindeki tam konumlarına bağlı olarak, belirli tipik klinik, patolojik ve moleküler özelliklerle korele olduğunu ortaya çıkardı. Örneğin, ekson 2 ve kodon 12'nin mutasyonları, iyi/orta derecede farklılaşmış adenokarsinom alt tipi ve müsinöz alt tip ile ilişkilidir.

KRAS mutasyonlu tümörlerin nerede bulunduğu konusunda bulgular tutarsızdır: Bazı çalışmalar KRAS mutasyonunun tümörün yeri ile ilişkili olmadığını gösterirken, diğerleri KRAS mutasyonlu tümörlerin çekum bölgesinde daha sık meydana geldiğini bulmuştur. Bu çalışmalar, klinik ve histolojik veri eksikliğinin yanı sıra retrospektif gözlemsel metodolojileri ile sınırlıdır (43).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), kolorektal kanserde başlama ve ilerlemenin çok önemli bir bileşeni olarak kabul edilir. Membrana bağlı bir reseptör tirozin kinazdır ve reseptörün hücre dışı alanına bağlanan monoklonal antikorlar için önemli bir hedef haline gelmiştir. KRAS durumu, tedaviye rehberlik ettiği için tıbbi onkologlar için kritik öneme sahiptir. KRAS mutasyonları, CRYSTAL ve OPUS denemelerinin sonuçlarıyla doğrulandığı gibi, EGFR biyolojik tedavisine direnç için prediktif (öngörücü) bir özellik olarak kabul edilmiştir.

Bunlar, Cetuximab'ın FOLFOX (bir sonraki sitotoksik ajanlardan oluşan kemoterapi rejimi: Oksaliplatin, 5-Fluorourasil ve Folinik asit) ve FOLFIRI (bir sonraki sitotoksik ajanlardan oluşan kemoterapi rejimi: İrinotekan, 5-Fluorourasil ve Folinik asit) KRAS mutasyonu olan hastalarda faydası yoktur. Bununla birlikte, wild tip (WT) RAS'lı hastalarda, Cetuximab eklenmesi iyileştirilmiş bir prognoz ile sonuçlanmıştır (44). Aynı sonuçlar, COIN, NORDIC veya PRIME gibi yüksek kayıt sayısına sahip klinik çalışmalarda da gösterildi (45). KRAS ile ilgili bir başka öngörücü unsur (prediktif eleman), tümörün yeridir: sol taraftaki KRK tümörleri, anti-EGFR tedavisine daha duyarlıdır. Bunun nedeni, sol taraftaki tümörlerde sağ taraftaki tümörlere kıyasla EGFR sinyalinin daha sık aktivasyonu olabilir (45). Anti-EGFR tedavisinin aksine, Bevacizumabın etkinliği tümörün konumuna bağlı değildir (46). Son veriler, farklı KRAS mutasyonlarının farklı biyolojik etkiler gösterdiğini ve bunların EGFR direnci üzerindeki etkilerinin mutasyonel spektrum boyunca tutarlı olmadığını göstermektedir. Bu nedenle,

KRAS mutasyonlu tüm tümörler EGFR'yi inhibe eden tedaviye dirençli değildir. Bu fenomen muhtemelen tümörlerin heterojenliğinden kaynaklanmaktadır. Sağ kolonda tümörleri olan hastaların daha sık BRAF mutasyonları sergiledikleri ve bunun da anti-EGFR tedavisine göreceli dirençle sonuçlandığı unutulmamalıdır.

KRAS'ın prognostik rolüne ilişkin mevcut veriler yetersizdir. Bir çalışma, metastatik hastalık ile eş anlamlı olan evre IV KKK ile başvuran KRAS mutasyonu olan hastaların, bu mutasyonu olmayan hastalara kıyasla daha yüksek mortalite oranına (%34'e karşı %18.5) ve OS'de azalmaya (23.5 aya karşı 14 ay) sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, KRAS mutasyonunun varlığının sağkalımda azalma için bağımsız bir risk faktörü olduğu bulundu (47).

2.4.4.4.2. NRAS geni: NRAS mutasyonu olan hastalar, klinik ve moleküler açıdan farklı bir mKRR alt grubu oluşturur. KRR'nın %3–5'i NRAS geninin 2, 3 ve 4'üncü ekzonlarında mutasyon gösterir, ancak bu genetik değişikliklerin etkisi, hasta sayısının az olması nedeniyle KRAS ve BRAF mutasyonlarına kıyasla daha az çalışılır (48).

Schiripa ve ark. (48) tarafından yapılan çalışması dahil edilen 785 hastanın %6'sında NRAS mutasyonu buldu. Mevcut literatür, KRAS ve NRAS mutasyonu olan hastaların klinik ve patolojik özelliklerinin benzer olduğunu göstermektedir. Başka bir çalışmada ise olguların %33'ünde proksimal kolonda, %36'sında distal kolonda ve %31'inde rektal düzeyde NRAS mutasyonlu tümör tespit edilmiştir. KRAS ve NRAS mutant tümörleri benzer metastaz paternleri sergiler, yani yayılmaları sıklıkla hepatik, pulmoner ve peritonealdır. Bununla birlikte, bireysel farklılıklar vardır: NRAS mutasyonu olan hastalarda düşük münöz histoloji insidansı (%4'e karşı %26, P=0.012) ve daha az sıklıkta akciğer metastazı (%30'a karşı %35) (48).

NRAS mutasyonu olan hastalar, anti-EGFR tedavisine zayıf yanıt verir. De Rock ve ark. Cetuximab ve kemoterapi ile tedavi edilen bir hasta kohortunda NRAS mutasyonunun rolünü değerlendirdikleri çalışmada (49), hastalardan sadece biri tedaviye yanıt verdiğini bildirdiler. NRAS mutasyonu olan hastaları içeren bir faz II çalışmasında, anti-EGFR tedavisine yanıt vermediği tespit edildi. Panitumumab'ı destek tedaviye karşı test eden bir faz III çalışmasında da benzer sonuçlar elde edildi: NRAS mutasyonu olan hastaların hiçbirisi tedaviye yanıt vermedi (50). Başka bir çalışmada da benzer sonuçlar bulundu: 37 hastadan sadece biri %2,7'lik bir objektif yanıt oranıyla yanıt verdi. NRAS mutasyonu olan hastalarda anti-EGFR tedavisinin etkisizliği göz önüne alındığında,

Avrupa İlaç Ajansı bu hastalarda anti-EGFR ilaçlarının kullanılmasını önermemektedir (48).

mKRR hastalarında biyobelirteç testi klinik uygulamada rutin hale gelmiştir. KRAS ve NRAS'ın öngörücü rolü iyi bilinmesine ve tedavi seçiminde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bu biyobelirteçlerin diğer özellikleri ancak şimdi prospektif çalışmalarda araştırılmaktadır. NRAS mutasyonlu tümörler, azalmış OS ve anti-EGFR tedavisine direnç ile ilişkilidir. Benzer şekilde, mKRR'da bir BRAF mutasyonunun varlığı da anti-EGFR tedavisine direnci tahmin ediyor ve çok kötü prognozlu bir hasta alt grubunu tanımlıyor gibi görünmektedir. Daha yakın zamanlarda, HER2 aşırı ekspresyonu, mKRR hastalarında anti-Her2 tedavisine duyarlılıkla ilişkilendirildi ve MSI/MMR durumunun, kontrol noktası inhibitörlerine tümör yanıtını öngördüğü gösterildi. Tüm bu bilgiler, kanser hastaları için kişiselleştirilmiş tedavilerin belirlenmesine yardımcı olur, böylece genel sağkalımı artırır ve ilaca bağlı toksisiteyi önemli ölçüde azaltır.

2.4.4.4.3. BRAF geni: BRAF, MAP-kinaz (MAPK) yolu aktivasyonunda rol oynar ve hücrel büyüme, proliferasyon ve farklılaşmanın yanı sıra göç, apoptoz ve hücrel hayatta kalma gibi diğer önemli hücrel süreçlere katkıda bulunur. BRAF mutasyonlarının yaklaşık %90'ı ekson 15'te T1799 transversiyonu seviyesinde meydana gelir, bu da glutamik asit (V600E) için valin ikamesine yol açar. Bu ikame fosforilasyonu düzenler, BRAF aktivitesini WT'ye kıyasla yaklaşık on kat artırır (51).

BRAF mutasyonlu KRR hastaları, KRR'dan muzdarip tüm hastaların %8-12'sini oluşturan küçük ve benzersiz bir gruptur (52). BRAF mutasyonunun epidemiyolojisi ile ilgili olarak, birçok çalışma dünya çapında bölgeler arasında sadece küçük farklılıklarla benzer oluşum oranlarını ortaya koymuştur. BRAF mutasyonu, mKRR hastalarında çeşitli klinik ve patolojik parametrelerle bağlantılı olarak birçok çalışmada rapor edilmiştir. 70 yaş üstü kadınlarda ve sağ kolon yerleşimli tümörlerde daha sık görülmektedir. Sol kolon etkilenirse (%4) ve rektum kanserlerinde (%2) BRAF mutasyonları daha az sıklıkta görülür (53). Saldırganlık açısından, BRAF mutant tümörlerinin yaklaşık %60'ı kötü diferansiyedir veya orta derecede farklılaşmıştır ve sadece %36'sı iyi durumdadır. Histolojik olarak, müsinöz alt tip daha sık BRAF mutant kanserleri ile ilişkilidir (%22-67) (54). Kolorektal kanserlerin çoğundan farklı olarak,

BRAF mutasyonlu tümörler peritonda daha sık ve daha az sıklıkla akciğer ve karaciğerde metastaz yapar.

BRAF mutasyonları ile belirli moleküler tümör özellikleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. BRAF ve KRAS mutasyonları birbirini dışlar. BRAF mutasyonu hastaların %13'ünde PIK3CA mutasyonu ve %22'sinde PTEN mutasyonu ile birlikte bulunur.

2.4.4.4.4. AKT geni: Akt bir serin/treonin kinazdır ve PI3K sinyal yolunun anahtar rolüne katılır. Akt, çok çeşitli büyüme sinyalleri ile aktive edilebilir ve Akt aktivasyonuna yol açan biyokimyasal mekanizmalar iyi tanımlanmıştır. Akt aktive edildiğinde, hücresel hayatta kalma, çoğalma, göç, metabolizma ve anjiyogenez ile ilgili birçok aşağı akış proteininin işlevini modüle eder. Akt, birçok sinyal yolunun merkezi bir düğümüdür ve birçok insan kanseri türünde sıklıkla düzensizdir.

Protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen Akt, büyüme faktörü ile indüklenen hücre sağkalımının kritik bir aracısı olan 57-kDa'lık bir serin/treonin kinazdır. Akt'nin hayatta kalma faktörleri tarafından indüklenen aktivasyonu, apoptotik makinenin bileşenlerinin fosforilasyonu ve inaktivasyonu ile transkripsiyondan bağımsız bir şekilde apoptozu baskılayabilir. Memeli genomunda 3 Akt geni tanımlanmıştır (Akt1, Akt2 ve Akt3) ve başlıca Akt izoformu, apoptozu modüle eden Akt1 tarafından kodlanmıştır (55). Bu üç Akt geni, hem mRNA hem de protein seviyelerinde farklı şekilde eksprese edilir ve normal hücre fizyolojisi ve kanser patogenezinde farklı işlevler oynar (55). Akt ailesi proteinleri, substrat proteinlerinin serin veya treonin kalıntılarına özgüllüğü olan bir merkezi kinaz alanı ve lipid-protein ve protein-protein etkileşimlerine aracılık eden amino terminal pleckstrin homoloji (PH) alanı ve karboksil terminali hidrofobik ve prolin açısından zengin alan içerir. Karboksi-terminal kuyruk dışında, Akt'ın birincil yapısı evrim boyunca korunur. Akt'nin aktif işleyişi dört adımı takip eder - hayatta kalma faktörleri tarafından indüksiyon, plazma zarına yer değiştirme, fosforilasyon ve akış aşağı efektörlerin aktivasyonu.

Akt'nin tüm aktivatörlerinin, modülatörlerinin ve downstream efektörlerinin durumu, tümör gelişiminde çok önemli bir rol oynamasına rağmen, anormal Akt aktivasyonunun kendisi oldukça onkojeniktir ve çeşitli insan kanserlerinde gözlenir. Akt'nin aşırı ekspresyonu ve fosforilasyon yoluyla aktivasyonu, çok çeşitli insan kanserlerinde önemli sıklıkta mutasyonla birlikte meydana gelen iki ana olaydır (55). Önemli olarak, Akt1, Akt2 ve Akt3 izoformlarının insan kanserlerinde aşırı eksprese

edildiği bulunmuştur. Akt'nin bu aberasyonlarının tümör gelişimini başlattığına ve birçok kanser türünde geleneksel kemoterapiye direnç kazandırdığına dair artan kanıtlar vardır.

Akt genlerinin (Akt1, Akt2 ve Akt3) amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonunun, kanserlerin bir alt kümesinde yüksek sıklıkta meydana geldiği bulunmuştur. Akt genlerindeki mutasyonlar nadirdir, ancak en yaygın olarak Akt1'de olan Akt gen amplifikasyonu mide, meme, kolon, özofagus, over, pankreas, tiroid kanserleri ve glioblastoma gibi çeşitli kanserlerde daha yüksek oranda ortaya çıkar (56). Over, meme ve pankreas kanserlerinde Akt2 amplifikasyonu bildirilmiştir (57) ve Akt2'nin aşırı ekspresyonu hepatoselüler karsinom tümörlerinde %40 ve KRK'da %57 bildirilmiştir. Meme ve prostat kanserlerinde Akt3 aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir (58). Akt2'nin kolorektal tümörlerde amplifikasyonu, tümör agresifliği ile ilişkiliydi. Akt genlerinin amplifikasyonları, mTOR, MYC, ökaryotik translasyon başlatma faktörü (eIF4E), IKK, siklin D1, CREB, CASP9 ve BAD dahil olmak üzere birkaç aşağı akış efektörünü değiştirir. Akt ayrıca birçok insan kanserinde hiperaktif olmuş gibi görünmektedir, bu da Akt aktivasyonunun kanserin oluşumundaki temel rolünü ima etmektedir.

PI3K/Akt/mTOR ile ilgili mutasyonlar, tüm tümörlerin %29'unda tanımlanabilmiştir (101). Akt PH alanındaki mutasyonlar lipid bağlanmasını artırır, böylece PDK-1'in Akt'yi fosforile etmesi için gerekli olan PIP3 konsantrasyonunu azaltır (57). Yine de Akt genlerindeki mutasyonlar, insan kanserlerinde düşük frekansta bulunur. Akt hiperaktivasyonu ile ilişkili Akt1 mutasyonları, insan kanserlerinin bir alt kümesinde gözlemlendi ve daha sık bildirilen mutasyon, mesane, meme, over, akciğer, pankreas, endometriyal, ürotelyal ve kolorektal kanserlerde tanımlanan bir PH alan mutasyonu E17K'dir. Akt E17K iki önemli özellik gösterir - gelişmiş PI (3,4,5) P3 lipid bağlanması ve Akt ubiquitination, her ikisi de yapısal Akt membran lokalizasyonuna ve anormal onkojenik potansiyel ile sonuçlanan Thr308 fosforilasyonuna yol açar. Akt'nin mutasyon yoluyla aktivasyonu, amplifikasyon, aşırı ekspresyon ve fosforilasyon dahil olmak üzere aktivasyonunun diğer yollarıyla karşılaştırıldığında nadirdir. Yine de, Akt'ın yukarı/aşağı modulatorlerindeki mutasyonlar, Akt'ın onkojenik rolü üzerinde bir etki gösterebilir. PI3K, Ras'ın aktive edici mutasyonları ve PTEN ve p27'nin inaktif edici mutasyonları, potansiyel olarak Akt'yi aktive edebilir ve epitelyal tümörlerin yaklaşık üçte birinde meydana gelebilir.

Akt'nin miRNA aracılı regülasyonu iki tipte kategorize edilebilir - biri Akt'nin 3' UTR'sine bağlanan miRNA'lar aracılığıyla Akt'nin translasyon başlangıcını inhibe ederek inaktivasyonu ile sonuçlanır ve diğeri ise Akt aktivasyonuna yol açan Akt'ın negatif düzenleyicilerini düzenleyen miRNA'lar aracılığıyla. İlk mekanizma kanserde Akt'ın inaktivasyonu ile sonuçlanırken, ikincisi Akt'yi aktive eder. miR-302b, miR302c, miR-302a, miR-302d ve miR-367'yi içeren miR-302-367 kümesini içeren miRNA'lar, 3' UTR'sine bağlanarak doğrudan Akt'yi hedefler (59). Ek olarak, miR-133a gibi büyüme faktörü reseptörlerini hedefleyerek p-Akt seviyelerini dolaylı olarak baskılayan miRNA'lar vardır. miR-133a, Akt'nin upstream aktivatörü olan EGFR'yi hedefleyerek meme kanseri hücre proliferasyonunun negatif düzenleyicisi olarak hizmet eder (60). miR-126, normalde PI3K-Akt sinyal yolunun negatif düzenlenmesini sağlayan p85β'yi hedefleyerek p-Akt seviyelerini önemli ölçüde azaltır (61). Bazı miRNA'lar miR-212 ve miR-758, sırasıyla AQP9 ve PAX6'nın gen ekspresyonunu baskılayarak PI3K, Akt, VEGF ve Bcl-2'nin ifadesini azaltarak genel PI3K/Akt sinyal yolunu etkisiz hale getirir (62).

Akt'nin en belirgin negatif düzenleyicileri, Akt'yi fosforilasyon yeteneğini baskılayarak veya fosfat grubunu çıkararak etkisiz hale getiren PTEN ve PHLPP2'dir. Bu negatif düzenleyiciler, Akt aktivasyonuna yol açan bir dizi miRNA tarafından hedeflenir. Doğrudan 3' UTR'sine bağlanarak PTEN'i baskılayan en çok çalışılan onkogenik miRNA olan miRNA 21'in kanserlerde yukarı regüle olduğu ve Akt'yi aktive ettiği bulunmuştur. Başka bir miRNA, miR-22, doğrudan PTEN'i hedefler ve büyüme faktörü stimülasyonuna yanıt olarak miR-22, PTEN ve Akt arasında bir ileri besleme döngüsü oluşturan Akt tarafından yukarı regüle edilir (63). miR-196-5p ve miR-150-5p, Akt'ın negatif düzenleyicilerinden biri olan PHLPP2'yi hedefleyerek Akt'ı aktive eder (87). miR-182-5p, Akt'nin güçlü bir fosforile edici kinazı olan Ca²⁺/CaMKII, Ca²⁺/CaMK IV'ün bir inhibitörü olan kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II inhibitörü CAMK2N1'i hedefleyerek Akt'yi aktive eder (64).

MiR-101, PTEN'in membran kompleksine alınmasını içeren ve PTEN aktivitesini düzenleyen bir iskele proteini olan MAGI-2'yi hedefleyerek Akt'yi aktive eder. PPP2R2A ve PPP2R1B'yi (protein fosfataz 2A alt birimi B) hedefleyerek miR-222 ve miR-200c, Akt'yi aktive eder.

Akt'nin bazı miRNA'ların modülatörü olarak hareket ettiği gösterildi. Örneğin pAkt, miR-145 ve miR-143'ün baskılanmasında rol oynayan C/EBP-β'yi fosforile eder.

Bu miRNA'ların MDM2'yi hedeflediği ve p53 tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilebileceği gösterildi. Böylece Akt, microRNA-MDM2-p53 feedback döngüsünün bir aracısı olarak hareket eder. Bir başka ilginç miRNA, miR-486, hem PTEN hem de Foxo1'i hedefleyen potansiyel bir Akt sinyalleme modülatörüdür. MiR-486'nın baskılanmasının Akt sinyalini arttırdığı gösterilmiştir.

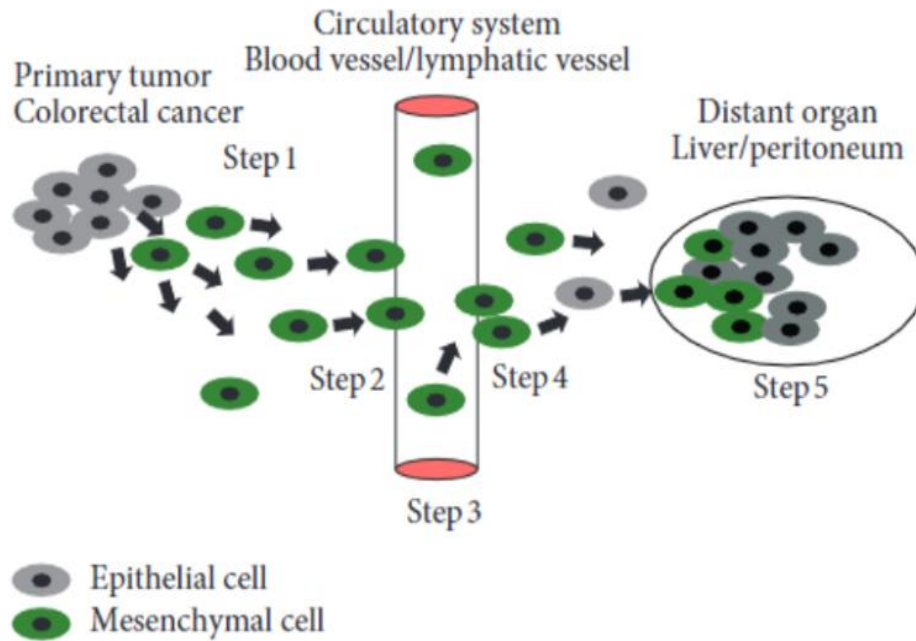
2.4.5. Karaciğer Metastazı Moleküler Mekanizması

Uzak metastazın yaygın yerleri karaciğer ve peritondur. Hastaların yaklaşık %20'si, en yaygın olarak karaciğerde olmak üzere eşzamanlı metastazlarla başvurur ve hastaların %60'a kadarında 5 yıl içinde uzak metastaz gelişir (70). Peritondaki metastazlar, diğer metastatik bölgelere kıyasla daha kötü prognozlu hastaların %25'inde bulunur (70).

Bununla birlikte, peritoneal karsinomatozis, KRK'nin ileri bir aşaması olarak kabul edilse de, metastaz yapmış KRK hastalarının %41-45'inde, peritoneal yayılımın başka uzak metastazlar olmaksızın KRK'nin lokal olarak ilerlemiş bir formu olabileceğini düşündüren tek metastatik hastalık bölgesidir (70).

2.4.5.1. Epitelyal tümörlerde organotropizm: Tümör biyolojisini ve metastaz mekanizmalarını anlamada çok ilerleme kaydedilmiştir, ancak özellikle kolorektal kanserde, tümör hücrelerinin metastatik yolunu etkileyen faktörlerin bilgisi yetersiz kalmaktadır. Meme kanseri ve pankreas kanseri gibi diğer epitelyal tümörler hakkındaki son bulgulardan alınan metastatik organotropizm, farklı kanser hücresi-internal faktörler, tümör mikroçevresi ve bu kanser hücresi-internal faktörler ile tümör mikroçevresi arasındaki etkileşim tarafından düzenlenen rastgele olmayan bir süreçtir (70). Metastatik süreçte çok önemli bir rol oynadığı yakın zamanda keşfedilmiş olmakla birlikte, şimdiye kadar malign epitelyal tümörlerde organotropizm üzerine çok az çalışma bulunmaktadır.

2.4.5.2. Tümör biyolojisi: Tümör hücrelerinin birincil bölgelerinden ayrılarak uzak dokularda yeni koloniler oluşturma süreci, bir invazyon-metastaz kaskadı olarak tanımlanmaktadır (Şekil 10). Bu, beş adımdan oluşan bir süreç: tümör hücrelerinin çevredeki matriks içine lokal invazyonu (Step 1), tümör hücrelerinin dolaşım sistemine intravazasyonu (Step 2), tümör hücrelerinin sistemik taşınması (Step 3), uzak doku bölgelerinin parankimi içine tümör hücrelerinin ekstravazasyonu (Step 4), uzak organların kolonizasyonu ve makroskopik tümörlerin oluşumu (Step 5) (17). Bu adımların bazılarının altında yatan biyoloji henüz tanımlanmamış olsa da, son zamanlarda birkaç mekanizma ortaya çıkmış ve invazyon-metastaz kaskadı teşvikinde önemli roller oynadığı giderek daha fazla kabul görmüştür. Bununla birlikte, hematojen ve peritoneal yayılımı belirleyen mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. İnvazyon-metastaz kaskadı (76): KRK hücrelerinin çevredeki matrikse lokal invazyonu (Adım 1), dolaşım sistemine intravazasyon (kan damarları/lenfatik damarlar) (Adım 2), sistemik taşıma (Adım 3), ekstravazasyon (Adım 4), uzak organların kolonizasyonu (karaciğer/periton) (Adım 5).

2.4.5.3. İnflamasyon ve tümör çevresi: Kansere hücreleri ve mikroçevreleri arasındaki etkileşimin, sadece kolorektal karsinogenezin erken aşamalarında değil, aynı zamanda tümör progresyonu ve metastaz gelişiminde de önemli bir bileşen olduğu düşünülmektedir. Bu pro-tümör mikroçevre, nötrofiller ve makrofajlar, karsinomla ilişkili fibroblastlar (CAF'ler), hipoksi gibi çevresel koşullar, çözünür faktörler, sinyal molekülleri ve ECM bileşenlerini içeren inflamatuvar ve immün hücrelerden oluşur. Tümör hücrelerinin invazyonu, tümör hücrelerinin stroma yoluyla komşu dokulara göçü ve ardından anjiyogenez gerektiren damar sistemine KRK invazyonundaki karaciğer metastazları ile ilgili olarak bazal membranın bozulmasını gerektirir.

Stromal yeniden şekillenme süreci, CAF'lar tarafından salgılanan TGF- β ve PDGF tarafından düzenlenir. Ek olarak, CAF'ler MMP'ler, MMP inhibitörleri, ECM bileşenleri, sitokinler, büyüme faktörleri ve sadece kanser proliferasyonunu ve invazyonunu değil aynı zamanda metastazı da kolaylaştıran EMT'yi teşvik eden faktörleri üretir. Karmaşık bir çözünür faktörler ağı aracılığıyla, makrofajlar, tümör evresine bağlı olarak kritik olarak farklı işlevler uyguladıkları TMO'ya alınır. Erken evrelerde, tümörle ilişkili makrofajların (TAM'ler) çoğunluğu, proinflamatuvar özelliklere sahip olan ve malign hücreleri ortadan kaldırmak için çalışan alt tip 1 (M1) TAM'lerdir; daha sonraki aşamalarda, makrofajlar, tümör büyümesine izin veren bir mikro-ortam yaratan immünosupresif işlevler taşıyan alt tip 2 (M2) TAM'ye geçebilir. ECM'yi bozan bileşenlerin salgılanmasıyla (örn., MMP1, 7, 9, 12) TAM'ler, kanser hücrelerini destekler, stromayı istila eder. Ayrıca, proinflamatuvar M1 makrofajlarının bile EMT'yi desteklediği ve proinflamatuvar faktörleri serbest bırakarak β -katenin/TCF4 yolunu aktive ettiği ve böylece metastatik kaskadı desteklediği gösterilmiştir.

İmmün hücre alımındaki rollerinin yanı sıra sitokinler, malign hücrelerde EMT'yi indüklemek için de hareket edebilir. IL-1 β , ZEB1 aktivasyonu yoluyla EMT'yi, GP130/STAT3 sinyali aracılığıyla IL-11'i ve STAT3 aktivasyonu ve SNAI ifadesi yoluyla IL-6'yı destekler. Tümör baskılayıcı p53'ün IL-6 tarafından aşağı regülasyonu, E-kadherinin azalmasına ve SLUG ekspresyonunun artmasına neden olarak EMT'yi daha da teşvik eder. TGF- β ile indüklenen SNAI ekspresyonu, müteakip CXCR1 aktivasyonu ve PI3K/AKT sinyalleme yoluyla EMT indüksiyonu ile IL8'i aktive edebilir. TNF- α can, EMT'yi doğrudan AKT/GSK-3 β aracılığıyla SNAI stabilizasyonu ile ve dolaylı olarak IL8 ve CXCR1'i artırarak indükler. Smad 4'ün kaybı, yalnızca yukarıda açıklanan sinyal yolları

aracılığıyla EMT'yi desteklemekle kalmaz, aynı zamanda CCR (+) miyeloid hücrelerinin alınmasına yol açan CCL15 ekspresyonunu artırarak da teşvik eder. Bu hücreler daha sonra KRK hücrelerinin stromayı istila etmesine ve MMP9 üreterek karaciğere metastaz yapmasına yardımcı olur (73).

2.4.5.4. Tümör hücrelerinin uzak organa taşınması ve bağlanması:

Hematojen yayılımda trombositler ve nötrofiller, dolaşım sistemine giren tümör hücrelerinin, yani dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler) olarak adlandırılan, onları kaçma stresinden veya doğal öldürücü hücrelerden gelen bağışıklık saldırılarından koruyarak eliminasyondan kaçınmasına yardımcı olur. Trombositlerden salınan TGF- β ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), doğal öldürücü hücrelerin aktivitesini inhibe eder. Fibrinojen ile birleştirilmiş koruyucu pelerinler oluşturarak, trombositler ayrıca kanser hücrelerini doğal öldürücü hücrelerden fiziksel olarak korur.

Kanser hücrelerinde TGF- β ile indüklenen NF- κ B aktivasyonu yoluyla, EMT programı güçlendirilir ve teşvik edilir, böylece CTC'ler bir epitel durumuna geri dönerek ekstrasvazasyon ve metastatik kolonizasyon için gerekli istilacı özelliklerini kaybetmezler. Ekstrasvazasyon, damar sisteminin geçirgenliğini artıran ve dokuya girişi kolaylaştıran trombositlerden ATP salgılanmasıyla da desteklenir (90). Nötrofillerin, tümör hücrelerini kan dolaşımına hapseden nötrofil hücre dışı tuzakları oluşturarak metastatik yayılımı desteklediği, bu şekilde onların endotelial hücrelere yapışmasına, doğal öldürücü hücre saldırılarından kaçınmasına ve ekstrasvazasyona yardımcı olduğu gösterilmiştir (74). Yeni mikro çevreye zayıf adaptasyon nedeniyle, çoğu tümör hücresi ya ekstrasvazasyondan sonra elimine edilir ya da yıllarca uyku hali durumuna girer. Bu hücreler, hipoksi, fibroz, inflamasyon ve ECM bileşenlerinin CAF'lar tarafından üretilmesi gibi mikro-ortamdaki prometastatik değişikliklerle büyümek üzere aktive edilebilir ve bu, kanser hücrelerinin ve bunların mikro-ortamlarının yukarıda tarif edildiği gibi birbirine bağımlılığının altını çizer (74). Peritoneal karsinomatozda anoikisten kaçınmak için kallikrein ile ilişkili peptidazlar (örn., KLK7) aktive edilir ve tümör hücreleri, tümör hücrelerinin kimyasal ve mekanik olarak trombositler tarafından korunduğu hematojen yayılımının aksine kümeler oluşturur ve çoğalmaya devam eder. Ek olarak, KRK hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalar, hücre matrisi ve hücre-hücre temas aracılı adezyonlarda önemli bir rol oynayan bir tirozin kinaz olan Src'nin yukarı regülasyonunun, anoikis'e karşı artan direnç yolu açtığını göstermiştir. Son zamanlarda, odak, peritoneal yayılımdaki ilgili adezyon

moleküllerinin belirlenmesi üzerinde olmuştur ve adezyon moleküllerinin hematojen ve peritoneal yayılım arasında farklılık gösterdiği ve bağlanma süreçlerinde farklılıklar olduğunu düşündürdüğü gösterilmiştir. Hepatik yayılımda, esas olarak karaciğere, KRK'da, hyaluronana CD44 bağlanmasını ve selektinlere bağlanma ve müsinlere bağlanmayı içeren kan grubu antijenleri sLea ve sLex'i içeren hepatik sinüzoidlerdeki endoteliuma yapışma gereklidir (75). Peritoneal karsinomatozdaki önemli adezyon molekülleri arasında integrinler (örn., $\alpha2\beta1$) ve integrin ligandları, proteoglikanlar (örn. CD44), immünoglobulin üst ailesinin üyeleri (örn., ICAM1, VCAM1, L1CAM), yapışma molekülü (EPCAM), müsinler (örn., MUC16) ve epitel hücre bulunur. Metastatik bölgeye göre bu adezyon moleküllerinin her birinin önemi hakkında devam eden bir tartışma vardır. Veriler, kan grubu antijenlerinin yalnızca hematojen yayılımda rol oynadığını, L1CAM ve proteoglikanların ise yalnızca periton yayılımına katkıda bulunduğunu göstermektedir (75). Kesin farklılıklar belirsizliğini korusa da özellikle periton boşluğunda serbest yüzen tümör hücreleri tek başına peritoneal karsinomatozise yol açmadığı için metastatik yayılımda adezyon moleküllerinin önemi konusunda bir anlaşma vardır (75).

Peritona invazyon, tümör hücreleri veya çevreleyen stromal hücreler tarafından salgılanan matris metaloproteazlar (örn., MMP2/7/9) gibi proteolitik enzimler gerektirir. İnvazyondan sonra, tümör hücreleri sadece yeni ortamda hayatta kalmak zorunda değil, aynı zamanda IGF-1 ve HIF1a ve VEGF gibi anjiyogenezi teşvik eden faktörlerle önemli roller oynayan proliferasyonu sürdürmek zorundadır. IGF-1 mRNA'nın, karaciğer metastazlarına kıyasla peritoneal yayılımda aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir.

Yeni biyobelirteçlerin araştırılmasında, karsinogenez ve adezyon gibi çok sayıda süreçte yer alan Src yolu ile ilişkili tip 1 kollajen reseptör tirozin kinaz olan DDR2'nin, mide kanserinde peritoneal karsinomatozisin sürücü geni olduğu belirlendi. KRK'da, yüksek DDR2 ekspresyonu, düşük DDR2 ekspresyonuna kıyasla daha yüksek T4, lenf nodu metastazı, peritoneal yayılım ve daha kötü prognoz ile ilişkilendirildi, bu da DDR2 ekspresyonunun etkili bir terapötik hedef olabileceğini düşündürdü.

2.4.6. Peritoneal Karsinomatozis Moleküler Mekanizması

Periton, insan vücudunun en büyük ve en karmaşık seröz zarıdır. Karın içi organları ve mezenterleri kaplayan visceral periton, karın duvarını ve pelvik boşlukları kaplayan parietal periton ile sürekli bir tabaka oluşturur. Submezotelyum olarak da

adlandırılan bir bağ dokusu tabakasına dayanan bir bazal membran tarafından desteklenen tek bir mezotelyal hücre tabakasından oluşur. Mezotelyum, düzleştirilmiş, gerilmiş, skuamöz benzeri veya küboidal mezotelyal hücrelerden oluşan bir tek tabakadan oluşur. Sonuncusu, karaciğer, dalak, omentumun "milky spots (sütlü noktaları)" ve lenfatik lakunaların üzerindeki diyaframın peritoneal tarafı dahil olmak üzere çeşitli alanlarda bulunabilir (76). Küboidal mezotel hücreleri de yaralanmış bir mezotelyum içinde gözlenir. Hem skuamöz hem de küboidal mezotelyal hücreler, ultrastrüktürel farklılıkları ile ayırt edilebilir. Skuamöz benzeri mezotelyal hücreler, birkaç mitokondri, zayıf gelişmiş bir Golgi aygıtı ve merkezi olarak yuvarlak veya oval çekirdeğin yakınında bulunan küçük kaba endoplazmik retikulum (RER) içerir. Küboidal mezotelyal hücreler, merkezi bir belirgin nükleol, bol miktarda mitokondri ve RER, iyi gelişmiş bir Golgi aygıtı, mikrotübüller ve mikrofilamentler içerir. Mezotel hücrelerinin lümen yüzeyi, şekil, boyut ve yoğunluk bakımından değişen çok sayıda mikrovillusa sahiptir; fonksiyonel mezotel yüzey alanını arttırmak. Kirpikler ayrıca istirahat halindeki mezotelyal hücrelerin yüzeyinde de tanımlanmıştır. Mezotelyum, peritonun yapısal, işlevsel ve homeostatik özelliklerine büyük ölçüde katkıda bulunan dinamik bir katman olarak işlev görür (76). Altta yatan bazal membran, tip I ve IV kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinler içeren ince bir laminer ağıdır ve submezotelyal tabakaya giren makromoleküllere karşı seçici bir bariyer görevi görür. Submezotelyum, farklı tipte kollajen, glikoproteinler, glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlardan oluşan karmaşık bir hücre dışı matris (ECM) ağından oluşur. Kan damarları, lenfatikler ve çeşitli hücre tipleri (fibroblastlar, yerleşik doku makrofajları ve mast hücreleri) de bu katmanda bulunur (77). Peritonun ilk ana işlevi, sıvının ve hücrelerin serozal boşluklar boyunca taşınmasını kolaylaştırmaktır. Mezotel hücrelerinin lümen yüzeyindeki mikrovilluslar, yüzey alanını arttırdıkları ve glikozaminoglikan bakımından zengin glikokalikslerindeki sıvıları bağladıkları ve böylece absorpsiyona yardımcı oldukları için bu süreçte önemli bir rol oynarlar. İkincisi, periton, intrasölomik harekete izin vermek için kaygan ve yapışkan olmayan bir yüzey sağlar. Bu kaygan ve yapışkan olmayan yüzey, her mezotelyal hücre tarafından üretilen fosfat-tidilkolin içeren az miktarda steril sıvının salgılanmasıyla oluşur. Üçüncüsü, periton konak direncinde ilk savunma hattı görevi görür. Peritonun dördüncü işlevi, büyüme faktörlerini serbest bırakarak doku onarımını içerir. Sonuç olarak periton, karın boşluğunun içeriği için yapısal ve koruyucu işlevi olan bir organ olarak düşünülmelidir (77).

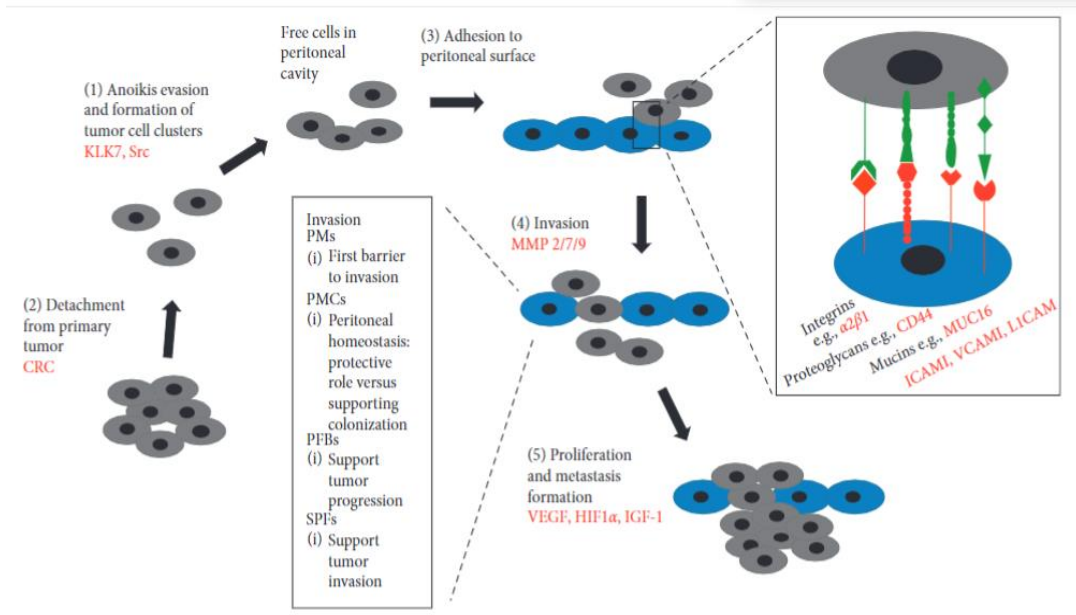
PK'nın ortaya çıkışı, tümör hücreleri ve konakçı elementler arasındaki, iyi tanımlanmış birkaç adımdan oluşan moleküler bir karışmanın sonucudur. İlk olarak, tümör hücrelerinin tek tek veya kümeleri birincil tümörden ayrılır ve periton boşluğuna erişim sağlar. İkinci adımda, bu serbest tümör hücreleri, öngörülebilir yollar boyunca düzenli peritoneal taşınmaya duyarlı hale gelir. Üçüncü adım, dördüncü adım sırasında tümör hücrelerinin subperitoneal boşluğu istila ettiği uzak peritona tutunmayı içerir. Altta yatan bağ dokusu, tümör proliferasyonu için gerekli iskeleyi sağlar. Son adım, tümör proliferasyonunu sürdüren ve daha fazla metastatik büyümeyi mümkün kılan anjiyogenezi içerir (78). “Peritoneal metastatik kaskadı” olarak bilinen bu adımların mutlaka tek başına meydana gelmediğini, aksine sürekli ve birbirine bağlı bir süreci tanımladığını anlamak önemlidir (Tablo 2) (77,78).

Tablo 2.2. Peritoneal metastatik kaskatta yer alan moleküllere/moleküler yola genel bakış (77).

Primer tümörden ayrılma	Spontan tümör hücresi dökülmesi: E-cadherin ↓N-cadherin ↑EMTPC1 ve PC2 ↑ İnterstisyel sıvı basıncı ↑ Ameliyat sırasında tümör hücrelerinin ameliyat sırasında tohumlanması.
Peritoneal transport	Müsinöz asit, Aktin mikrofilament sistemi Lamellipodia, filopodia
Uzak peritona bağlanma	Transmezotelyal yayılma: ICAM-1 ↑, PECAM-1, VCAM-1 ↑TNF-α, IL-1β, IL-6, IFN-γβ1 integrin alt birimi, CD43, CD44 HyaluronanTranslenfatik yayılma: Lenfatik stoma Sütü lekeler
Subperitoneal alana invazyon	Mezotel hücrelerinin yuvarlanması: HGF/SF ↑ c-Met ↑, Mezotelyal tek tabakanın yok edilmesi: Tümör kaynaklı apoptoz Fas ligandı/Fas Bazal membrana yapışma: İntegrinler Periton-kan bariyerinin invazyonu: MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-13, MMP-14 ↑ TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4uPA/uPARplazminojen aktivatörü inhibitör -1 ve -2
Proliferasyon ve anjiyogenez	Proliferasyon: EGFR, EGF, TGFαIGF-1, IGF-Binding Protein-3 Anjiyogenez: HIF-1α, HIF-1β VEGF/VEGFR

2.4.6.1. Primer tümörden hücrelerin ayrılması: Metastatik yol, birincil tümörden bireysel veya tümör hücrelerinin kümelerinin ayrılmasıyla başlar. Bu, bağırsak duvarının tüm kalınlığını ve serozasını istila etmiş olan kanserlerden tümör hücrelerinin spontan pul pul dökülmesinin bir sonucu olabilir (78). Kolon adenokarsinomunun serozal tutulumu (pT4 evresi), PK gelişimi için olumsuz bağımsız bir prognostik belirteçtir (78).

Malign hücrelerin spontan pul pul dökülmesi, tümör hücre yüzeyleri üzerindeki hücre içi yapışma moleküllerinin, daha spesifik olarak E (epitel)-kaderinin aşağı regülasyonu ile desteklenebilir (79). E-kaderin, kaderinlerin tip I alt ailesine aittir. Genel yapı, hücre dışı bir kısım, bir zar kapsayan alan ve bir sitoplazmik kuyruktan oluşur. E-cadherin, Ca^{2+} bağımlı hücre dışı alanları aracılığıyla komşu hücrelerdeki E-cadherin'e homotipik olarak bağlanır. Sitoplazmik kuyruk, aktin hücre iskeleti ile bağlantıdan sorumlu olan ve içeri ve dışarı sinyal iletimine izin veren p120, α , β ve γ katenin ile birleşir (79). E-cadherin ekspresyon seviyelerinin aşağı regülasyonunun, KRK'nın farklılaşması, ilerlemesi ve metastazı ile ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca, E-kaderin kaybıyla hücre-hücre yapışmasının azalması ve mezenkimal N (nöral)-kaderinin yukarı regülasyonu, epitelyalden mezenşim geçişine (EMT) ait yerleşik işaretlerdir. Bu tersine çevrilebilir yeniden programlama işlemi, hücrelerin ayrılmasına, epitel hücrelerine özgü apikobazal polaritelerini kaybetmesine, apoptoza karşı yüksek direnç göstermesine ve daha hareketli bir mezenkimal fenotipe geri dönmesine izin verir. Bunun tümör hücrelerinin invazyonu ve metastazında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Peritoneal karsinomatoz gelişimine ayrıntılı bakış (77): (1) kolorektal kanser hücrelerinin primer tümörlerinden ayrılması ve motilite kazanımı, (2) anoikis kaçağı, (3) periton yüzeyine yapışma, (4) peritona invazyon ve (5) proliferasyon ve peritoneal metastaz oluşumu. İntegrinler, proteoglikanlar, müsinler ve immünoglobulin süper ailesinin üyeleri dahil olmak üzere peritoneal yüzeye yapışma sürecinde çok önemli olduğu birkaç yapışma molekülü tanımlanmıştır. Peritoneal makrofajlar (PM'ler), peritoneal mezotelyal hücreler (PMC'ler) ve peritoneal fibroblastlar (PFB'ler) ve subperitoneal fibroblastlar (SPF'ler) dahil olmak üzere çok sayıda hücre ve faktör istila sürecinde yer alır.

2.4.6.2. Tümör hücrelerinin peritoneal taşınması: Tümör hücreleri birincil tümörden ayrılıp periton boşluğuna ekildikten sonra, düzenli periton taşınımına duyarlı hale gelirler. Önceden, intraperitoneal kanser yayılımının tümörün ve konağın fiziksel ve biyolojik özelliklerinden bağımsız rastgele bir süreç olduğu varsayıldı. Bununla birlikte, birkaç çalışma, gevşek tümör hücrelerinin aldığı yönün ve nihai hedeflerinin, birincil tümörün anatomik bölgesine ve sıvının periton boşluğundan temizlenmesinden sorumlu devam eden sefalik dolaşıma bağlı olduğunu bildirmektedir (82). İkincisi, bağırsağın solunum, yerçekimi ve peristaltizmi sırasında karın içi basıncındaki değişikliklerden kaynaklanır; bu, pelvisten sağ parakolik oluk boyunca ve subdiyafragmatik boşluğa ve nihayet tekrar pelvise doğru saat yönünde bir akışla sonuçlanır (82). Sonuç olarak, periton

boşluğunun belirli bölgeleri; subfrenik bölge, küçük kese, mezenter, diyafram ve parakolik oluklar, metastaz oluşma riskini artıracaktır.

2.4.6.3. Uzak peritona bağlanma: İntraperitoneal yayılımın nihai hedefi, sadece serbest tümör hücrelerinin fiziksel ve biyolojik özelliklerine değil, aynı zamanda mestastatik implantasyonu barındıracak dokuya da bağlıdır. Serbest KRK hücrelerinin uzak peritona bağlanması, transmezotelyal ve translenfatik mestastaz olarak adlandırılan iki işlem yoluyla gerçekleşebilir.

Transmezotelyal yayılma sırasında, gevşek tümör hücreleri doğrudan peritonun en iç tabakası olan uzak mezotelyuma yapışır. Adezyon moleküllerinin tümör-mezotelyal etkileşimlerdeki olası rolü, mezotelyal hücre ile endotelyal hücre arasında çizilen paralellere dayalı olarak araştırılmıştır (83). Mezotelyum, peritoneal inflamasyon sırasında lökosit trafiğinde önemli bir rol oynadığı bilinen ve peritoneal metastatik kaskadı sırasında istilacı tümör hücreleri tarafından kullanıldığına inanılan adezyon moleküllerinin farklı bir modelini ifade eder.

Translenfatik yayılma sırasında, gevşek tümör hücreleri, iki veya daha fazla mezotelyal hücrenin, lenfatik stomaların birleşimindeki açıklıklar yoluyla submezotelyal lenfatiklere erişim kazanır. Lenfatik stomalar, immüno-regülasyonda yer alan, ancak en önemlisi, sıvıların ve hücrelerin seröz boşluklardan aktif emilimi için drenaj kanalları olarak hizmet eden küçük lenfatik kılcal açıklıklardır. Omentum majörde, kolonun apendiks epiploikasında, diyaframın peritoneal tarafında, falsiform ligamentte, Douglas poşunda ve ince barsak mezenterinde bulunabilirler. Lenfatik stoma çevresinde dağılmış bu anatomik bölgelerde “milky points (sütlü noktalar)” adı verilen özel yapılar da bulunur. Sütlü noktalar, lenfatik stomaları yoluyla periton sıvısını emen ve esas olarak karın boşluğu için makrofajlar için geçitler ve sağlayıcılar olarak hizmet eden immünokompetan hücre kümeleridir. Dolaşımdaki tümör hücrelerinin erken hayatta kalmasına izin veren oldukça vasküler bir mikro-ortam sağladıkları için PC oluşumunda rol oynarlar. Sütlü lekelerde mezotelyum tarafından VEGF üretimi de anjiyogenezi teşvik ederek sütlü lekelerde tercihli tümör büyümesine katkıda bulunur (84). Bununla birlikte, kesin mekanizmalar iyi anlaşılmamıştır.

2.4.6.4. Subperitoneal alana invazyon: Mezotelyal hücrelerin yuvarlanması, birkaç proinflatuar sitokine yanıt olarak meydana gelir ve böylece bazal membranı açığa çıkarır (79). Mezotelyal hücreler tarafından üretilen hepatosit büyüme faktörü/saçılma faktörü (HGF/SF), mezotelyal yara onarımı sürecinde bu hücrelerin ayrılmasını, hareketliliğini ve çoğalmasını indükler. HGF'nin cMET protoonkogen tarafından kodlanan tirozin kinaz reseptörüne bağlanması, istilacı bir büyüme programını başlatır. Bu program, doku ve organ morfogenezini için embriyonik gelişim sırasında gereklidir, ancak tümör hücreleri tarafından invaziv ve metastatik yeteneği teşvik etmek için kullanılır. Sawada ve arkadaşları (85), cMet'in aşırı ekspresyonunun over kanserinde prognostik bir faktör olduğunu ve kültürlenmiş over karsinomu hücrelerinde bu reseptörün hedeflenmesinin, bir $\alpha 5\beta 1$ bütünleştirici mekanizma yoluyla periton yayılımını inhibe ettiğini zaten bildirmiştir. KRK'da Osada ve arkadaşları (86), HGF'nin karaciğer metastazının ilerlemesi üzerindeki etkisini araştırdı. Yüksek cMet ekspresyonu ve yüksek HGF seviyesi altında malignitenin olumsuz hasta prognozu ve kötü sağkalıma yol açtığını bildirdiler. Malign asitlerin varlığının, mezotelyal hücrelerin morfolojisinde değişikliklere neden olan, hücre-hücre temaslarının ayrılmasına ve ardından karakteristik yuvarlak morfolojinin kurulmasına neden olan faktörleri de içerdiği rapor edilmiştir.

Mezotelyal tek tabakanın yok edilmesi, tümör kaynaklı apoptoz yoluyla meydana gelebilir. Jayne ve arkadaşları (87), insan peritonunun üç boyutlu bir in vitro modelini kullanarak, KRK hücre hatlarının dış mezotelyal tek tabakaya hızla yapıştığını gösterdi. Yapıştırılan tümör hücrelerinin çoğunluğu, mezotelyal yüzey üzerinde istila olmaksızın proliferatif büyüme sergiledi. Tümör hücrelerinin bir kısmı, mezotelyal hücrelerin zar kabarmasını, hücre küçülmesini ve nükleer parçalanmayı içeren apoptozu ile karakterize edilen mezotelyumu işgal etti. Heath ve arkadaşları (88) ölüm ligandı/reseptör sistemi Fas Ligand/Fas'ın, SW480 kolon kanseri hücre hattı ile in vitro birlikte kültürlenmiş insan mezotelyal hücrelerini kullanarak apoptoz sürecindeki rolünü araştırdı. Peritoneal mezotelyum istilasının, en azından kısmen Fas'a bağlı bir mekanizmanın aracılık ettiği, tümör kaynaklı mezotelyal apoptoz yoluyla gerçekleştiğini gösterdiler.

2.4.6.5. Proliferasyon ve anjiogenezis: Proliferasyon ve anjiogenezis tetikleme yetenekleridir. Sürekli proliferasyon, tümör hücreleri ve bunlarla ilişkili stromal hücreler tarafından büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin üretilmesi, otokrin ve parakrin halkaların indüklenmesi yoluyla sağlanır. Hem epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) hem de insülin benzeri büyüme faktörü'1'in (IGF1) bu süreçte dahil olduğu bildirilmiştir (79)

EGFR, ErbB hücre yüzeyi reseptör ailesine aittir ve EGF ve TGF α dahil olmak üzere birçok ligand tarafından aktive edilebilir. Ligandının bağlanması, çeşitli ErbB ailesi üyelerinin homo veya heterodimerizasyonu ile sonuçlanır, ardından EGFR reseptör kompleksinin içselleştirilmesi gelir. Sitoplazmik kuyruklarda EGFR tirozin kinaz alanlarının otofosforilasyonu üzerine, sırayla tümör hücresi proliferasyonunu, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını düzenleyen bir transdüksiyon sinyalleşme kaskadı başlatılır (93). IGF1 ve onun transmembran reseptörü, büyüme ve gelişmenin düzenlenmesinde önemli olan bir hücrel modulator ailesinin parçasıdır. Varghese ve arkadaşları (90), karaciğer veya peritona metastaz yapmış KRK'li hastalardan alınan tümörler üzerinde mikroarray analizleri yapmışlardır. IGF-1, peritoneal metastazlı hastaların tümör örneklerinde özel olarak yukarı doğru düzenlenmiştir.

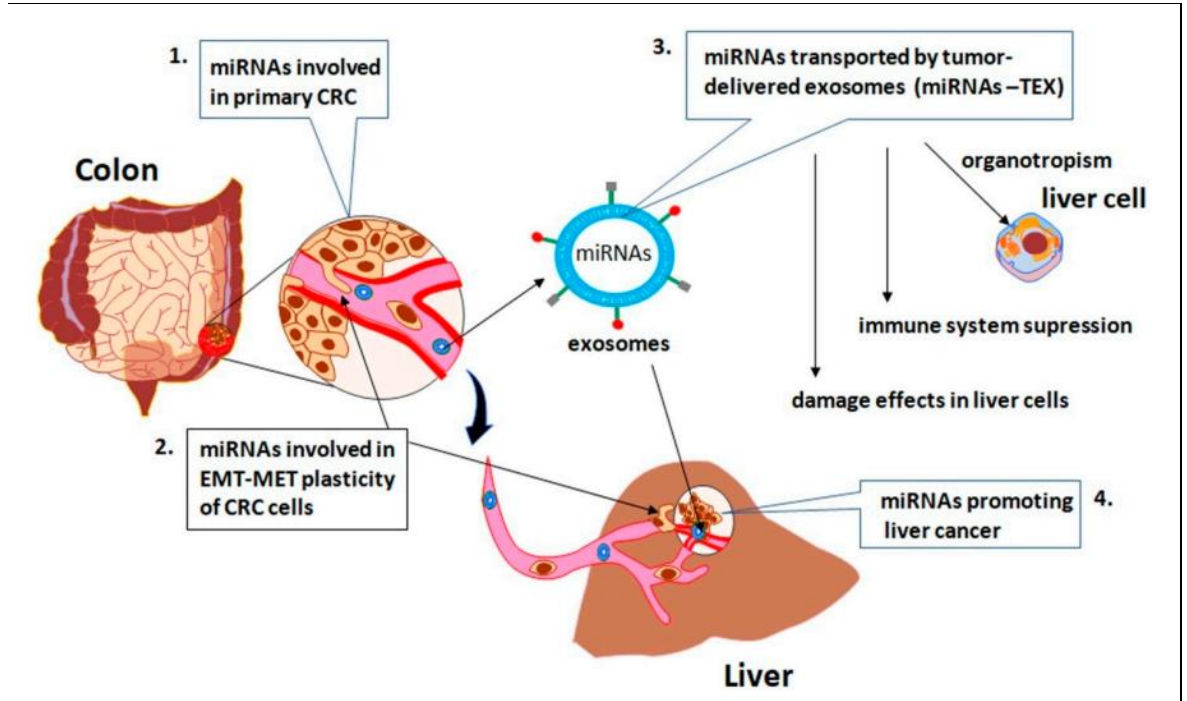
Anjiyogenez, önceden var olan damarlardan yeni kan damarlarının büyümesi, tümör büyümesi ve metastaz oluşumu için çok önemlidir. Hayatta kalabilmeleri için, tümör hücreleri, stromal hücrelerin dahil olmasıyla önceden var olan kan damarlarından ve besinlerden oksijen verilmesine güvenmektedir. Bununla birlikte, bu tümör hücreleri, submezotelyal kapillerlerden 150 μ m'den daha uzağa yerleştirildiğinde, oksijen ve besinler peritoneal kan bariyerini geçemez ve bu da hipoksi ile indüklenen apoptoza neden olur (91). Bu nedenle, anjiyogenez, tümör hücreleri tarafından anjiyojenik faktörlerin üretilmesi yoluyla indüklenir. Bu süreçteki kilit oyuncular hipoksi ile indüklenbilir faktör1 (HIF1) ve VEGF'dir.

Sonuç olarak, PK, kanser hücreleri ile konak elemanları arasındaki, peritoneal metastatik kaskad olarak bilinen, iyi tanımlanmış birkaç adımdan oluşan karmaşık bir moleküler karışmanın sonucudur. Bireysel veya tümör hücreleri kümeleri birincil tümörden ayrılır, periton boşluğuna erişim kazanır ve düzenli periton taşınımına duyarlı hale gelir. Uzak peritona bağlanırlar, anjiyogenezin proliferasyonu sürdürdüğü ve daha fazla metastatik büyümeyi mümkün kıldığı subperitoneal alanı istila ederler. Bu moleküler olayların mutlaka izole olarak meydana gelmediğini, aksine sürekli ve

birbirine bağılı bir süreci tanımladığını anlamak önemlidir. Mevcut tedavi, CRS ve HIPEC'i birleştirir. Bu yaklaşım önemli morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Peritoneal hastalığın yayılmasıyla ilgili moleküler olayların kapsamlı bir şekilde anlaşılması, ardından dikkatli hasta seçimi ve peritoneal yüzey metastazlarının bilgili yönetimi bu nedenle gereksiz toksisiteden kaçınmak için çok önemlidir.

2.4.7. MikroRNA'lara Genel Bakış

Mikro-RNA (miRNA, miR), protein kodlayan genlerin ekspresyonunun %60'ına kadar negatif modülasyonundan sorumlu olan kodlamayan RNA'ların en çok çalışılan sınıfını temsil eder (65). miRNA'ların en önemli özelliklerinden biri, tek bir miRNA'nın 200'e kadar mRNA'yı hedefleyebilmesi ve farklı miRNA'ların aynı mRNA hedefini modüle edebilmesi gibi çoklu hedef potansiyellerinden oluşur. Bu miRNA'lar kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA'lara bağlanıp translasyonel baskılama veya mRNA yıkımı ile posttranskripsiyonel gen ekspresyonunun düzenlenmesini gerçekleştirmektedirler. MiRNA'lar bu şekilde kullandıkları yolak sayesinde hücre proliferasyonu, hücre diferasyonunu veya hücre ölümü gibi vital süreçlerde önemli roller sergilemektedirler. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda kontrolsüz hücre bölünmesinin gerçekleştiği kanser hücrelerinde değişikliğe uğramış miRNA ekspresyonu araştırılmıştır; Kanser başlangıcında ve ilerlemesinde, miRNA'lar hedefledikleri genin karakterine göre tümör süpresörler veya onkogenler gibi fonksiyon göstermektedirler (65) (Şekil 2.9).

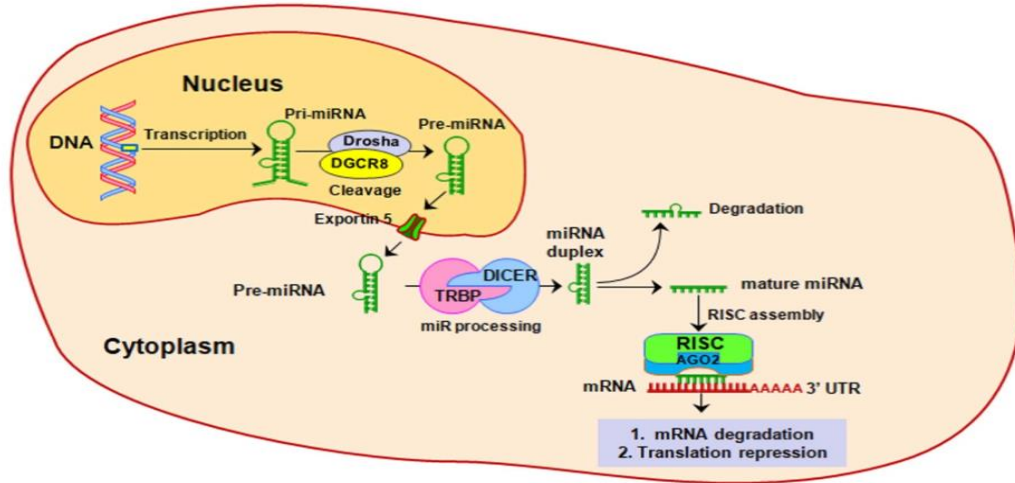


Şekil 2.9. KRK gelişimi ve ilerlemesi ile karaciğer metastazında yer alan spesifik miRNA'lar (65).

2.4.7.1. MiRNA oluşumu: Genel olarak mikroRNA oluşum sürecinde ilk adımda; miRNA genlerinden primer miRNA (primiRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda; primi miRNA'lar prekürsör miRNA(pre-miRNA)'lara nükleus içinde dönüştürülür. Üçüncü veya son adımda; olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşmektedir.

MiRNA'nın biyogenezi, yüzlerce veya binlerce nükleotitten oluşan uzun bir firkete transkriptinin (pri-miRNA) transkripsiyonu ile çekirdekte başlar. Ayrıca, RNA polimeraz III Drosha ve DGCR8 (DiGeorge sendromu kritik bölge 8) tarafından koordine edilen enzimatik bir işlemle, pri-miRNA, pre-miRNA adı verilen yaklaşık 70 nükleotidden oluşan daha küçük bir transkripte indirgenir. Sitoplazmada nükleer reseptör exportin 5 tarafından ihraç edildikten sonra, pre-miRNA önce Dicer kompleksi tarafından yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda olgun bir miRNA dupleksine ve ardından tek sarmallı olgun bir miRNA'ya indirgenir. Ayrıca, olgun miRNA yüklü AGO2 ve RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC), genellikle 3' çevrilmemiş bölgede (UTR) dizi tamamlayıcılığı ile spesifik mRNA transkriptlerini hedeflemek için bir kılavuz olarak

işlev görece ve transkripsiyonel baskıya veya mRNA degradasyonuna (bozulmasına) yol açacaktır (65) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. MiRNA biyogenezi (65). MiRNA biyogenezi, çekirdekte, 70 nükleotidlik daha küçük bir transkript için daha fazla işlenen pri-miRNA adı verilen uzun bir saç tokası transkriptiyle (hairpin transcript) başlar. Sitoplazmaya transport edildikten sonra, pre-miRNA, yaklaşık 21-23 nükleotidlik tek sarmallı olgun miRNA'ya enzimatik olarak işlenir. Olgun miRNA, RNA ile indüklenen susturma (silencing) kompleksi (RISC) adı verilen enzimatik olarak bileşkeye dahil edildiğinde, RISC'ye spesifik mRNA transkriptlerini susturmak için, ya bunların transkripsiyon baskısı ile bozulması yoluyla rehberlik eder.

2.4.7.2. MiRNA ve kanser: Croce'nin grubu (66) ilk kez miRNA'lardaki değişikliğin kanser gelişiminden sorumlu olduğunu gösterdiler ve ayrıca miRNA'nın hedef mRNA'larının negatif düzenleyicileri olarak hareket ettiği hipotezini güçlendirdiler. Hemen ardından, kanserle ilgili yeni miRNA'ları belirlemek ve karakterize etmek için dünya çapında bir araştırma çabası başlatıldı. Şu anda miRNA veritabanı miRBaseRelease 22'den (<http://www.mirbase.org/>) en son veriler 2815 olgun insan miRNA'sını içerir. Bununla birlikte, büyük bir zorluk, miRNA modülasyonu tarafından değiştirilen kansere özgü mekanizmaların tanımlanmasından oluşur. Sonuç olarak, farklı algoritmalar içeren çok sayıda miRNA: mRNA hedef tahmin aracı geliştirilmiştir. En iyi algoritmanın hangisi olduğu sorusunun henüz kesin bir cevabı

yoktur, ancak TargetScan en çok düşünülen seçeneklerden birini temsil etmektedir (65). Bununla birlikte, miRNA: mRNA etkileşiminin doğruluk tahmini hala zordur ve her bir patolojiye özel olarak her miRNA'nın düzenleyici işlevi deneysel olarak doğrulanmalıdır. Kanserdeki onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin işlevselliği, sırasıyla tümör süpresör (TS) miRNA'lar (TS-miRNA'lar, TS-miR'ler) ve oncomiR'ler olarak adlandırılan iki miRNA sınıfı tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Kanser gelişiminin altında yatan genetik ve epigenetik değişiklikler, TS-miR'lerin "fonksiyon kaybına" veya inaktivasyonuna ve oncomiR'lerin "fonksiyon kazancına" veya aşırı aktivasyonuna yol açar. Sonuç olarak, TS-miR'nin hedefleri olan onkogenler aşırı eksprese olurken, tümör baskılayıcı genler oncomiR'lerin aşırı ekspresyonu ile inhibe edilir (77).

2.4.7.3. Tümör süpresör miRNA'lar: MikroRNA'ların malignite sürecine etkisi literatürde ilk olarak 2001 yılında miR16-1 ve miR-15a'nın keşfedilmesi ile bildirilmiş olup, bunların etki mekanizması ise 2005 yılında Cimmino ve ark.'larının yayınladıkları çalışma ile ortaya konmuştur. MiR16-1 ve miR-15a'nın ekspresyon seviyelerinin Kronik lenfositik lösemi hücrelerinde, olan Bcl-2'nin (anti-apoptotik B hücreli lenfoma proteini) üretimi ile zıt ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bunun sonucunda Cimmino ve ark.'ları miR-15a ve miR16-12'in tümör süpresör aktiviteye sahip olduklarını raporlamışlardır (66). Bu iki miRNA'nın düşük seviyelerinin (TS etkisinin kaybı nedeniyle) yüksek seviyede Bcl-2 proteini ile ilişkili olduğunu bildirdi. Dolayısıyla anormal hücre büyümesinin gerçekleştiğinden yüksek seviyelerinin (normal TS aktivite) ise apoptoz ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur.

TS özellik gösteren diğer bir miRNA grubu, let-7 ailesinin üyeleridir (let-7b, let-7c, let-7d, let-7f ve let-7g). Akciğer malignitelerindeki dokunun, normal akciğer dokusu ile karşılaştırıldığında genellikle düşük let-7 seviyeleri gözlenmiştir (68).

2005 yılında, Johnson ve arkadaşları let-7 ailesinin insanlarda bulunan önemli bir onkogen olan RAS'ın aktivitesini kontrol ettiğini keşfettiler. Bu çalışmada, düşük seviyelerde let-7 bulunduran akciğer tümörlerinin, önemli derecede artmış RAS protein seviyelerine sahiptir. RAS onkogeninin mRNA (mRAS) dizisi, let-7'in bu mRNA'ya bağlanmasını ve bu nedenle proteine translasyonunu engellemesini sağlayan let-7'ye komplementer bağlanma bölgeleri dahil etmekteydi. Azalmış let-7'nin seviyeleri, RAS geninin kontrolsüz bir şekilde fonksiyon göstermesine olanak

sağlamaktaydı (68). Let-7 ailesinin, RAS onkogenin mRNA'sını hedefleyen bir TS fonksiyona sahip olduğu sonuçta tespit edilmiştir.

TS fonksiyonuna sahip miRNA-143 birçok kanser türlerinde, anormal büyümeyi baskıladığı görülmüştür. KKK, B-hücreli kanserler, meme, serviks, mesane ve hipofiz tümörlerinde, miR-143'ün TS olarak görev yaptığı rapor edilmiştir.

2.4.7.4. Onkogenik miRNA'lar: TS miRNA'ların aksine, oncomiR'ler çoğunlukla malignitelerde kontrolsüz büyümeyi arttırabilmektedir ve ayrıca anti-apoptotik yönde fonksiyon gösterebilmektedir. İlk olarak keşfedilen oncomiR'lerden, protein kodlamayan gen olan BIC (B cell Integration Cluster) ile beraber eksprese edilen miR-155'tir. Mir-155'in hedef mRNA'sı net bir şekilde saptanamamakla birlikte, ekspresyonunun tavukta lenfoma ve lösemi oluşumunu artırdığı bildirilmiştir. Yakın zamanda, miR-155'in B hücreli lenfoma, oluşuma katkı gösterdiği gösterilmiştir (69).

Mir-21'in, oncomiR özelliğe sahip olan KKK, pankreas, prostat, mide, akciğer, meme ve karaciğer kanserlerinde, Akut miyeloid lösemi, Kronik lenfositik lösemi ve glioblastomada yüksek seviyede ekspresyonu gözlenmiştir. Mir-17-92 altı adet miRNA (miR-17, miR-18a, miR-lenfomalari da içine alan kanser türlerinde yüksek seviyede ekspresyonu gerçekleşmektedir (69).

MiR-99b'lar; MiR-99a, miR-99b ve miR-100'den oluşan microRNA (miR)-99 ailesi, varlığı evrimsel olarak korunmuş bir ailedir. Mevcut üyeler lösemide tipik olarak onkojeniktir, diğer kanserlerdeki fonksiyonel rolleri ise bir tümör baskılayıcı ve bir tümör destekleyicisi arasında değişir. MiR-99 ailesinin hedefleri, onkogenler ve tümör baskılayıcılar listelerinde yer alır, böylece bu miR ailesinin ikili rolünü onkojenik miR'ler (oncomiR'ler) ve farklı hücrel bağlamlarda tümör baskılayıcı miR'ler (TSmiR'ler) olarak gösterir. MiR-99 ailesi, kanserlerdeki fonksiyonel rollerine ek olarak, makrofaj inflamatuvar yanıtlarının ve T-hücresi alt kümelerinin biyolojisinin modülasyonunda yer alır, böylece doku homeostazının korunmasında, periferik toleransın kurulmasında ve ayrıca bir inflamatuvar reaksiyonun çözülmesinde kritik roller uygular.

Literatürde incelemesinde Akut miyeloid lösemide (AML) tüm miR-99 ailesi üyelerinin ekspresyon seviyesinin, AML'nin heterojen popülasyonunu oluşturan çoklu hücrelerin farklılaşma derecesi ile ters orantılı olabilmektedir. MiR-99 ailesi, KKK'da önemli roller oynar. Bir TSmiR görevi gören miR-99 aile üyelerinin genellikle kanser

metastazını engelleyebilme özelliği olabilmektedir. miR-99b-5p aşağı regülasyonunun KRK'nın karaciğer metastazı sırasında yaygın olabilmektedir KRK'nın lenf nodu metastazında miR-100'ün aşağı regülasyonunu bildirilmiştir.

MiR-135b'ler; miR-135 mikroRNA öncüsü, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan kodlamayan küçük bir RNA'dır. İnsanlarda, farelerde ve sıçanlarda exprese edildiği gösterilmiştir. miR-135 çok çeşitli omurgalı türlerinde (MIPF0000028) tahmin edilmiş veya deneysel olarak doğrulanmıştır. Öncü mikroRNA'lar ~70 nükleotit uzunluğundadır ve daha kısa 21-24 nükleotid olgun dizisini üretmek için Dicer enzimi tarafından işlenir.

MiR-135b-5p, memeliler arasında korunmuş bir transkripttir ve insanlarda 1q32.1 gen lokusunda yer alır. 2008'in başlarında, miR-135a ekspresyonunun kolorektal adenomlarda ve karsinomlarda önemli ölçüde yukarı regüle edildiğini bildirilmiştir. Ayrıca, birkaç grup, miR-135b-5p'nin yukarı regülasyonunun, akciğer kanseri ve baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom dahil olmak üzere diğer kanser türlerinde kanser metastazını desteklediğini gözlemlenmiştir. Ayrıca, MiR-135b-5p, TNM evre III/IV olan KRK hastalarının teşhisi için umut verici bir potansiyel non-invaziv biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir.

2.4.7.5. MiRNA'ların KRK progresyonu ve metastazdaki ayrıntılı rolü:

MiRNA'ların kolon kanseri ile ilk ilişkisi Michael ve ark. (91) on beş yıl önce normal kolon dokusuna kıyasla kolon kanserinde miR-143 ve miR-145 ekspresyonunun azaldığını bildirdiklerinde başlamıştır. O zamandan beri, kolorektal karsinogenezde miRNA'nın rolünü araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır. Adenomlardan KRK'nın evrimsel ilerlemesi göz önüne alındığında, KRK'daki miRNA'lar ile modüle edilmiş moleküler mekanizmaların derinlemesine anlaşılması büyük bir zorluk haline gelmiştir (65). Wnt/ β katenin, EGFR, TGF β ve TP53 sinyal yollarındaki değişikliklerin, KRK'nın hayatta kalması, çoğalması, invazyonu ve metastazı ile sonuçlandığı gösterilmiştir (65,91). Bu nedenle, birçok çalışma, KRK gelişimi, ilerlemesi ve metastazının altını çizen moleküler bulmacayı tamamlamak için miRNA'lar: mRNA etkileşim ağlarını kurmak için bu yollara odaklanmıştır. APC, Wnt/ β -katenin sinyallemede inhibitör işlevi olan önemli bir tümör baskılayıcı gendir. Mutasyona uğradığında, KRK'nın %90'ında olduğu gibi, APC inhibitör fonksiyonunu kaybederek tümörijeniz, invazyon ve metastaza yol açar. Artan sayıda çalışma, ya APC'nin doğrudan baskılanması (örn. miR135a/b, miR-

494, miR-19a) ve Wnt yolunun anormal aktivasyonu (örn. örneğin miR-21, miR-155, miR-103a, miR-1827, miR-145, miR-34a) veya dolaylı olarak bu yolların diğer üyelerini (miR-150, miR-224, miR-146a, miR-) hedef alır (91).

EGFR sinyal yolu, hücre proliferasyonuna, farklılaşmasına, göçüne ve apoptoza aracılık eden normal embriyogenezde kritik bir role sahiptir. EGFR'nin genetik değişikliklerle fonksiyon kazanması kanser gelişimine yol açar. KRK'nın yaklaşık %50'sinde EGFR gen amplifikasyonu, KRAS ve BRAF downstream mediatörlerinin mutasyonel aktivasyonu bulunur (65).

Son çalışmalar, onkojenik EGFR yolunun anormal aktivasyonunun TS-miRNA'ların fonksiyon kaybına bağlı olabileceğini bildirmiştir. EGFR yolunda yer alan en önemli TS-miRNA'lardan ikisi, birleşik eylemi KRAS ve BRAF (47) dahil olmak üzere EGFR yolunun birkaç üyesini hedefleyerek çoğalmayı ve göçü azaltan miR-143 ve miR-145'tir. let-7a'nın fonksiyon kaybı, yüksek KRAS ve c-MYC ve kolon tümörjenez seviyeleri ile ilişkilendirilirken, let-7 KRAS rs712 polimorfizmi, artan KRK riski ile korele idi (92). Son kanıtlar, miR-19a'nın KRAS ve VEGFA'yı hedefleyerek KRK anjiyogenezini engelleyebileceğini ve miR-181d'nin EGFR/KRAS yolunda bir downstream düzenleyicisi olan PEAK1'i tetikleyerek hücre çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu azalttığını doğrulamıştır. Öte yandan, KRAS yolunun aktivasyonu, bazı onkomiR'leri tetikleyebilir ve yukarı regüle edebilir; örneğin, KRK gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan miR-210 ve miR-181a gibi veya KRK saldırganlığı ve metastazında çok önemli bir role sahip olan miR200c (65)'dir.

AKT-PI3K-mTOR yolu, yaklaşık %15-20 KRK'da amplifiye edilen EGFR yolunun ikinci sinyalleşme merkezini temsil eder (93). AKT-PIK3K-PTEN yolunun amplifikasyonuna hem miR-126, miR-497 ve miR-1 gibi TS-miR'lerin fonksiyon kaybı ya da miR-21, miR-19 ve miR -96 dahil olmak üzere birkaç oncomiR'nin yukarı regülasyonu aracılık eder (65). KRK gelişimi ve ilerlemesinde EGFR sinyal yolu ile ilgili miRNA'lar hakkında daha fazla veri, EGFR sinyal yolu bölümünde sunulmaktadır.

Bununla birlikte, KRK'daki miRNA'lar-mRNA'lar ağıları, daha spesifik KRK metastazı durumunda daha karmaşıktır. MiRNA'lar, kolorektal dolaşımdaki tümör hücrelerinin (CTC'ler) hareketinin altında yatan EMT'yi kontrol edebilir. Eksozomlarda kapsüllenmeleri ile miRNA'lar, karaciğer metastatik nişinin hazırlanmasında, bağışıklık sisteminin baskılanmasında ve karaciğer fenotipinin Dicer'a-bağlı bir şekilde modüle edilmesinde destek sağlar.

2.4.7.5.1. EMT modülasyonu ile KRK metastazında miRNA'ların rolü: Bununla birlikte, KRK'daki miRNA'lar-mRNA'lar ağı, daha spesifik KRK metastazı durumunda daha karmaşıktır. MiRNA'lar, kolorektal CTC'lerin hareketinin altında yatan EMT'yi kontrol edebilir. Eksozomlardaki kapsüllenmeleri ile miRNA'lar, karaciğer metastatik nişinin hazırlanmasında, bağışıklık sisteminin baskılanmasında ve karaciğer fenotipinin Dicer'a bağlı bir şekilde modüle edilmesinde destek sağlar.

KRK metastazının altında yatan moleküler mekanizmaları anlamak, bu patolojinin tedavi stratejilerini geliştirmek ve sonuç olarak hastaların sağkalım oranını artırmak için çok önemlidir. Kolorektal karsinogenezde miRNA'ların aracılık ettiği mekanizmalar oldukça iyi anlaşılmış olsa da, metastazdan sorumlu olanlar henüz aydınlatılamamıştır. Kanser hücrelerinin invazyon ve metastaza yol açan önemli bir özelliği, epitelial özelliklerini mezenkimal olanlara değiştirmesidir, bu süreç EMT olarak bilinir. EMT sırasında kanser hücreleri, hücre hareketliliğine, gövde özelliklerinin kazanılmasına, apoptozun inhibisyonuna ve immünosupresyona yol açan fenotiplerini değiştiren çeşitli işlemlerden geçer. EMT, CDH1 ve claudinler gibi proteinleri kodlayan birkaç spesifik genin aşağı regülasyonu ve vimentin (VIM), N-kadherin (NCAD) ve fibronektin (FN1) için olanlar gibi çeşitli protein kodlayan genleri aktive ederek mezenkimal yapışmayı teşvik ederek epitelial sıkı hücre bağlantılarının çözülmesiyle karakterize edilir. İnflamatuar sitokinler ve büyüme faktörleri gibi TME'den gelen uyaranlar, kanser hücrelerinin EMT'sini anormal şekilde düzenleyerek tümör gelişiminde önemli bir role sahiptir (94). EMT modülasyonu, birçok düzenleyici ve indükleyici molekülü içeren karmaşık bir işbirliği ağı gerektirir (65). EMT'nin ana düzenleyicileri, aktive edici transkripsiyon faktörlerinin üç ailesi ile temsil edilir: SNAIL, ZEB ve TWIST. Bununla birlikte, biriken kanıtlar, diğer iki transkripsiyon faktörü ailesinin, PROX1 ve FOX'un KRK'nın EMT'sine dahil olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, bu transkripsiyon faktörleri ailelerinin üyeleri tarafından EMT'nin uyarılması, miRNA'lar tarafından sıkı bir şekilde koordine edilen çoklu yolları içerir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. MiRNA'lar ve bunların mRNA hedefleri, EMT ve MET' ilişkin düzenleme ve indüksiyon ile ilişkili olup, KRK invazyonu ve metastazı destekler (65).

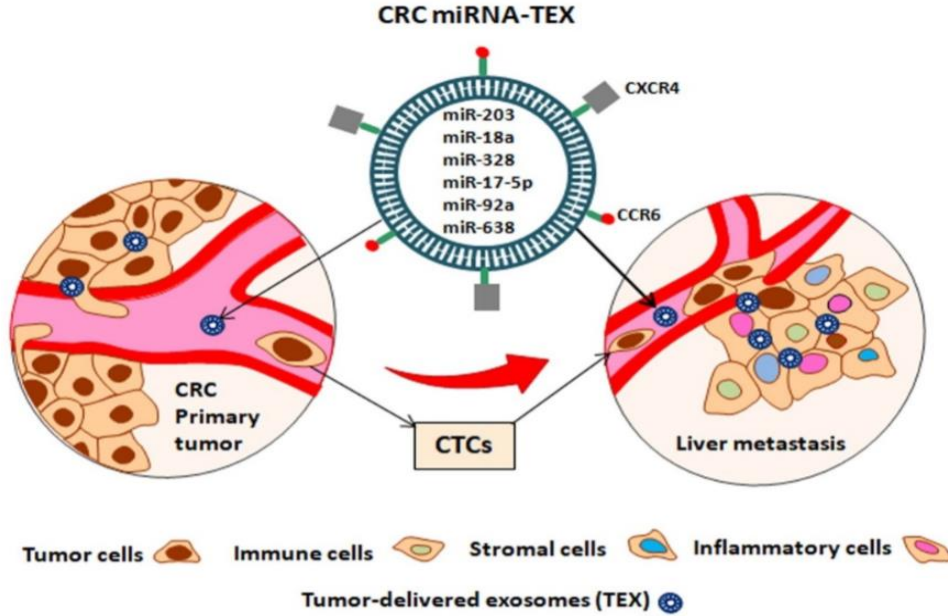
Key Signaling	miRNAs	Targets	Function
Regulation of EMT	oncomiR (High Expression)—Gain of Function		
	miR-675-5p	SNAIL	EMT, invasion, metastasis
	TS-miR (Low/Reduced Expression)—Loss of Function		
	miR-34a/b/c	SNAIL, SLYG, ZEB1, BMI1, CD44, CD133, c-MYC	EMT, invasion, metastasis, MET
	miR-375	SP1, MMP2, SNAIL, CDH1, VIM, CDH2, CTNNB1	EMT, invasion, metastasis
	miR-374	CCND1, ZEB1, CDH2 VIM, SLUG, SNAIL	EMT, proliferation, invasion, migration, liver metastasis
	miR-200c	ZEB1, ETS1, FLT1, ASCL2	EMT-MET plasticity, invasion, migration, liver metastasis
	miR-429	ONECUT2, ZEB1, ZEB2	EMT, invasion, migration
	miR-335, miR-132, miR-192	ZEB2	EMT, Invasion, metastasis
	oncomiR (High Expression)—Gain of Function		
Inducing of EMT	miR-20a	SMAD4, MMP2, MMP9	EMT, migration, metastasis
	miR-4775	SMAD7/TGF- β	EMT, invasion, metastasis
	miR-1269	SMAD7, HOXD10	EMT, invasion, metastasis
	miR-21	NRF2, SMAD7	EMT, invasion, metastasis
	miR-150	CREB	EMT, invasion, migration
	miR-194	MMP2	EMT, invasion, migration
	TS-miR (Low/Reduced Expression)—Loss of Function		
	miR-320c	SOX4, FOXM1, FOXQ1	EMT, proliferation, migration, tumorigenesis
	miR-187	SOX4, NT5E, PTK6	EMT, invasion, metastasis
	miR-34a	CTNNB1, c-Met ZEB1, ZEB2, SNAIL	Progression, EMT, liver metastasis
	miR-145	SP1, CTNNB1, TCF4, VIM, SNAIL	Proliferation, migration, EMT, invasion, metastasis
	miR-29b	BCL9L, TCF7L2	Cell growth, EMT, angiogenesis, invasion, migration
	Let-7c	SNAIL, PGRN, MMP11	Cell migration and invasion

Doğrudan TP53 tarafından düzenlenen MiR-34 ailesi (miR-34a/b/c), SNAIL, SLUG ve ZEB1 transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra BMI1, CD44, CD133, orc-MYC kök faktörlerini baskılayarak TGF β ile indüklenen EMT'nin önlenmesinde rol oynar. Tersine, SNAIL ve ZEB1, miR-34a/b/c ifadesini baskılayarak EMT'yi teşvik eder. Bununla birlikte, birçok kanserde bulunan TP53 ve/veya miR-34a/b/c'nin fonksiyon kaybı, kanser metastazını kolaylaştıran önemli bir moleküler değişikliği temsil eder (95). SNAIL'in KRK tarafından mezenkimal geçiş aktivasyonuna yönelik epitel, doğrudan ZNF281 transkripsiyonunu indükler, bu da KRK metastazına katkıda bulunan miR-34a/b/c'nin baskılanmasına yol açar. Yakın tarihli bir çalışmada (96), miR-375'in MMP2'yi ve birkaç EMT ile ilişkili genleri düzenlediği kanıtlanmıştır, SNAIL dahil. Aşağı regüle edildiğinde miR-375, KRK hücrelerinin çoğalmasına, invazyonuna ve göçüne yol açar. MiR-374, KRK'deki fonksiyon kaybı PIK3/AKT yolunun aktivasyonunu indükleyen, proliferasyonu, istilayı, göçü ve intrahepatik metastazı teşvik eden başka bir tümör baskılayıcıyı temsil eder. Transkripsiyon faktörleri SNAIL, SLUG ve ZEB1'in yanı sıra NCAD ve VIM alanı, hepsi miR-374 inhibisyonu tarafından önemli ölçüde yukarı regüle edilen miR-374'ün hedefleri arasındadır (97). MiR-200 ailesinin iki üyesi olan MiR-200c ve miR-429, ağırlıklı olarak KRK hücrelerinde ZEB transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesinde rol oynarlar. miR-200c'nin indüksiyonu, ZEB1

ekspresyonunu baskılayarak EMT'nin inaktivasyonuna yol açar, bu da KRK hücrelerinin invazyonu ve migrasyonunun azalmasına neden olur (98). MiR-429, ONECUT2'yi hedefleyerek TGF β ile indüklenen EMT'yi tersine çevirebilir ve böylece hücre migrasyon ve invazyonunu inhibe edebilir. Bununla birlikte, miR-429, KRK'de önemli ölçüde aşağı regüle edilmiştir (99). Başta miR-335, miR-132 ve miR-192 olmak üzere diğer tümör baskılayıcıların aşağı regülasyonu, ZEB2 hedef genlerinin ekspresyonunu artırarak KRK'nin istilas ve metastazı ile ilişkilidir (100). Hipoksik koşullarda, miR-675-5p aşırı ekspresyonu, hem SNAIL'in baskılayıcı DDB2'sini inhibe ederek hem de transkripsiyon faktörü HIF1 α 'nın (101) aktivitesini stabilize ederek SNAIL transkripsiyonunu artırarak HIF1 α tarafından yönlendirilen hipoksi ile indüklenen EMT'yi düzenleyebilir.

2.4.7.5.2. KRK karaciğer metastazını sürdürmede miRNA-TEX'in rolü: KRK'dan karaciğer metastazlarının oluşumu, kolorektal CTC'lerin EMT-MET plastisitesini, karaciğer mikro-ortamının lokal olarak yeniden şekillenmesini ve immünosupresyonu içeren çok aşamalı bir süreci temsil eder. Genel olarak, bu süreçlere güçlü bir şekilde KRK tarafından salınan miRNA'lar-TEX aracılık eder. Eksozomlar, hücrenin endozomal sistemi içinde üretilen multiveziküler gövdelerden (MVB'ler) türetilen bir lipid çift tabakası ile çevrelenmiş, yaklaşık 30-100 nm'lik küçük hücre dışı veziküllerdir. Tümör hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre tipi tarafından salgılanırlar ve anne sütü, idrar, tükürük, semen ve kan gibi vücut sıvılarının çoğunda ve ayrıca kültürlenmiş hücrelerin süpernatantlarında tespit edilebilirler. Eksozomlar, bağlandıkları hücrelerin fenotipini, onları parakrin veya endokrin bir şekilde kargo içeriğine aktararak modüle edebilir (102,103). İkincil metastatik nişin hazırlanması veya karaciğer mikroçevresinin yeniden şekillendirilmesi, karaciğer metastazını sürdürmek için zorunlu bir durumdur. KRK tarafından salınan eksozomlar, nükleik asitler (DNA, mRNA, miRNA, lncRNA, circRNA vb.), proteinler (transkripsiyon faktörleri, reseptörler, enzimler, vb.)'dir. TEX'lerin en önemli özelliklerinden biri, farklı integrin ekspresyon paternleri nedeniyle organotropizmi belirleyebilmeleri ve organa özgü metastazı tahmin edebilmeleridir. İntegrinler, hedef hücrelerde bulunan spesifik reseptörlere bağlanır ve Src fosforilasyonu ve S100 gen ekspresyonu yoluyla proinflamatuvar sinyalleri indükleyerek ikincil pre-metastatik nişi hazırlar (104). İki kemokin reseptörü, CXCR4 (96) ve CCR6 daha önce karaciğere KRK metastazı ile ilişkilendirilmişti (Şekil 11). Ayrıca, KRK'nın metastatik paterninin özelliklerini araştıran

önceki veriler, karaciğerin KRK'nın ana metastatik bölgesi olduğunu, akciğerler, kemikler ve beyin daha az yaygın olduğunu ortaya çıkarmıştır (105) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. KRK tarafından iletilen eksozomlar (miRNA-TEX) tarafından taşınan miRNA'ların aracılık ettiği KRK dolaşan tümör hücreleri (CTC'ler) yoluyla karaciğerde KRK metastazı (65). CXCR4 ve CCR6 kemokin reseptörleri, miRNA-TEX'in karaciğer organotropizminden sorumludur; karaciğer, proinflamatuvar ve pro-tümörijenik sinyalleri indükleyerek ikincil metastatik niş hazırlamaktan sorumludur.

Mevcut verilere göre, miRNA'lar, kanser gelişimi, ilerlemesi ve metastazında yer alan en çok çalışılan eksozom-tutulmuş moleküllerdir. Alıcı hücrelerde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde miRNAs-TEX'in fonksiyonel rolü gösterildiği 2010 yılından bu yana, bunların kanserin ayırt edici özelliklerine olan temel katkıları kabul edilmiştir (106). Bununla birlikte, farklı tümörler tarafından salınan eksozomlara dahil edilen miRNA'ların miktarları açıklığa kavuşturulmamıştır. Bir hipotez, miRNA'ların-TEX'in bolluğunun, donör hücrenin sitoplazmasındaki mRNA hedef transkriptlerinin varlığına bağlı olduğundan bahseder. Bu nedenle donör hücredeki olası bir mRNA-miRNA etkileşimi, eksozomlarda bu miRNA'nın düşük seviyelerine yol açabilir (103). Öte yandan, eksozomlara ayrılan miRNA'lar, transkripsiyon sonrası modifikasyonları ile

şartlandırılabilir, böylece 3' uç adenile edilmiş miRNA'lar hücrelerde ağırlıklı olarak zenginleşirken, 3' uç üridillenmiş miRNA'lar eksozomlarda zenginleştirilir.

Buna göre, KRK hücrelerinden gelen eksozomal miR-203, monositlerin KRK hastalarının karaciğer metastazında yer alan M2-tümör-ilişkili makrofajlara (TAM'ler) farklılaşmasını teşvik ederek premetastatik niş oluşumunu sürdürebilir (107).

Ayrıca, son kanıtlar, karaciğer metastatik nişlerinin, KRK hücrelerinin eksozomal miR-21'i tarafından miR-21-TLR7-IL6 eksenini yoluyla teşvik edilebileceğini ileri sürmüştür (108). Önemli ölçüde artan serum eksozomal miR-6803-5p seviyeleri ve miR-548c-5p'nin azalan seviyeleri son zamanlarda KRK hastalarının zayıf sağkalım ve karaciğer metastazı ile ilişkilendirilmiştir (109). Bununla birlikte, hem miR-6803-5p hem de miR-548c-5p'nin KRK metastazını etkilediği moleküler mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir. Benzer şekilde, yeni kanıtlar azalmış serum eksozomal miR-638 düzeylerinin artmış karaciğer metastazı riski ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (110). Önceki veriler, miR-638'in hem TP53 ve PTEN'i hedefleyerek bir oncomiR olarak hem de KRK'da TSPAN1'i inhibe ederek bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü göstermiştir (65). Fu ve ark. (111) yakın zamanda miR-17-5p ve miR-92a-3p eksozom ekspresyonunun KRK metastazı ile ilişkili olduğunu, ancak KRK mutasyon tipiyle ilgili olmadığını göstermiştir. Tümörü boşaltan damarın periferik damardan (PV) alınan kandan daha homojen bilgi sağlayabileceğine dair çok ilginç bir hipoteze dayanarak, Monzo ve ark. (112), KRK primer tümörlerinin mezenterik ven (MV) yoluyla PV'den daha yüksek konsantrasyonlarda miRNA saldıgını gösterdi. Buna göre, karaciğer metastazı gelişen hastaların MV'sinde eksozomal miR-328'in PV plazmasından daha yüksek olduğunu gözlemlediler, bu da miR-328'in KRK karaciğer metastazı gelişiminde olası rolünü ortaya koydu. Bununla birlikte, eksozomlara yüklenen miRNA'lar pasif bir süreç değildir. Teng ve ark. (113) yakın zamanda, oncomiR'lerin eksozomlara ayrılmasının bastırıldığını, buna karşın TS-miR'lerin eksozomlara ayrılmasının arttığını göstermiştir. Ayrıca, miR-193a ve miR-18a'yı içeren eksozomal TS-miR'nin, karaciğer metastazı olan hastalarda, metastazı olmayan KRK hastalarına kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Fonksiyonel analiz, miR-193a'nın, doğrudan hedefi Caprin1 aracılığıyla CCDN1andc-MYC ekspresyonu ile KRK ilerlemesini modüle ettiğini gösterdi.

Oldukça ilginç bir şekilde, son kanıtlar, meme kanseri tarafından salınan miRNA-TEX'in, normal hücre fenotipinin bir tümör fenotipine dönüştürülmesinde doğrudan rol oynadığına ve Dicer'e bağlı bir şekilde TCP'den bağımsız metastazı teşvik ettiğine işaret etmiştir (102). Ancak, KRK metastazı için bu yaklaşımı destekleyen hiçbir veri henüz sunulmamıştır. Ayrıca, önceki veriler, konakçının bağışıklık sisteminin baskılanmasında tümör kaynaklı eksozomların rolünden söz etmişti (114). Bununla birlikte, kolorektal tümörler tarafından salınan ve KRK metastazı sırasında bağışıklık sisteminin baskılanmasında rol oynayan eksozomlarda tutulan miRNA'ların belirlenmesi büyük bir zorluk olmaya devam etmektedir.

2.4.7.6. Güvenilir biyobelirteçler olarak miRNA'lar: Güvenilir biyobelirteçler olarak miRNA'ların klinik etkileri birçok biyolojik numune türünde (115) yüksek stabiliteleri göz önüne alındığında, miRNA'lar KRK için yeni kanser biyobelirteçlerini keşfetmek için önemli adaylar haline gelmiştir. Halihazırda, sayısız makale, serum miRNA'larının KRK teşhisi, prognozu ve tedavi yanıtında faydasını sunmuştur. Örnek olarak, miR-21, let-7g, miR-31, miR-92a, miR-181b ve miR-203 dahil olmak üzere altı miRNA'nın, karsinoembriyonik antijen (CEA) ve CA19-9 (116) gibi klasik belirteçlerle karşılaştırıldığında %40'ın üzerinde özgüllük ve duyarlılıkla KRK teşhisi için güvenilir bir biyobelirteç olduğu gösterilmiştir. Başka bir örnek, artan serum seviyeleri KRK progresyonu ve karaciğer metastazı ile önemli ölçüde ilişkili olan miR-200 tarafından verilmiştir (117). Ancak, Hibner ve ark. (118), miRNA'ların KRK teşhisi ve prognozu için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilirliğinin altını çizmektedir.

Ek olarak, KRK klinik denemelerinde miRNA değerlendirmesi hakkında birkaç gözlemsel çalışma rapor edilmiştir. ClinicalTrials.gov Identifier'da NCT02635087 kodu bulunan bu denemelerden biri, altı miRNA'dan oluşan bir panelin (miR-21, miR-20a-5p, miR-10a-3p, miR-106b-5p, miR-143-5p ve miR-215) olup olmadığını araştırmayı amaçladı. 2022'de biten çalışmanın sonucunda, altı miRNA tabanlı sınıflandırıcının, evre II kolon kanserli hastalarda hastalık nüksü için güvenilir bir prognostik ve prediktif belirteç olduğunu ve ayrıca hangi hastaların adjuvan kemoterapiden fayda gördüğünü tahmin edebileceğini bildirdiler.

Sonuç olarak; artan kanıtlar tutarlı bir şekilde miRNA'ların kanserin tüm ayırt edici özelliklerinin modülasyonunda önemli molekülleri temsil ettiğini göstermektedir. Buna göre, spesifik miRNA'lar, karaciğer metastazının yanı sıra KRK'nın teşhisi, gelişimi

ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, solid kanserli hastalarda dolaşımdaki miRNA seviyelerindeki değişiklikler, yeni tanısal ve prognostik faktörlerin geliştirilmesi için düşünülebilir. Bu bağlamda, KRK tarafından iletilen eksozomlar (miRNA-TEX) tarafından taşınan kan miRNA'ları, karaciğerde KRK metastazı tahmin etmek için kullanılabilecek değerli araçlar haline gelmiştir. Tümör eksozomlarına iletilen miR-18a, mir-328, miR-17-5p ve miR-92a dahil olmak üzere birkaç KRK oncomiR'si, KRK metastazı ile ilişkilidir, ancak aynı zamanda karaciğer karsinogenezi ile de ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, klinikte güvenilir biyobelirteçler olarak uygulanmadan önce, miRNA'ların işlenmesi, ifadesi ve normalizasyonu ile ilgili standartlaştırılmış yöntemlerin oluşturulması gerekirken daha fazla doğrulama çalışması gereklidir. Gelecekteki zorluklar olarak, nasıl olduğunu değerlendirmenin ilginç olacağını düşünüyoruz. karaciğer miRNA'larının çoğu, birincil KRK'yi tedavi etmek için kullanılan kemoterapi rejimleri tarafından değiştirilebilir. Bu değişikliklerin mevcut olması durumunda, bu miRNA'ların karaciğerde KRK metastazını kolaylaştırmaya dahil olup olmadığı ve nasıl olabileceği sorusu ortaya çıkar.

2.4.8. Kolorektal Kanser Tanı ve Tarama

KRK teşhisi, ya semptomlarla başvuran bir hastanın değerlendirilmesi ya da tarama sonucunda ortaya çıkar. Hastalık, gaitada kan, bağırsak alışkanlıklarındaki değişiklikler ve karın ağrısı gibi bir dizi semptomla ilişkilendirilebilir. Diğer semptomlar yorgunluk, soluk görünüm ve nefes darlığı gibi anemi ile ilgili semptomlar ve kilo kaybıdır. Yaşlı bir hastada KRK varlığı için bu semptomların prediktif değeri sınırlıdır, ancak daha ileri klinik değerlendirmeyi ihtiyac duymaktadır. KRK için popülasyon taramasının yaygınlaşmasıyla birlikte, birçok kişiye klinik öncesi bir aşamada teşhis konur. Semptomatik hastalarda kolonoskopi tercih edilen araştırma yöntemidir. Nüfus taraması için gaitada gizli kan testi (GGKt) kullanılabilmektedir. GGKt'nin pozitif olması durumunda kolonoskopi yapılabilir (119).

Kolonoskopi; KRK teşhisi için altın standarttır. Yüksek teşhis doğruluğuna sahiptir ve tümörün yerini değerlendirebilir. Daha da önemlisi, teknik eşzamanlı biyopsi örneklemesine ve dolayısıyla moleküler profillemeye için tanı ve materyalin histolojik olarak doğrulanmasına olanak sağlayabilir. Kolonoskopi aynı zamanda hem tanısal hem de tedavi edici etki sağlayan tek tarama tekniğidir. Endoskopik polipektomi kullanılarak adenomların çıkarılması kanser insidansını ve mortaliteyi azaltabilir (120). Gerçekten de

kolonoskopinin kolorektal kanser insidansını ve mortalitesini azaltmadaki etkinliği ABD Ulusal Polip Çalışması tarafından iyi bir şekilde gösterilmiştir (121). Bu çalışmadan elde edilen son 20 yıllık takip verileri, KKK'ya bağlı mortalitede %53'lük bir azalma olduğunu gösterdi (121). Kolonoskopinin kalitesi, interval kanserlerden (yani, tarama ziyaretleri arasında ortaya çıkan bir tümör) kaçınmanın en kesin yolu olan kanser ve adenomun tanı veriminde belirleyici bir faktördür (119).

Avrupa Gastrointestinal Endoskopi Derneği Kolon Kapsül Endoskopi Kılavuzu, kolonoskopi yapılmamış veya eksik kolonoskopi geçirmiş hastalarda kolon mukozasının görüntülenmesi için uygun ve güvenli bir araç olarak kapsül endoskopisini önermektedir (122). Bu öneri daha sonra KKK taramasına ilişkin Asya-Pasifik kılavuzlarına da dahil edildi (119). Kapsül endoskopi endikasyonları şu anda geleneksel kolonoskopiyi reddeden ve anatomik nedenlerle tam kolonoskopinin mümkün olmadığı hastalarla sınırlıdır. Darlığın varlığı, kapsül retansiyonuna yol açabileceğinden, kapsül endoskopisi için bir kontrendikasyondur.

Bilgisayarlı Tomografi; uzak metastazların tespiti, tümörün komşu organla veya dokular ile ilişkisi ve lenf nodlarının tespitinde kullanılabilir. BT avantajları; non invaziv ve büyük adenomları kolonoskopi gibi tespit edebiliyor fakat dezavantajları; anormal sonuçlarda kolonoskopi ve doku tanısı gerekliliği olmakta, flat adenomlar polipoid lezyonlara göre daha malign potansiyele sahip ve bu lezyonlar ile BT ile atlanabiliyor, radyasyon maruziyeti baryumlu enemaya göre daha az olmakta fakat her 5 yılda bir çekilen hastalar için kümülatif doz bilinmemektedir (123).

Magnetik rezonans görüntüleme; karaciğer metastazlarının, lenf nodlarının durumu ve nüks lezyonların tespitinde kullanılabilir. Endorektal ultrasonografi veya endorektal coil ile yapılan manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile tümörün barsak duvarındaki invazyon derinliği ve lenf nodu tutulumu tespit edilebilir. Pozitron emisyon tomografisi (PET) fluorodeoksi glukozun tümör dokusu tarafından normal hücrelere göre daha hızlı kullanım esasına dayanır. Ekstrahepatik hastalık varlığını araştırmada ve BT ya da MR ile nüks-skar dokusu ayırımı yapılamayan hastalarda faydalıdır (124). 50 yaşından itibaren KKK riski belirgin olarak arttığından malignite ve polip açısından düzenli olarak tarama yapılmalıdır. 50 yaşından itibaren önerilen tarama yöntemleri şu şekildedir:

Yılda bir gaytada gizli kan testi

Beş yılda bir fleksibl sigmoidoskopi

Beş yılda bir çift kontrastlı baryum enema

On yılda bir kolonoskopi

Beş yılda bir bilgisayarlı tomografi

Üç veya daha fazla adenom, yüksek dereceli displazi (High-grade, karsinoma in situ), villöz yapı ve adenomun 1 cm veya daha fazla büyüklükte olması bu bireylerin KRK açısından yüksek riskli olduğunun göstergesidir. Bu bireylere 3 yılda bir kolonoskopi yapılması önerilmektedir. Bir veya iki adet, yüksek dereceli displazisi olmayan, 1 cm'den küçük tubüler adenomu olan düşük riskli bireylere 5-10 yılda bir kolonoskopi yapılması önerilmektedir. Hiperplastik polipi olan bireylere ortalama risk grubundaki gibi 10 yılda bir kolonoskopi yapılması önerilmektedir. Adenomatöz polip öyküsü olanlar, KRK nedeniyle küratif rezeksiyon öyküsü olanlar, birinci derece akrabasında 60 yaşından önce kolorektal karsinom veya adenom saptananlar, belirgin süre inflamatuvar barsak hastalığı olanlar, bilinen veya şüphelenilen FAP veya HNPCC hastalıklarından birine sahip olanlar yüksek riskli olarak değerlendirilir. Bu bireylerde kolonoskopik tarama daha sık yapılmalı ve erken yaşta başlamalıdır (125).

2.4.9. Kolorektal Kanser Histopatoloji

Kolon kanserinin en yaygın şekli, tüm kolorektal kanser vakalarının %95 ila %98'ini oluşturan adenokarsinomdur. Diğer, daha nadir tipler arasında lenfoma, adenoskuamöz ve skuamöz hücreli karsinom bulunur. Bazı alt tiplerin daha agresif olduğu bulunmuştur (126).

Makroskopi: Kalın bağırsağın sağ tarafındaki kanserler ekzofitik olma eğilimindedir, yani tümör bağırsak duvarındaki bir yerden dışarı doğru büyür. Bu çok nadiren gaitanın tıkanmasına neden olur ve anemi gibi semptomlarla kendini gösterir. Sol taraflı tümörler çevresel olma eğilimindedir ve bir peçete halkası gibi bağırsak lümenini tıkayabilir ve daha ince kalibreli gaita ile sonuçlanır.

Polipoid tip; karnabahar görünümlü olup lümen içine doğru büyüyen tümörlerdir. Sıklıkla çekum ve rektumda görülür ve çoğunlukla iyi diferansiye adenokarsinomlardır. Genelde intestinal obstruksiyon tespit edilmez çünkü lümeni annüler tarzda sarma eğilimi yoktur, ancak sıklıkla kanamaya neden olurlar.

Ülseratif tip; malign ülser görünümü mevcuttur (nekrotik bir taban ve etrafında kabarık bir kenar) ve genellikle çekum kanserlerinde görülür.

Annüler tip; mekanik bağırsak tıkanıklığına (MBT) yol açabilen tümörlerdir. Çoğunlukla yavaş gelişim gösterirler ve metastaz eğilimleri yüksektir. Sol kolon ve sigmoid kolonda genellikle görülürler.

Linitis plastica; sıklıkla lümenin daralmasına yol açıp MBT'ye yolaçabilen bağırsağın geniş bölümünde duvar kalınlaşması oluşturan tümörlerdir (126).

Mikroskopi: Adenokarsinom, kolon ve rektumu kaplayan yüzeyel glandüler epitel hücrelerinden kaynaklanan malign bir epitelyal tümördür. Duvarı invaze eder, muskularis mukoza tabakasına, submukozaya ve ardından muskularis propriaya infiltre olur. Tümör hücreleri, pluristratifikasyon, çoklu lümen, azaltılmış stroma ("arka arkaya" görünüm) barındıran düzensiz tübüler yapıları tanımlar. Bazen, tümör hücreleri yapışkandır ve büyük mukus havuzları üreten interstisyumu istila eden mukus salgılar. Bu, hücrelerin zayıf şekilde farklılaştığı müsinöz adenokarsinomda ortaya çıkar. Mukus, tümör hücresinin içinde kalırsa, çekirdeği çevreye doğru iter, bu "taşlı yüzük hücresinde" olur. Glandüler mimariye, hücrel pleomorfizme ve baskın paternin mukosekresyonuna bağlı olarak, adenokarsinom üç derece farklılaşma gösterebilir: iyi derecede farklılaşmış >%95, orta derecede farklılaşmış %50-95 ve düşük farklılaşmış <%50. (126).

Tümör tomurcuklanması (budding): KRK'da tümör tomurcuklanması, karsinomların invaziv cephesinde tek tek hücrelerin ve küçük tümör hücresi kümelerinin varlığı ile gevşek bir şekilde tanımlanır. Bir epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) temsil ettiği varsayılmıştır. Tümör tomurcuklanması, insanları TNM evrelemesiyle tanımlananlardan daha anlamlı risk kategorilerine ayırmaya izin verebilen ve ayrıca özellikle kolorektal karsinomun T1 ve T3 N0'da (Evre 2, Dukes' B) potansiyel olarak tedavi kararlarını yönlendirebilen kolorektal karsinomda potansiyel olarak kötü bir sonucun iyi kurulmuş bağımsız bir belirtecidir. Ne yazık ki, bildirilebilir bir faktör olarak evrensel kabulü, tümör tomurcuklanmasının hem niteliksel hem de niceliksel yönleriyle ilgili olarak tanımsal tekdüzelik eksikliği nedeniyle geride kalmıştır (127).

İmmunhistokimyal özellikler: KRK'dan metastaz şüphesi olan durumlarda, doğru tanıyı belirlemek için immünohistokimya (İHK) kullanılır. Bazı proteinler kolorektal kanserde daha spesifik olarak ifade edilir ve CK20 ve MUC2 gibi tanısal belirteçler olarak kullanılabilir. İHA, kolorektal ve diğer kanser riskinde artış olan genetik bir bozukluk

olan Lynch sendromunu taramak için de kullanılabilir. Lynch sendromu tanısı, MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 genlerinde spesifik genetik mutasyonlar aranarak konur. İHA testleri, tedaviye rehberlik etmek ve prognozu belirlemeye yardımcı olmak için de kullanılabilir. Tümörden izole edilen belirli belirteçler, belirli kanser türlerini veya farklı tedavilere duyarlılığı gösterebilir. Keratin ekspresyonu İHK testlerinde değişiktir ve keratin 20 pozitifliği ve keratin 7 negatifliği çoğunlukla yaygındır. Bu sonuçlar akciğer, over gibi organların adenokarsinomlarının ayırıcı tanısında önemlidir. KRK'ları çoğu müsin için pozitif boyanır ve MUC1, MUC3 eksprese eder. Tümörle ilişkili glikoprotein (TAG-72), monoklonal antikor B72.3 reaktivitesi sadece invaziv karsinomalarda olmaz, hiperplastik ve adenomatöz poliplerde hatta normal mukozada bile gösterilebilir. Katepsin B'nin artmış ekspresyonu hastalığın özellikle ilerlemiş evrelerinde bulunan bir özelliktir. KRK çoğu İHK testlerde HCG reaktivitesi gösterirler. Bu özellikle müsinöz ve az diferansiye tümörlerde yaygındır. Plasental alkalın fosfataz (PLAP) KRK' %10'unda gösterilmiştir. (128) .

2.4.10. Evreleme

Evreleme tipik olarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (UICC) ve Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC, American Joint Committee on Cancer)'nin TNM evreleme sistemine göre yapılır. Astler-Coller sınıflandırması (1954) ve Dukes sınıflandırması (1932) artık daha az kullanılmaktadır. T, tümör evresi anlamına gelir ve primer tümör kanıtı olmayan 0 ile tümör peritonun yüzeyine nüfuz ettiğinde veya doğrudan diğer organları veya yapıları istila ettiğinde T4'e kadar değişir. N aşaması metastatik lenf düğümlerinin sayısını yansıtır ve 0 (lenf düğümü metastazı yok) ile 2 (dört veya daha fazla lenf düğümü metastazı) arasında değişir ve M aşaması uzak metastaz hakkında bilgi verir (M0, uzak metastaz yok anlamına gelir ve M1 uzak metastaz varlığı için). Tanı anında klinik sınıflandırma (cTNM) yapılır ve MRG ve BT'ye dayanır ve cerrahi sonrası patolojik TNM (pTNM) sınıflandırması yapılır (129).

KRK'lar lokal invazyon derinliğine (T evresi), lenf nodu tutulumuna (N evresi), ve uzak metastazların varlığına (M evresi) (Tablo 2.4 ve 2.5) göre sınıflandırılmaktadır (129). Bu evreler, terapötik kararların temelini oluşturmaktadır.

Tablo 2.4. Kolon kanseri evrelemesi (129)

T	Primer tümör
Tx	Primer tm tespit edilemedi
Tis	Karsinoma in situ: intraepitelyal veya lamina proprianın invazyonu
T1	Submukoza
T2	Muscularis propria
T3	Subseroza/perikolonik doku
T4	Viseral peritona perforasyon (a) veya diğer organlara invazyon (b)
N1	1-3 bölgesel düğüm dahil N1a: 1 lenf düğümü N1b: 2-3 lenf düğümü N1c: Lenf nodu tutulumu yok ancak tümör depozitleri mevcut
N2	4 veya daha fazla bölgesel düğüm dahil N2a: 4-6 lenf nodu N2b: 7 veya daha fazla lenf düğümü
M1	Bir veya birden fazla yere veya organa metastaz veya peritoneal metastaz tespit edilir M1a: Peritoneal metastaz olmadan veya Bir uzak organ veya lenf düğümleri grubu M1b: İki den fazla yer veya organa metastaz, peritoneal metastaz yok M1c: Sadece Peritoneal yüzeye metastaz veya diğer yer veya organa metastazlar birlikte

Tablo 2.5. Rektum kanseri evrelemesi (129)

T	Primer tümör			
Tx	Primer tm tespit edilemedi			
Tis	Karsinoma in situ: intraepitelyal veya lamina proprianın invazyonu			
T1	Submukoza			
T2	Muscularis propria			
T3	Subseroza/perikolonik doku			
T4	Viseral peritona perforasyon (a) veya diğer organlara invazyon (b)			
N1	1-3 bölgesel düğüm dahil N1a: 1 lenf düğümü N1b: 2-3 lenf düğümü N1c: Lenf nodu tutulumu yok ancak tümör depozitleri mevcut			
N2	4 veya daha fazla bölgesel düğüm dahil N2a: 4-6 lenf nodu N2b: 7 veya daha fazla lenf düğümü			
M1	Bir veya birden fazla yere veya organa metastaz veya peritoneal metastaz tespit edilir M1a: Peritoneal metastaz olmadan veya Bir uzak organ veya lenf düğümleri grubu M1b: İki den fazla yer veya organa metastaz, peritoneal metastaz yok M1c: Sadece Peritoneal yüzeye metastaz veya diğer yer veya organa metastazlar birlikte			

	T	N	M
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1-2	N0	M0
Evre IIA	T3	N0	M0
Evre IIB	T4a	N0	M0
Evre IIC	T4b	N0	M0
Evre IIIA	T1-2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
Evre IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-2	N2b	M0
Evre IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
Evre IVA	T1-4	Her N	M1a
Evre IVB	T1-4	Her N	M1b
Evre IVC	T1-4	Her N	M1c

Yayılım yolları; KRK, bir dizi yolla yayılabilir. Bu yayılma yolları, baskın olarak invazyon derinliğine ve lenf nod durumuna göre değişebilmektedir. Damarları içeren tümör yayılımı hastaların %40'ında görülür. Venöz kanalların, vasküler bir "anatomik yol" aracılığıyla uzak bölgelere daha fazla doğrudan erişimi vardır. Tümör hücrelerinin damarlar yoluyla uzak metastatik bölgelere bu hızlı yayılması, lenf düğümü yolları aracılığıyla gerçekleşemez. Tümör hücreleri; direkt yayılım, lenfatik yayılım, hematojen

yayılım, intramural yayılım ve transperitoneal implantasyon yolu ile yayılım gösterebilirler. Lokal tümör yayılımı (lenf nodu metastazları, perinöral ve lenfatik invazyon) ve doğrudan vasküler yolun uzak yayılıma (ekstramural venöz invazyon ve tümör birikimleri) aracılık ettiği tümör yayılımı arasındaki ayrım, prognoz ve tedavi seçimi üzerindeki etkilerin eşit olması muhtemel olmadığı için ayrım yapılmalıdır. Tümörün yayılma yollarının her birini dikkatle incelemek ve belgelemek için gelişmiş radyolojik ve patolojik değerlendirme hassasiyetine ihtiyaç vardır. Yalnızca bu doğru bilgi ile her özelliği doğru bir şekilde ağırlıklandırmak ve gerçek yüksek ve düşük risk gruplarını ayırmaya ve hasta bakımında sonraki gelişmelere izin verecek daha prognostik olarak daha doğru bir evreleme yöntemi geliştirmek mümkün olacaktır (128).

2.4.11. Laboratuvar

KRK hastalarında anemi yaygın olarak tespit edilmektedir. Tam kan sayımı ile hemoglobin değerleri kontrol edilebilir. Metastatik hastalarda kolestaza bağlı olarak karaciğer fonksiyon testleri ve kolestaz enzimleri yükselebilir. İkili tümör marker testi (CEA CA19-9), KRK tedavisi gören hastalar için diğer testlere ek olarak kullanılabilir. Tümör belirteç testleri, kanda kolorektal kanserin üretebileceği bu iki maddeyi kontrol etmek için kullanılır. Testler, uygun bir tedavi yönteminin ve bazen hastalığın tekrarlama olasılığının belirlenmesine yardımcı olabilir. CEA KRK hastalarının çoğunda yüksektir. Ayırıcı tanıda uzun süre sigara içenlerde, İBH’de, meme ve prostat kanserlerinde de CEA düzeyleri yükselebilir. CEA yüksekliği primer tanıdan ziyade hastalığın nüksünü göstermede etkilidir. Serum villin düzeyleri, genomik tümör değerlendirmesi, nutrisyonel panel, GGK ve gaitada DNA testi KRK’da kullanılabilir testlerdir.

2.4.12. Kolorektal Kanser Tedavisi

Kolorektal kanserin moleküler itici güçleri tanımlanmış olmasına rağmen, burada bir tümörün oluştuğu bağırsak lokalizasyonu, tedavi için farklı yönetimine sahip olabilir. Yani kolon kanseri ve rektum kanseri, evrelerine göre de farklı yaklaşımlar gerektiren iki ayrı kanserdir. Farklı ülkelerdeki kanser kayıtları kolorektal kanser tedavisinden sonraki sonuçlarda büyük farklılıklar göstermekle birlikte, bir iyileşme eğilimi ortaya çıkmaktadır (130). Gerçekten de tedavinin sonuç üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak son derece önemlidir ve bunun için, uygulamayı eleştirel olarak değerlendirmek için nüfusa dayalı kayıtlar ve denetimler kullanılır.

2.4.12.1. Cerrahi tedavi: Cerrahi, metastaz yapmayan KRK'lı hastalarda temel küratif tedavidir. Bununla birlikte, sonuç, ameliyatın kalitesi, ameliyat öncesi evrelemenin kalitesi ve tedavi seçimi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Diseksiyon ideal olarak tümörün ve lenfatik yayılımın ana bölgesinin çıkarılmasını sağlamak için embriyolojik anatomik düzlemleri takip etmelidir. Çevresel cerrahi rezeksiyon sınırlarına özel dikkat gösterilmelidir (131). Daha ileri rektum kanseri vakalarında, neoadjuvan tedavi (örneğin, T4 kolon kanseri için ameliyat öncesi kemoterapi ve lokal olarak ilerlemiş kanser için (kemo)radyoterapi) tümör yükünü ve hatta tümör evresini azaltabilir ve başarılı rezeksiyon şansını optimize etmek için gerekli olabilir (132). Bu nedenle tedaviye başlamadan önce yeterli evreleme bilgisine dayalı multidisipliner bir yaklaşım zorunludur (133).

Ameliyat öncesi değerlendirme ameliyat için bir hastayı değerlendirirken, yaşı, zindeliği/performans durumu, perioperatif yönetim planı, tümör evrelemesi, cerrahi türü (rezeksiyon düzlemleri ve rekonstrüksiyon dahil) ve kalite güvencesi gibi çeşitli faktörler önemlidir. Yaş açısından, KRK'lı yaşlı hastalar, genç meslektaşlarına göre daha düşük genel sağkalım oranlarına sahiptir (130). Gerçekten de postoperatif mortalite oranları yaşlılarda postoperatif erken dönemde (ilk 30 gün) artar ve postoperatif ilk 6-12 ayda ikiye katlayabilir. Bununla birlikte, bir grup olarak "yaşlı hastalar", değişen komorbiditeleri, cerrahiye uygunluk dereceleri ve postoperatif komplikasyon riskleri ile heterojendir. Buna göre yaş tek başına ameliyat etmemek için bir neden olmamalıdır. KRK cerrahisi öncesinde hastaların yaklaşık %4'ünde görülen senkron kanserleri ekarte etmek için tüm kolon hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir. Preoperatif endoskopi tümör obstrüksiyonu nedeniyle tamamlanmamışsa, kolonun görüntülenmesi ya ameliyattan önce BT kolonografi ile tamamlanmalı ya da cerrahi rezeksiyondan sonraki 3 ay içinde endoskopi yapılmalıdır. Akciğer ve karaciğerde uzak metastazların göğüs ve karın BT'si ile aktif olarak aranması da cerrahi öncesi önerilir. CEA, postoperatif sürveyans için bir temel değer sağlamak üzere tercihen KRK cerrahisinden önce elde edilir. Ailesinde KRK öyküsü pozitif olan genç hastalarda genetik danışmanlık önerilir. Cerrahi travmayı en aza indirmek için hızlı takip protokolleri ve laparoskopi düşünülmelidir. Obstrüktif kolorektal hastalığı olanlarda abdominal BT görüntüleme ayrıca T4 veya evre IV hastalığı da değerlendirilebilir. Rektum kanserli hastalarda, planlama amacıyla, ayrıca tümörü mezorektal fasya ile ilişkili olarak ayırt etmek ve T evresini değerlendirmek için pelvisin preoperatif MRG görüntülenmesi önerilir (134). Bu bilgi, preoperatif (kemo)radyoterapi

için T3c, T3d ve T4 tümörleri olan hastaları seçmek için gereklidir. Kolon cerrahisi KRK'nın laparoskopik rezeksiyonunun açık cerrahi kadar güvenli olduğu gösterilmiştir (135). Herhangi bir cerrahi prosedürde olduğu gibi, ekibin laparoskopik kolorektal cerrahide yetenekli olması ve uygun hastaları seçmesi gerekir. Laparoskopik yaklaşım için kontrendikasyonlar ciddi obezite, geçirilmiş karın ameliyatlarına bağlı ileri derecede yapışıklar ve ileri evre hastalıktır (136). Laparoskopik işlem sırasında açık cerrahiye geçiş gerekiyorsa, bu ne kadar erken yapılırsa sonuçlar o kadar iyi olur.

Kolon cerrahisinde üreter, duodenum, pankreas ve dalağa zarar vermemek için mezokolon ile parietal boşluk duvarı ve retroperitonun anatomik düzlemleri izlenmelidir. Ayrıca mezenterik sınırlar doğru bir şekilde planlanarak anastomoz için kalan barsak anslarının yeterli şekilde vaskülarizasyonu sağlanır. Anastomoz kaçığının korkulan komplikasyonundan kaçınmak için gerilimsiz ve torsiyonsuz bir anastomoz oluşturulmalıdır.

2.4.12.2. Primer hastalıkta sistemik tedaviler: KRK'lı hastaların sistemik tedavisi, rektal kanser için neoadjuvan düzende ve kolon kanseri için adjuvan düzende önemli gelişmelerle birlikte, son yirmi yılda önemli ölçüde gelişmiştir.

Neoadjuvan tedavi; kolon kanseri için kabul edilmiş bir neoadjuvan tedavi yoktur. Bununla birlikte, rektum kanseri için, orta ve ileri evre kanserlerde lokal nüks oranını azaltmak için neoadjuvan radyoterapi veya kemoradyoterapi önerilir (örneğin, alçak anterior yerleşimli cT2 lezyonları, çoğu T3 lezyonu, sınırlı periton tutulumu olan bazı T4a lezyonları, N+ lezyonlar, cT3 mezorektal fasyayı invaze eden lezyonlar ve pozitif lateral düğümleri olan cT4a ve cT4b lezyonları). Neoadjuvan tedavi, kısa süreli radyoterapi ve ardından cerrahi olarak veya 5-florourasil veya kapesitabin (bir oral floropirimidin) ile kemoradyoterapi olarak verilebilir. Lokal nüksü azaltmada preoperatif (kemo-)radyoterapi postoperatif tedaviden daha etkili olsa da genel sağkalımı iyileştirmez (138). Kemoradyoterapi rejimini yoğunlaştırarak neoadjuvan tedaviyi iyileştirmeyi amaçlayan stratejiler (örneğin, radyoterapi ile 5-florourasil kullanmak yerine 5-florourasil ve oksaliplatinin radyoterapi ile birleştirilmesi) net sağkalım yararları göstermedi, ancak toksisiteyi artırdı (139); daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Adjuvan tedavi; T3, T4a, T4b ve N0M0 kolon kanserleri UICC evre II için tek başına cerrahi ile iyileşme oranı yüksektir ve hastaların sadece yaklaşık %5'i adjuvan kemoterapiden yarar görür. Bununla birlikte, Avrupa ve Japon toplumları tarafından

onaylanan kılavuzlar, yüksek riskli vakalarda (yani, kötü diferansiye tümörlerde; <12 lenf nodu rezeke edildiğinde; vasküler, lenfatik veya perinöral tümör invazyonu olan vakalarda; obstrüktif veya perfore tümörler veya pT4 evreli tümörler) adjuvan tedaviyi önermektedir (180). Buna karşılık, adjuvan tedavi UICC evre III tümörler için standarttır (herhangi bir T, N1–2 (3 veya daha fazla pozitif düğüm), M0); 5-florourasil (XELOX protokolünde olduğu gibi ağızdan veya FOLFOX4 protokolünde olduğu gibi damardan) artı oksaliplatin kombinasyonu kullanılır.

Şu anda, hedefe yönelik tedavilerin (epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) özgü veya vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) özgü monoklonal antikorlar gibi) eklenmesinin adjuvan ayarındaki hastalar için sonucu iyileştirdiğini destekleyen hiçbir veri yoktur (140). Birleştirilmiş analizlerden elde edilen veriler, 70 yaşından büyük hastaların adjuvan ortamda oksaliplatin bazlı kemoterapi kombinasyonlarından çok fazla fayda görmeyebileceğini göstermektedir. Bu hastalar, daha genç hastalara benzer şekilde floropirimidin kemoterapisinden fayda görebilir (141). Rektum kanseri için ameliyat öncesi tedavi verilmemiş ve belirli risk faktörleri (pozitif rezeksiyon sınırları, tümör alanında perforasyon veya mezorektumdaki defektler dahil) varsa ameliyat sonrası kemoradyoterapi uygulanabilir; adjuvan kemoterapi tipik olarak floropirimidinleri kullanır.

2.4.12.3. Metastatik hastalık: Hastaların sağkalımı son yirmi yılda önemli ölçüde iyileşmiştir ve klinik çalışmalarda ortalama 30 aylık bir genel sağkalım elde edilmiştir. Sağkalımdaki bu iyileşme, oksaliplatin ve irinotekan gibi kemoterapötiklerin kullanımına, tümörün veya mikroçevresinin spesifik özelliklerini ele alan hedefe yönelik tedavilerin tanıtımına ve karaciğer metastazlarının cerrahi rezeksiyonu dahil olmak üzere multidisipliner yaklaşımların dahil edilmesine bağlanabilir.

Kemoterapi kombinasyonları; metastatik hastalığın birinci basamak tedavisi için kemoterapi omurgası tipik olarak 5-florourasil, lökovorin ve oksaliplatin (FOLFOX protokolü) veya irinotekanın (FOLFIRI protokolü) bir kombinasyonudur. FOLFOX rejimindeki 5-Florourasil, kapesitabin ile değiştirilebilir, ancak kapesitabin ile irinotekan kombinasyonu FOLFIRI'den daha toksiktir. 5-florourasil, lökovorin, oksaliplatin ve irinotekandan (FOLFOXIRI protokolü) oluşan ikili (iki kemoterapötik ajan) ve üçlü (üç kemoterapötik ajan) kemoterapi rejimlerinin etkili olduğu gösterilmiştir (119). Tek ajan floropirimidin ile karşılaştırıldığında, kombinasyon kemoterapisi daha iyi tümör

büyümesi kontrolü sağlar. Bununla birlikte, özellikle yaşlı ve zayıf hastalar, ilk tek ajan floropirimidin kemoterapisi veya VEGF-A hedefli tedavi ile kombine floropirimidin (bevacizumab; aşağıya bakınız) ile sıralı bir yaklaşımdan fayda görebilir.

Hedefe yönelik tedaviler; bu kombine kemoterapi rejimlerinin yanı sıra metastatik kolorektal kanser tedavisi için hedefe yönelik ajanlar kullanılmaktadır. Bunlar özellikle üç ana ilaç grubunu içerir: EGFR'ye karşı monoklonal antikorlar (setuksimab ve panitumumab), VEGF-A'ya karşı monoklonal antikorlar (bevacizumab) ve çoklu proanjiyogenik büyüme faktörlerini (örneğin aflibercept) hedefleyen füzyon proteinleri ve küçük molekül- bazlı multikinaz inhibitörleri (örneğin, regorafenib).

Tüm KRK'ların yaklaşık %80'i EGFR'yi eksprese eder veya aşırı eksprese eder; aşırı ekspresyon, azalan sağkalım ve artan metastaz riski ile ilişkilidir. EGFR tirozin kinaz, reseptörün hücre dışı alanına özgü monoklonal antikorlar, çözünür ligandı bağlayan ve bloke eden yem reseptörleri veya reseptör dimerizasyonunu engelleyen veya sitoplazmik tirozin kinaz alanının ATP bağlama cebine uyan küçük moleküller tarafından bloke edilebilir. KRK'daki çoğu klinik veri, rekombinant bir kimerik monoklonal IgG1 antikoru olan setuksimab ve bir insan EGFR'ye özgü antikoru olan panitumumab gibi reseptör bloke eden antikorlar için mevcuttur. Bu antikorlar, daha kemoterapi almamış hastalarda olduğu kadar, tümörlerin genel yanıt oranını iyileştirerek tümörleri kemoterapiye dirençli olan hastalarda da etkinlik gösterir. Bu stratejiler ayrıca mKRK'li hastalarda progresyonsuz sağkalımı (PFS) ve hatta genel sağkalımı iyileştirir. Ancak bu ajanların etkinliği için bir ön koşul, tümörlerin KRAS ve NRAS'ta aktive edici mutasyonlar barındırmamasıdır (143).

RAS, tüm KRK'ların yaklaşık yarısında mutasyona uğrar, kodonlar 12 ve 13 en yaygın olarak etkilenir; KRAS'ın 61 ve 146 kodonları ve NRAS'ın 12, 13 ve 61 kodonları daha az oranda etkilenir. HRAS mutasyonları şimdiye kadar KRK'da tanımlanmamıştır. Mutasyonlar, Ras GTPaz'ı yapısal olarak aktif hale getirir; aktif Ras, çok sayıda tümörijenik hücre içi sinyal yolunu indükler. Bu nedenle, EGFR'ye özgü antikorlarla tedaviden önce tümörün Ras durumu incelenmelidir.

Tümörler kritik boyuta ulaştıklarında kendilerine ait bir damar ağı oluştururlar (119). Buna göre, tümör anjiyogenezinin ana efektörü, VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye bağlanan salgılanan glikoprotein VEGF-A'dır. VEGF-A, birçok tümör ve stromal hücre tarafından üretilir ve endotel hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü destekler ve damar

geçirgenliğini artırır. VEGF ayrıca çeşitli tümör hücreleri için bir büyüme faktörüdür. VEGF'ye özgü tedaviler mKRRK'da kullanılır, ancak kesin etki mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Bu bileşikler, iyileştirilmiş tümör oksijenasyonuna ve kemoterapinin verilmesine yol açacak olan düzensiz tümör vaskülatürünü normalleştirerek hareket edebilir (143). Henüz anti-anjiyogenik ajanlar için prediktif (öngörücü) biyobelirteç yoktur. Bevacizumab, metastatik ortamda kemoterapi ile kombinasyon halinde etkinlik göstermiştir; 5-florourasil ve irinotekan ile kombine edildiğinde, bevacizumab, tek başına kemoterapiye kıyasla, bir Faz III çalışmasında hastaların medyan PFS'sini ve medyan genel sağkalımını önemli ölçüde iyileştirdi (144).

Bevacizumabın eklenmesi, floropirimidin ve oksaliptatin kombinasyonu alan hastalarda medyan PFS'yi de önemli ölçüde iyileştirmiştir. İlginç bir şekilde, bevacizumab ve 5-florourasil/oksaliptatin kombinasyonu, kemorefrakter metastatik hastalığı olan hastalarda tek başına kemoterapiye kıyasla tümör yanıtında, medyan PFS'de ve medyan genel sağkalımda önemli bir iyileşme sağladı (145). Bevacizumab ayrıca hastalık progresyonundan sonra bile tedaviye devam edildiğinde hastalara hayatta kalma avantajı sağlayan birkaç bileşikten biridir (146).

Aflibercept ayrıca anjiyogenezi hedefler. Bu ilaç, insan VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin hücre dışı alanlarından VEGF bağlayıcı kısımlardan insan IgG1 immünoglobulinin Fc kısmına kaynaşmış bir rekombinant füzyon proteindir. Aflibercept ayrıca plasenta büyüme faktörünü (PLGF) bağlar ve bu nedenle bevacizumab'dan biraz daha geniş bir antianjiyogenik aktiviteye sahiptir. Aflibercept'in metastatik hastalığın ikinci basamak tedavisinde FOLFIRI ile kombinasyon halinde kullanıldığında PFS'yi ve genel sağkalımı iyileştirdiği gösterilmiştir (147).

Metastatik rezeksiyon; teknik olarak R0 rezektabl olan izole karaciğer ve/veya akciğer metastazları olan kolorektal kanserli hastalar için, özellikle metastazların sayısı ve boyutu sınırlı olduğunda, cerrahi düşünülmelidir. Bu gruptaki 5 yıllık genel sağkalım oranı yaklaşık %20'dir (148), bu da metastatik hastalık için etkileyici bir rakamdır. Bir klinik deney, bu hasta grubunda perioperatif bir FOLFOX protokolü kullanmış ve PFS'de bir iyileşme göstermiştir, ancak tek başına cerrahi ile karşılaştırıldığında genel sağkalım açısından anlamlı bir farklılık göstermemiştir (142). İzole karaciğer ve/veya akciğer metastazı olan hastaların çoğunda, öncelikle bir R0 rezeksiyonu gerçekleştirilemez. Bununla birlikte, metastazlar küçültülebilir ve adjuvan kemoterapi ile birleştirilebilirse, 5

yıllık genel sağkalım oranı R0 rezeksiyonlarına benzerdir (147). Bu durumda, hastalığı rezektabl duruma 'dönüştürmek' için en aktif kemoterapi uygulanmalıdır; FOLFOXIRI üçlü kemoterapi rejimi yüksek bir yanıt oranı sağlar (yaklaşık %60) (149). FIRE3 çalışmasının verilerine göre, FOLFIRI ile kombinasyon halinde EGFR'ye özgü antikorlar, FOLFIRI artı bevacizumab'dan daha belirgin tümör küçülmesine neden oluyor gibi görünmektedir. Bu nedenle, tümör RAS wild tip ise bu kombinasyon bir seçenektir (150). Sekonder rezektabilite için metastazları küçültmek amacıyla daha aktif bir tedavi kullanılıyorsa, tümörün multidisipliner bir ekip tarafından düzenli olarak yeniden değerlendirilmesini ve bir R0 rezeksiyonu sırasında en mümkün erken zaman noktasında metastaz rezeksiyonunun yapılmasını sağlamak önemlidir. Bunu yaparken kemoterapi toksisitesi azalır ve perioperatif morbidite en aza indirilir. BT görüntülemeye metastazların “kaybolması” çoğu hastada metastazların tamamen yok edildiğini göstermez ve cerrahın tüm lezyonları tamamen rezeke etmesini zorlaştırır (151).

2.4.12.4. Peritoneal kanser yönetimi: Lenfatik ve hematojen yayılma yollarının yanı sıra, KRK sıklıkla tümör hücrelerinin periton boşluğunda transkölomik yayılmasına yol açar ve bu da sonuçta peritoneal karsinomatozise (PC) yol açar (77). Kolorektal PC, hastalığın son evrelerindeki bu hastalar için kötü prognoz ve kötü yaşam kalitesi ile ilişkilidir (78). Son zamanlardaki genomik profillemeye çalışmaları, KRK'nin karaciğere, peritona veya her ikisine yayılmasını belirleyen farklı gen ekspresyon paternleri göstermiştir. Preoperatif görüntüleme tekniklerinin (BT, MRI, PET, PET/BT) düşük duyarlılığı ve yayınlanmış yöntem ve bulguların heterojenliği nedeniyle PC'nin kesin insidansı bilinmemektedir (77). Jayne ve arkadaşları (85) 3019 KRK hastasından oluşan bir veri tabanı kullanarak bu hastaların %8'inin senkron PC ve %5'inin metakron hastalık ile başvurduğunu bildirdi. İsveç'te Stockholm İlçesinden yakın zamanda yapılan bir popülasyon temelli kohort çalışmasında, 11124 KRK hastasının %4.3'üne senkron PC ve %4'üne metakron PC tanısı konmuştur (152). Senkron grupta, hastaların %50'sinden fazlası, tek tümör yayılım yeri olarak peritoneal metastazlarla başvurdu (152).

Geçmişte, onkologlar ve cerrahlar, PC'nin uzak metastazlarla aynı olduğunu varsaydılar ve bu nedenle, onu yalnızca palyatif tedavi seçeneklerine açık olan intraabdominal malignitenin tedavi edilemez bir bileşeni olarak gördüler. PC'lı hastalarda sistemik kemoterapi, 15.2 aylık medyan genel sağkalım ile uzun süreli sağkalım ile sonuçlanmadı ve bu hastaların hastalığın son evrelerinde kötü yaşam kalitesi elde edildi

(153). Sitoredüktif cerrahi (CRS) ve hipertermik intraperitoneal peroperatif kemoterapiyi (HIPEK) birleştiren yeni bir bölgesel tedavi yöntemi, kolorektal PC'li hastalarda umut verici klinik sonuçlar göstermiştir. Bu durumda, KRS standardize peritonektomi prosedürleri ve multiviseral rezeksiyonlar yoluyla tüm makroskopik tümörü çıkarmayı amaçlarken, müteakip intraoperatif kemoterapi tüm rezidüel mikroskobik tümörü ortadan kaldırmayı amaçlar. Bu yeni yaklaşım, birkaç faz II ve III çalışmasında cesaret verici klinik sonuçlar göstermiştir (154). Bununla birlikte, KRS ve HIPEK, yaklaşık %34'lük önemli bir morbidite (derece III-V komplikasyonlar) ve %4'lük bir 30 günlük mortalite ile ilişkilidir (155). Bu nedenle, gereksiz toksisiteden kaçınmak için dikkatli hasta seçimi çok önemlidir (156). Bu yazının amacı, özellikle peritona odaklanarak, kolorektal PC gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmalarla ilgili güncel verileri gözden geçirmektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HASTALAR VE ETİK

Çalışma Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği, Patoloji Kliniği, Tıbbi Onkoloji Kliniği ve Tıbbi Biyoloji kliniği tarafınca multidisipliner olarak planlandı. Genel Cerrahi ve Onkoloji Kliniklerinde kolorektal kanser kaynaklı peritoneal karsinomatozis ve karaciğer metastazı nedeniyle ameliyat edilen hastalar çalışmaya dâhil edildi. Çalışmaya KRK nedeniyle peritoneal karsinomatozis ve karaciğer metastazı gelişen 74 hasta katıldı. Bu hastalar öncelikli olarak ikiye bölündü: KRK nedeniyle peritonitis karsinomatozis gelişen hastalar (n=46) (Grup 1) ve KRK nedeniyle karaciğer metastazı gelişen hastalar (n=28) (Grup 2). Bununla birlikte, çalışmada hastaların 130 parafin bloğu kabul edildi. Hastalardan alınan spesmenler AKT geni açısından dört gruba ayrıldı; KRK'lı dokular, KRK'ya bağlı peritonitis karsinomatozal dokular, KRK'ya bağlı karaciğer metastazlı dokular ve normal dokulardı. Ayrıca, hastalardan alınan spesmenler miR-99b ve miR-135b açısından sırasıyla dörter gruba ayrılarak, KRK'lı dokular, KRK'ya bağlı peritonitis karsinomatozal dokular, KRK'ya bağlı karaciğer metastazlı dokular ve normal dokular olmak üzere toplam 163 adet miRNA çalışılmıştır.

Çalışmada elde edilen verilerin analiziyle gruplar kendi aralarında klinik özellikler ve parafin blokların sonuçları açısından karşılaştırıldı. Çalışmanın etik kurul onayı Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulundan sayı ile alınmıştır (E.71522473-050.01.04-128389-139).

3.2. ARAŞTIRMAYA DÂHİL EDİLME VE EDİLMEME KRİTERLERİ

Çalışmaya gönüllü katılım esasına dayanılarak yapıldı. Hastalara veya hasta yakınlarına okumaları için bilgilendirilmiş gönüllü olur formu verildi. Hastalara isimlerinin veya Türkiye Cumhuriyeti kimlik numaralarının sadece tıbbi bilgilere ulaşmak amaçlı alındığı, çalışma sonunda kimlik bilgilerinin herhangi bir koşulda açıklanmayacağı açıkça bildirildi. Çalışma sosyal güvenlik kurumuna (SGK) veya çalışmayı yapana herhangi bir maliyet getirmemiştir. Çalışmaya dâhil edilme kriterleri; kolorektal kanser nedeniyle peritoneal kanser veya karaciğer metastazı gelişen hastalar,

18 yaş üzerindeki hastalar, hemodinamik olarak stabil hastalar (trombosit sayısı $> 50000/\text{mm}^3$, INR < 1.5 IU, Protrombin zamanı < 15 saniye, aktif parsiyel tromboplastin zamanının 30-40 saniye olmasıdır.), uygun parafin bloklarına ulaşılan hastalardır. Dâhil edilmeme kriterleri; 18 yaş altındaki hastalar, hemodinamik olarak stabil olmayan hastalar, çalışmaya katılmayı reddedenler, multipl organ yetmezliği ve immün suprese hastalar, kolorektal kanser dışı kansere bağlı gelişen peritoneal kanserdir.

3.3. HİSTOPATOLOJİK ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden, 137 adet kolorektal kansere bağlı gelişen peritoneal karsinomatozisli ve karaciğer metastaz tanısı konmuş ve kontrol grubu dahil lamaları ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Lamaların incelenmesinden sonra uygun olan kolorektal kansere bağlı gelişen peritoneal karsinomatozisli ve karaciğer metastazlı ve kontrol grubu parafin doku blokları çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu olarak distal veya proksimal cerrahi sınırlar değerlendirilmeye alındı. Bu preparatlar deneyimli bir patolog tarafından değerlendirilerek AKT immunboyama uygun olanlar ortaya kondu. Çalışmada, patolog tarafından kolorektal kansere bağlı peritoneal karsinomatozisli ve karaciğer metastazlı ve kontrol grubu dahil toplam 137 örneğe ait kesitlerin histopatolojik değerlendirmesi neticesinde dört grup yapıldı. Buna göre; 137 örneğin 49 tanesinin kolorektal kanserli ($n=49$), 28 tanesinin peritoneal kanserli ($n=28$), 35 tanesinin karaciğer metastazlı ($n=35$) ve 28 tanesinin normal doku (Kontrol grubu, $n=28$) olduğu saptandı. Standardizasyon açısından, çalışma gruplarındaki örnek sayılarını dengeleyebilmek amacıyla kontrol grubundaki örnek sayısı 28 ($n=28$) olarak belirlendi. Böylece, tez çalışmamızın immunohistokimyasal ve moleküler biyolojik laboratuvar çalışmalarında, kolorektal kansere bağlı peritoneal karsinomatozisli ve karaciğer metastazlı ve kontrol grubu dahil doku örneklerini içeren toplam 130 adet parafin blok kullanıldı. Çalışmamızda kullanılan parafin doku örneklerini açısından yerel etik kurulundan onam alındı.

3.4. HİSTOPATOLOJİK İŞLEMLER

3.4.1. Işıık Mikroskobik Kesitlerin Elde Edilmesi

Parafin doku bloklarından *Thermo Scientific Microm HM40E* (Thermo Scientific™, Walldorf, Almanya) markalı mikrotom kullanılarak, histopatolojik değerlendirme için rodajlı normal lamlara ve immunohistokimyasal boyamalar için poly-L lizin kaplı lamlara (Citoglas™, Adhesin Microscope Slides, Citotest Labwere Manufacturing Co. Ltd, Çin Halk Cumhuriyeti) 4-5 mikrometre kalınlığında seri kesitler alındı. Tüm örneklerden rodajlı normal lamlara alınan ışık mikroskobik kesitler hematoksilen eozin (H&E) ile boyandı ve bir patolog tarafından incelenerek değerlendirildi.

3.4.2. Hematoksilen Eozin Boyama İşlemi

Çalışmada parafin kesitler, H&E ile boyama işlemine geçmeden önce deparafinizasyon için *Memmert UN55* (Memmert™, GmbH+Co. KG, Schwabach, Almanya) marka etüvde 70 °C’de 1 saat bekletildi. H&E boyama işlemi, *Leica* marka Lam Boyama/Lam Kapama Cihazında (*Leica™ AutoStainer XL, ST5010*, Buffalo Grove, IL, Amerika Birleşik Devletleri) otomatik olarak yapıldı. H&E boyama prosedürü sırasıyla; kesitlerde kalan parafinin uzaklaştırılması için ksilenden geçirme, rehidratasyon için yüksekte düşüğe doğru dereceli etil alkol serilerinden geçirme, Harris’in hematoksileni (*Sitogen™*, Bright slide C.I. 75290, İstanbul, Türkiye) ve Eozin Y (*Sitogen™*, Bright slide, Eosin Y Water Solution, İstanbul, Türkiye) ile boyama, takiben dehidratasyon için düşüğe yükseğe doğru dereceli etil alkol serilerinden geçirme ve ksilolde şeffaflaştırma basamakları şeklinde cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi. Boyanan kesitler entellan (*Merck™*, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldıktan sonra, *Nikon DS-Fi²/ DIGITAL SIGHT DS-U³* (Nikon Instruments Inc., Japonya) marka bir dijital kamera monte edilmiş *Nikon ECLIPSE* (Nikon, Tokyo, Japonya) marka ışık mikroskobunda incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.4.3. İmmunohistokimyasal Yöntem

İmmunohistokimyasal boyama için ab182729 AK1-AKT2 (EPR17062) antikoru kullanıldı. ABCAM Cambridge CB2 0AX, UK firmasından tedarik edilen; ab182729 AK1-AKT2 (EPR17062) antikoru ile 1:1200 antikor dilüsyonu ile 60 dakikaAntikor inkübasyonu uygulandı. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conduitioning 1 (CC1) (EDTA) ile CC1 60 dakika standart protokolü uygulandı.

Sekonder görüntüleme için ROCHE/UltraView Universal DAB detection Kit ile Standart UltraView immünohistokimya (IHC) protokolü uygulandı, tüm işlemler ROCHE/Ventana BenchMark XT IHC Stainer cihazı üzerinde yapıldı.

3.4.4. İmmünohistokimyasal Skorlama Sistemi

Tümör hücrelerindeki AKT boyanma skorlaması, beş gruptan oluşan bir skala oluşturularak yapıldı. Buna göre; grade 0: Boyanma olmaması ya da tümör hücrelerinin %10 undan azında boyanma, grade 1: %10- %25 boyanma, grade 2: %26-%50 boyanma, grade 3: %51-%75, grade 4: %76-%100 idi. İmmünohistokimyasal boyanma sitoplazmik ve nükleer boyanma dikkate alınarak değerlendirildi (196).

3.5. MUTASYON TANIMLAMA

KRK'da %30-40, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde %10-30, pankreas kanserlerinde ise %90 oranında KRAS gen mutasyonları saptanmaktadır. Bununla birlikte, KRK olgularının %3-4'ünde NRAS gen mutasyonları gözlenmektedir. Saptanan mutasyonlar; Tirozin Kinaz İnhibitör (TKİ) ve Monoklonal Antikor (MAB) tedavisi gibi Anti-EGFR tedavilerine kötü yanıt verirler. Bu nedenle KRAS ve NRAS mutasyon analizi hastaların tedavisinde belirleyici rol oynamaktadır. KRAS mutasyonları; sıklıkla, ekzon 1 içerisinde yer alan kodon 12 (%80) ve 13 (%15) ile ekzon 2 içerisinde yer alan kodon 61'de bulunmaktadır. Hastalarda en sık Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Ser, Gly12Val, Gly13Asp mutasyonları gözlenir. NRAS mutasyonları ise sıklıkla kodon 61 bölgesinde gözlenebilmektedir (4). Çalışmada KRAS ve NRAS mutasyon tespiti daha önce hizmet alım yöntemi ile yapılmıştır ve ayrıca KRAS ve NRAS elde edilen verileri hastane veri tabanından etik kurul onayı alınarak elde edilmiştir.

3.5.1. Mutasyon analiz tekniği

Hastadan alınan örnekten elde edilen DNA materyalinde, KRAS geni 1, 2 ve 3. ekzonları içerisinde mutasyonların gözlemlendiği kodonlara spesifik primerler kullanılarak nested PCR (2 aşamalı) yöntemi ile çoğaltılması işlemi uygulanmıştır. Daha sonra, hedef mutasyon bölgelerinin minisekans (minisequencing) tekniği ile tespit edilebilmesi için bu ürünler floresan işaretli ddNTP ler kullanılarak işaretlenmiştir. Kapiller elektroforez tekniği kullanılarak KRAS veya NRAS mutasyon analizleri yapılmıştır. İncelenen

ekzonlar aşağıdaki gibidir: KRAS için kodon 12, 13, 59, 61, 117 ve 146; NRAS mutasyonları için kodon 12, 13, 59, 61 ve 146.

3.6. MİRNA ANALİZİ

3.6.1. Hasta popülasyonu

Bu çalışmada KRK nedeniyle peritoneal kanser ve karaciğer metastazı gelişen hastaların örneklerine ait parafin bloklar (her grupta yaklaşık 20 adet olmak üzere toplamda adet 29 hastanın 163 dokusu) kullanılmıştır.

3.6.2. Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

3.6.2.1. Deparafinizasyon-RNA izolasyonu: RNA izolasyonunda belirlenen hastalara ait 2016-2020 yılları arasında alınmış olan tümör, periton metastazı, karaciğer metastazı ve normal dokulara ait parafin bloklar kullanıldı. Parafin bloklardan RNA izolasyonu için öncelikle parafine gömülü olarak bulunan dokulardan mikrotom cihazı ile 20 µm kalınlığında 5-10 kesit alınarak tüplere konuldu. Elde edilen bu kesitlerden parafini uzaklaştırmak için her bir tüpe 1 ml ksilen eklendi ve vorteks işlemi yapıldı. Vorteks yapılan örnekler 12.000 rpm’de 5 dakika santrifüj (Nüve, Türkiye) edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı atılarak 2 kere saf alkol ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkanan örnekler 15 dakika oda sıcaklığında kurutulmaya bırakıldı. Kuruyan örneklerin her birine proteinaz K içeren tampon çözeltiden 200 µl eklendi ve 5 dakika vorteks işlemi yapıldı. Buffer içeren her örnek parafinin erimesi için 55°C’deki ısıtıcı blokta gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün örnekler 90°C’de 30 dakika bekletildi. İnkübasyon sonrası örnekler RNA izolasyonuna alındı.

Parafin bloklardan elde edilen parafini uzaklaştırılmış doku örnekleri Trizol (Thermo Fisher Scientific) RNA izolasyon reagenti kullanılarak RNA izolasyonuna tabi tutuldu. Bu amaçla ısıtıcı bloktan alınan her bir örneğe 250 µl Trizol eklendi ve vorteks işlemi yapıldı. İnkübasyon sonrası her bir örneğe 200 µl kloroform eklendi ve oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler 12.000 g’de 15 dakika 4°C’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası her bir örnekten elde edilen üç fazdan en üst faz temiz bir tüpe alındı. Elde edilen üst faz üzerine her bir örneğe 500 µl izopropanol eklendi ve

oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler 12.000 g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası her bir örnekten üst faz atılarak elde edilen pellete 1 mL %75 etanol eklendi ve 7500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası her bir örnekten üst faz döküldü ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnekler üzerine 30 µl distile su eklenerek 55°C'de ısıtıcı blokta inkübe edildi ve örnekler komplementer DNA (cDNA) çevriminde kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

3.6.2.2. cDNA sentezi: Her bir örnekten elde edilen total RNA'ların cDNA çevrimi öncesi miktar tayini Qubit 4 (Thermo Scientific) spektrofotometre cihazı ile yapıldı. Miktarı belirlenen RNA'lar miRNA All-In-One cDNA Synthesis Kit (Abm, Kanada) kullanılarak ile üretici firmanın önerdiği protokole göre 37 °C'de 30 dakika, 50 °C'de 15 dakika ve 85 °C'de 5 dakika bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar RT-PCR analizinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. RT-PCR karışımın hazırlanışı

Bileşen	Hacim
5X RT Tamponu	4,0 µL
dNTP	1,0 µL
Primers	1,0 µL
RTase	1,0 µL
Total RNA	100 ng
Nuclease-free su	20,0 µL'ye kadar
Toplam hacim	20,0 µL

3.6.2.3. RT-PCR analizi: Elde edilen cDNA’lardan hsa-miR-99b-5p (MPH03979, Abm, Kanada) ve hsa-miR-135b-5p (MPH02185, Abm, Kanada) ekspresyon düzeylerinde değişiklikleri analiz etmek için RT-PCR, StepOnePlus Real-Time PCR Systems (v. 2.0, Applied Biosystems) ile Luna® Universal qPCR Master Mix, (NEB, İngiltere) reaksiyon 96 kuyucuklu optik reaksiyon plakalarında gerçekleştirildi. Kontrol miRNA olarak U6-2 (MPH00001, Abm, Kanada) kullanıldı. Reaksiyon içerikleri Tablo 3.2’de verildiği şekilde oluşturuldu.

Tablo 3.2. RT-PCR reaksiyon içeriği

Reaksiyon	1X
Master mix	5 µL
Primer	1 µL
dH ₂ O	2 µL
cDNA	2 µL
Toplam Hacim	10 µL

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz, SPSS sürüm 22.0 kullanılarak değerlendirildi (IBM Corp., Armonk, NY, ABD). Bu çalışmayı değerlendirmek için tanımlayıcı istatistiksel yöntemler kullanıldı. Kategorik veriler için hasta sayısı ve yüzde (%) kullanıldı. Kategorik değişkenler, bu çalışmada nitel verileri karşılaştırmak için Pearson χ^2 ve Fisher’in kesin testi ile test edildi. Veri dağılımının normalliği Shapiro-Wilk testi ile belirlendi. Analizlerde normal dağılım gösteren durumlarda veriler ortalama değer ve standart sapma ile gösterildi. Ancak, normal dağılım göstermeyen durumlarda veriler medyan (ortanca, %50) (25.yüzdelik-75.yüzdelik) ile gösterildi. İkili bağımsız gruplarda normal dağılım gösteren verilerin ortalama farklarını karşılaştırmak için Student t testi kullanılırken, normal dağılım göstermeyen verilerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi uygulandı. İkidenden fazla bağımsız gruplarda normal dağılım gösteren verilerin ortalama farklarını karşılaştırmak için ANOVA testi (varyansların homojenliği testi Levene testi ile birlikte) kullanılırken, normal dağılım göstermeyen verilerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi uygulandı. Tekrarlayan veya bağımlı üçten fazla gruplarda normal dağılım gösteren verilerin ortalama farklarının karşılaştırılmasında

repeated-measure ANOVA testi kullanıldı. Diğer duruumda tekrarlayan veya bağımlı üçten fazla gruplarda normal dağılım göstermeyen verilerin ortalama farklarının karşılaştırmasında Friedman testi kullanıldı. İstatiksel olarak önemli farklılık gösteren durumda, Posthoc ikili analiz yapılarak grupların farklılığını ortaya koyan karşılaştırma ortaya kondu. Genel sağkalım Kaplan-Meier yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı ve karşılaştırmalar log-rank testi ile yapıldı. Real Time PCR analizi sonucunda elde edilen veriler RT2 Profiler PCR Array Data Analysis programı (<https://dataanalysis.qiagen.com/pcr/arrayanalysis.php>) kullanılarak değerlendirildi. miRNA ekspresyon seviyelerindeki artış veya azalışlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduyla kat değişimi (fold-change) olarak belirlendi.

Çalışmanın birincil sonuç değişkeni genel sağkalım (OS) olup ameliyat veya tanı tarihinden itibaren herhangi bir nedenle ölüme kadar geçen zaman ya da hasta izleminin sona erdiği zaman genel yaşam süresi olarak hesaplandı. Tüm olgular içerisinde kaba sağkalım oranları, 1-3 ve 5-yıllık genel sağkalım hızları ve ortalama beklenen yaşam süresi ile bu süreye ilişkin %95 güven aralıkları Kaplan-Meier sağkalım analizi kullanılarak hesaplandı. Genel sağkalımı öngörmeye kantitatif miR-99, miR-135b ve Akt ölçümleri için en iyi kesim noktalarını belirlemek amacıyla R programında yazılmış web tabanlı Cutoff Finder algoritmasını (<http://molpath.charite.de/cutoff>) kullanarak söz konusu değişkenlere ait en iyi kesme noktaları elde edildi. Bunun için her bir miR-99b, miR-135b ve akt ölçümü dikate alınarak söz konusu değişkenler ikili sonuçlu (dikotom) yapıya dönüştürüldü. Ardından Log-Rank test istatistiği sonucunun en çok önemliliğe sahip olduğu noktalar en iyi kesim noktaları olarak kabul edildi. Genel sağkalım üzerinde etkili olabileceği düşünülen olası tüm değişkenlerin tek değişkenli etkileri Cox'un oransal hazard regresyon modelleri ile incelendi. Ardından OS üzerinde en fazla anlamlı belirleyiciliğe sahip olan etken(ler) çoklu değişkenli Cox'un oransal hazard modelleri oluşturularak araştırıldı. Ayrıca, her bir değişkene ait hazard oranı (HR), %95 güven aralıkları ve Wald istatistikleri hesaplandı. KRAS açısından wild olan grup ile mutant olan grup arasında miR-99b, miR-135b ve AKT düzeyleri yönünden farkların önemliliği Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Öte yandan gerek miR-99, miR-135b ve AKT ölçümlerinin birbirleri arasında gerekse miR-99b, miR-135b ve AKT ölçümlerinin alındığı lokalizasyonların birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı ise Friedman testiyle araştırıldı. Friedman test istatistiği sonuçlarının önemli bulunması halinde Dunn-Bonferroni çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farka neden

olan durum(lar) tespit edildi. Sürekli sayısal değişkenlerin birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olup olmadığı Spearman'ın sıra sayıları korelasyon testiyle incelendi. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi



4. BULGULAR

4.1. KLİNİK ÖZELLİKLER

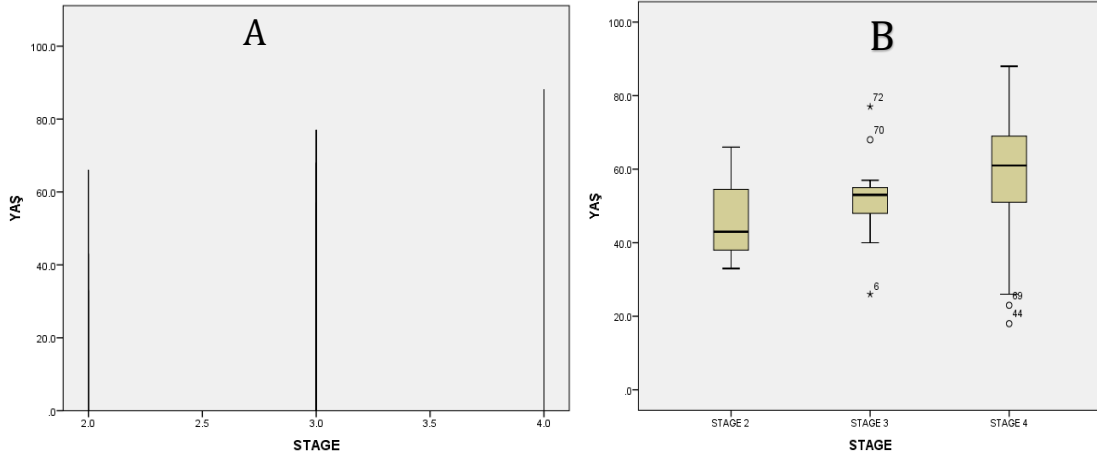
Çalışmaya toplam 74 hasta katıldı; 29 bayan (%39,2) ve 45 erkekti (%60,8). Hastaların ortanca yaşı 58,5 (47,5-68) yılı ve 65 yaş üstü hasta sayısı toplam hastaların %33,7'siydi. KRK'ların %55,4'ü (41 hasta) kolon, %44,5'ü (33 hasta) rektum yerleşimliydi. Çalışmada kanserlerin çoğu sol tarafta (%77'ye karşı %23) yerleşim göstermekteydi. Hastaların 35'u (%47,9) daha önce aynı hastalıktan ameliyat edilmiş nüks olguları. Neoadjuvan kemoterapi alan hasta sayısı 17 (%23,6) idi. Peritoneal karsinomatozisli hastalar %62,1, karaciğer metastazı tespit edilen hastalar ise toplam hastaların %66,2'si idi. (Tablo 4.1, Şekil 12).

Tablo 4.1. Hastaların genel özellikleri

	n	%
Cinsiyet		
Bayan	26	39,2
Erkek	45	60,8
Toplam	74	100
Yaş		
Ortalama (SD)	57,2 (14,9)	
Medyan	58,5 (47,5-68)	
>65 years	25	33,7
Vücut kitle indeksi	20,8 (18,8-23,7)	
Lokalizasyon		
Kolon	41	55,4
Rektum	33	44,5
Tümör Tarafı		
Sol / Sağ	57 / 17	77 / 23
Recurrent	35	47,9
Neoadjuvan kemoterapi	17	23,6
Peritoneal karsinomatozis	46	62,1
Karaciğer metastazı	49	66,2

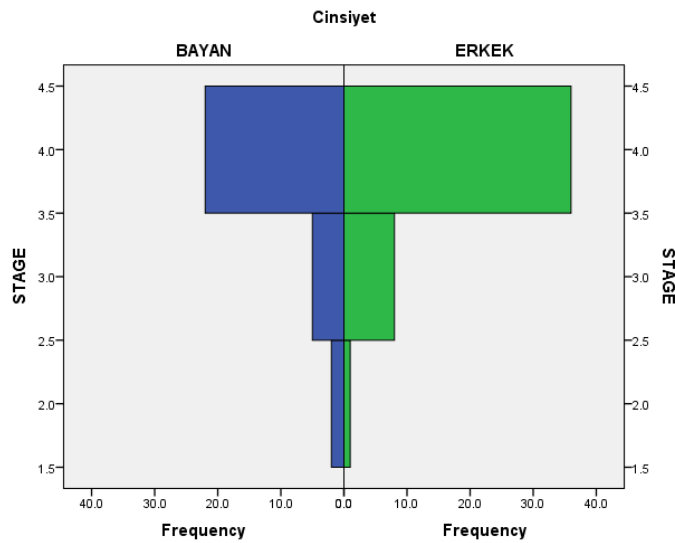
SD: Standart derivasyon

Çalışmada evre 2 tümörün yaş ortancası 43 (38-45) yıl, evre 3 tümörün yaş ortancası 53 (48-55) yıl ve evre 4 tümörün yaş ortancası 60 (51-69) yıldır ve medyan yaş ortalamalarında istatistiksel farklılık yoktur ($P = 0,085$) (Şekil 4.1).



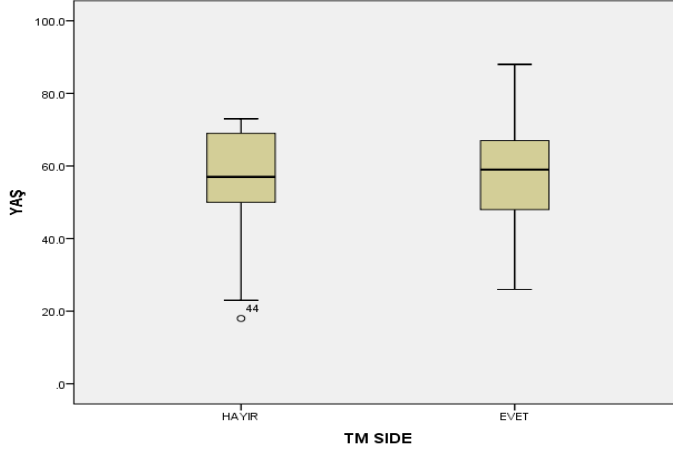
Şekil 4.1. Evreye göre yaşın dağılım (A) ve kutu grafiği (B)

Çalışmada AJCC evreleme sistemine göre hastaların %78,4'ü evre 4, %17,6'sı evre 3 ve %4,1'i evre 2 idi. İstatistiksel değerlendirmede cinsiyete göre kanser evresinin dağılımı benzer özellikler göstermekteydi ($P = 0,711$) (Şekil 4.2).



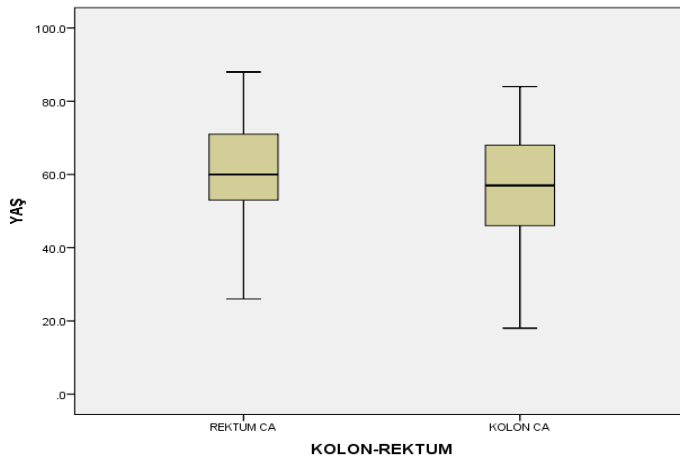
Şekil 4.2. Cinsiyete göre evrelerin dağılımı

Çalışmada tümörün sol taraflı yerleşimli hastaların medyan yaşı 59 (48-67) yıl ve sağ taraflı hastaların medyan yaşı 57 (50-69) yıldır. Yaşın tümörün kolorektal anatomide taraf açısından dağılımında istatistiksel farklılık yoktu ($P = 0,822$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Tümör anatomik tarafı ve yaş özellikleri

Çalışmada kolon yerleşimli hastaların yaş ortalaması 57 (46-68) yıl ve rektum yerleşimli hastaların medyan yaşı 60 (53-71) yıldır. Yaşın tümör lokalizasyonuna göre dağılımında istatistiksel farklılık yoktu ($P = 0,188$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Tümörün lokalizasyonu

Çalışmaya katılan hastaların preoperatif CEA ve CA19-9 değerleri sırasıyla 12 (3,3-45) ng/mL ve 18 (3,1-123) olarak bulundu (Tablo 4.2). Ortanca peritoneal kanser indexi (PCI) 16 (7-24) olarak bulundu.

Hastaların %17'si HİPEK ve %11'i EPİK tedavisi almıştı. Adjuvan kemoterapi hastaların %94,2'si alırken radyoterapi alan hastaların sayısı %35,8 idi. Çalışmada medyan takip süresi 27 (15,6-46,4) aydı ve takiplerde hastaların %74,3'ü yaşamamaktadır.

Tablo 4.2. Hastaları ameliyat öncesi özellikleri

	n	%
CEA	12 (3,3-45)	
CA19-9	18 (3,1-123)	
Yatış süresi	16 (12-27)	
Ameliyat süresi	340 (240-510)	
Peritoneal kanser index	16 (7-24)	
HİPEK	17	23
EPİK	11	14,9
Adjuvan tedavi	65	94,2
Radyoterapi (n=67)	24	35,8
Takip süresi (yıl)	27 (15,6-46,4)	
Vital status		
Canlı	19	25,7
Yaşamıyor	55	74,3

CEA: Karsinoemriyojenik antijen, CA19-9: Karbonhidrat antijeni19-9, HİPEK: Hipertermik intraperitoneal kemoterapi, EPİK: Erken peritoneal intraperitoneal kemoterapi

4.2. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

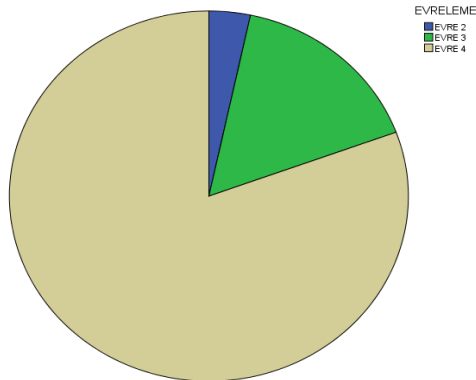
Hastaların çoğunluğu (%78,4) Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC, American Joint Committee on Cancer) evrelemesine median evresi 4 (3-4) idi (Tablo 8). Çalışmada evre 4 hastalar %78,4'ünü, evre 3 hastalar %17,6'sını ve evre 2 %4,1'ini oluşturmaktaydı (Şekil 16). Histopatolojik değerlendirmede (n=47), tümörün diferansiyasyon sınıflamasında; grade 1 %29,8, grade 2 %55,3 ve grade 3 14,6 olarak

tespit edildi. Ayrıca, müsinöz komponent %39,1, lenfovasküler tutulum %70,4 ve nöral tutulum oranı %67,4 bulundu. Cerrahi olarak çıkarılan median lenf nodu sayısı 16 (12-25) idi. Bununla birlikte lenf nodu pozitifliği oranı %76,1 olarak rapor edildi (Tablo 4.3) (Şekil 4.5).

Tablo 4.3. Hastaların histopatolojik değerlendirmesi

	n	%
AJCC evreleme	4 (3-4)	
2	3	4,1
3	13	17,6
4	58	78,4
Tümör diferasyon derecesi (grade) (n=47)		
1	14	29,8
2	26	55,3
3	7	14,6
Müsinöz component (n=64)	25	39,1
Lenfovasküler tutulum (n=54)	38	70,4
Nöral tutulum (n=43)	29	67,4
Tümör uzunluğu	5 (3,5-7)	
Çıkarılan lenf nodu sayısı	16 (12-25)	
Lenf nodu pozitifliği (n=67)	51	76,1

AJCC: Amerikan Ortak Kanser Komitesi (American Joint Committee on Cancer)



Şekil 4.5. Amerikan Ortak Kanser Komitesi'ne (AJCC) göre evre dağılımı

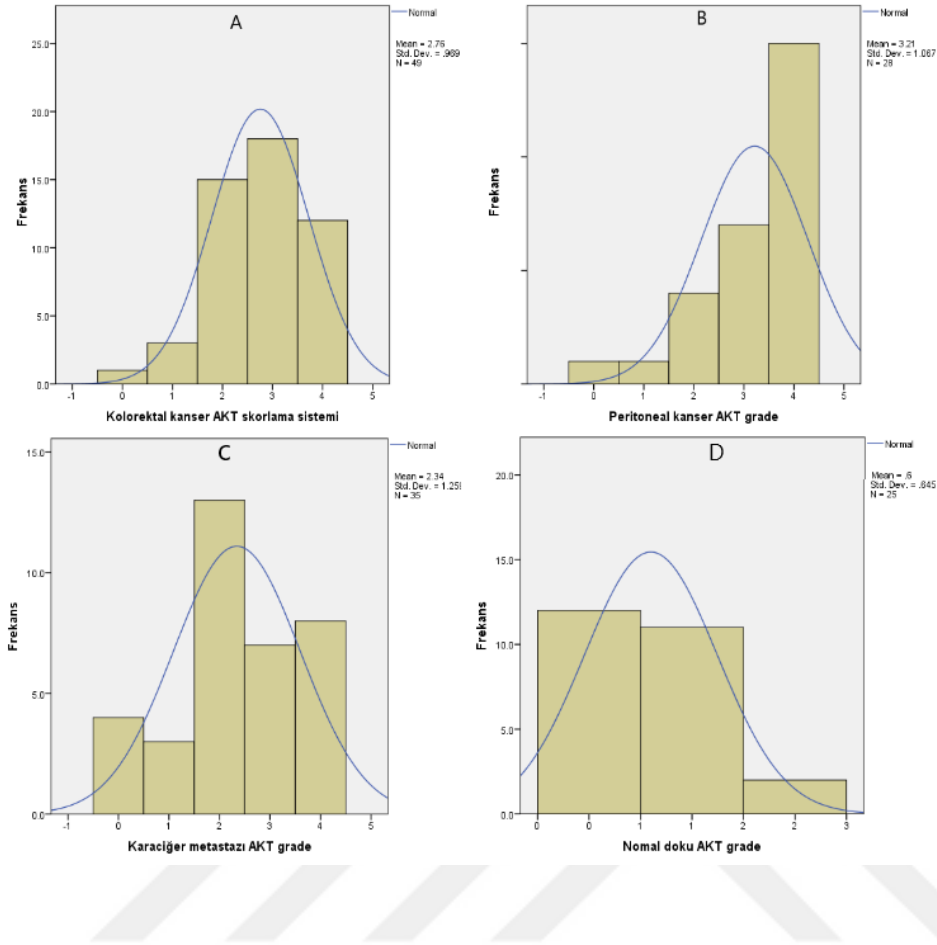
Hastaların yapılan mutasyon tespiti sonuçlarına göre; KRAS mutasyonu 19 olguda (%37,3) ve NRAS mutasyonu 3 olguda (%3,9) tespit edilirken, BRAF mutasyonu tespit edilmedi. AKT geni immunhistokimyasal skorelama sisteminde hastaların AKT gen lokalizasyonuna göre; ortalanca kolorektal tümörde 3 (2-3), peritoneal tümörde 4 (3,5-4), karaciğer metastazında 4 (3,5-4) ve normal dokuda 1 (1-1) olarak tespit edildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. KRAS geni fenotipi ve tümör lokalizasyonuna göre AKT skorelama sistemi dağılımı

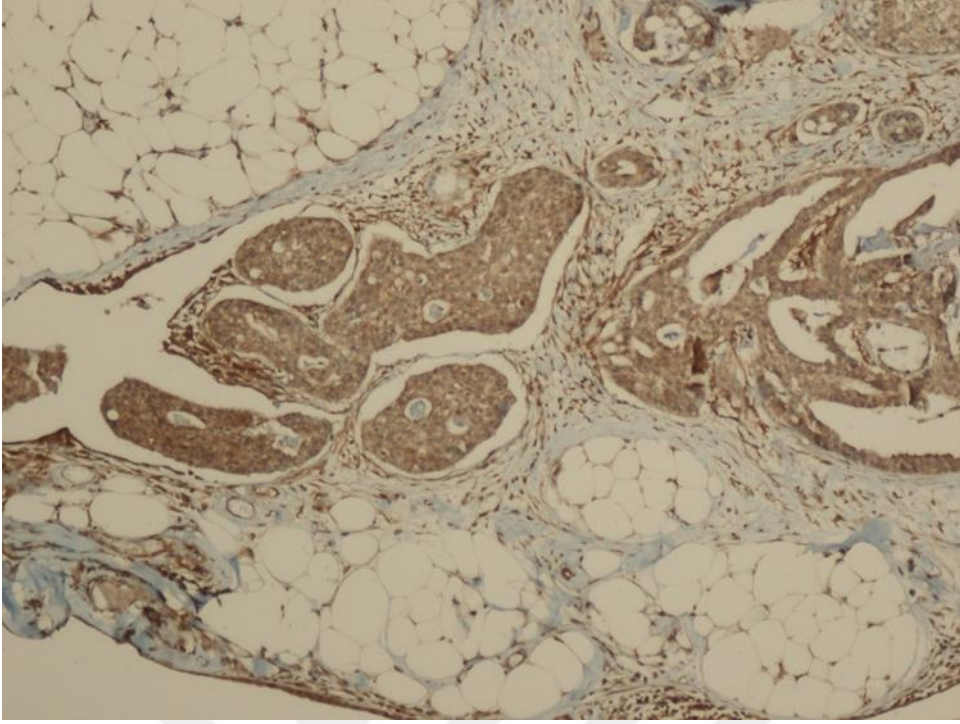
	n	%
Tümör fenotip (n=51)		
KRAS mutasyonu	19	37,3
NRAS mutasyonu	2	3,9
BRAF	-	
AKT gen İHK skorelama sistemi (medyan)		
Kolorektal kanser grade	3 (2-3)	
Peritoneal karsinomatozis grade	4 (3,5-4)	
Karaciğer metastazı grade	2 (2 - 3)	
Normal doku grade	1 (1-1)	

İHK: İmmunhistokimyasal boyama

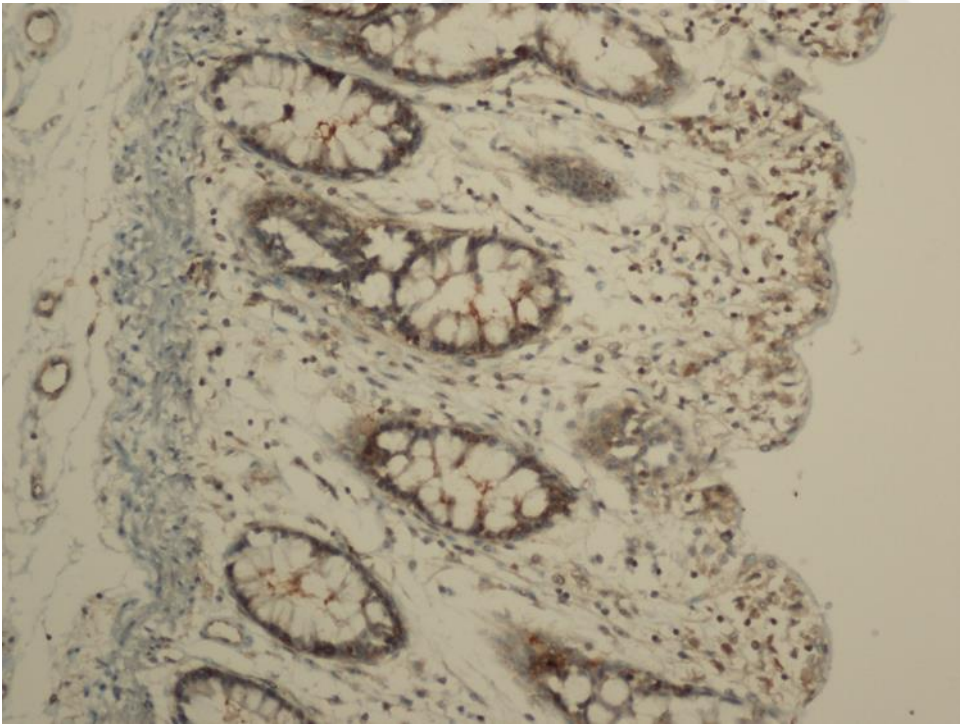
Çalışmada AKT geni immunhistokimyasal skorelama sisteminde çoğunluk sırasıyla; kolorektal tümörlü dokuda grade 3 %36,7 ve grade 2 %30,6, peritoneal karsinomatoziste grade 4 %53,6 ve grade 3 %25, karaciğer metastazında grade 3 %22,9 ve grade 4 %22,9, normal dokuda grade 0 %48 ve grade 1 %44 olarak tespit edildi [(Şekil 4.6, Şekil 4.7 (A-I)].



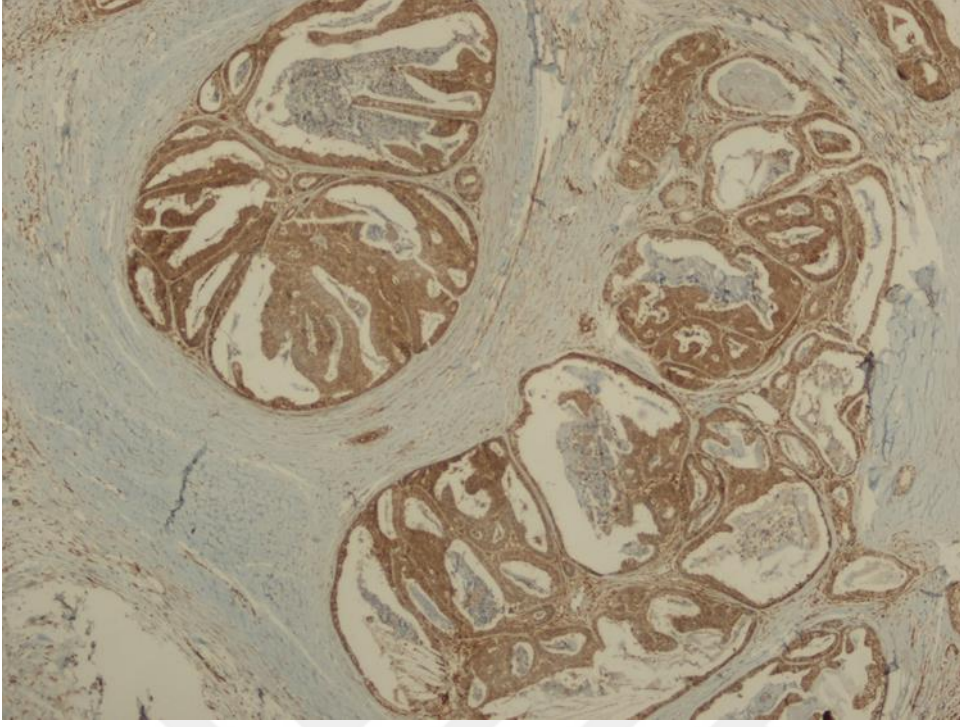
Şekil 4.6. İmmunohistokimyasal değerlendirilmede AKT'nin boyanma grade histogramları; Kolorektal kanser (A), Peritoneal kanser (B), Karaciğer metastazı (C) ve normal doku (D).



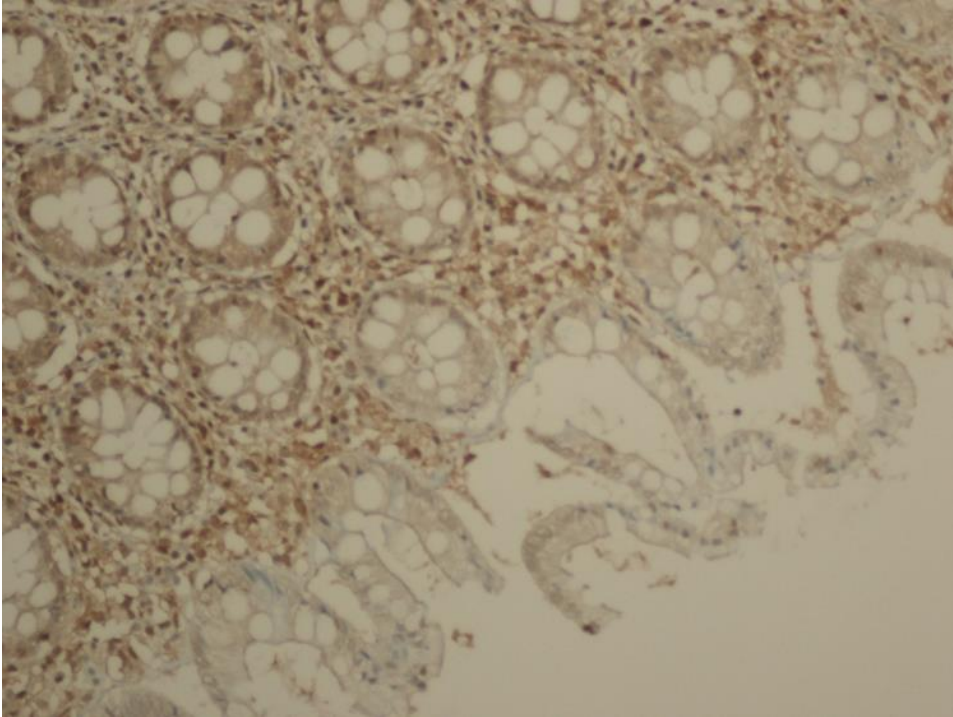
Şekil 18 (A). Kolon adenokarsinomu kuvvetli sitoplazmik AKT boyanması (X100, İHK))



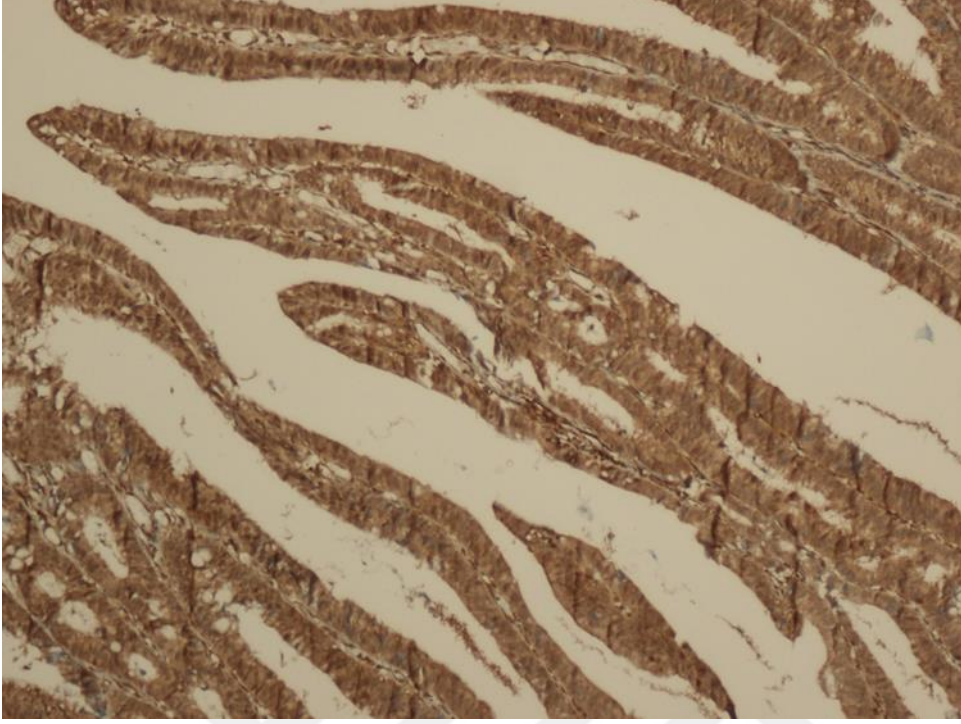
Şekil 4.7 (B). Normal kolon mukozasında zayıf fokal sitoplazmik AKT boyanması (X200, İHK)



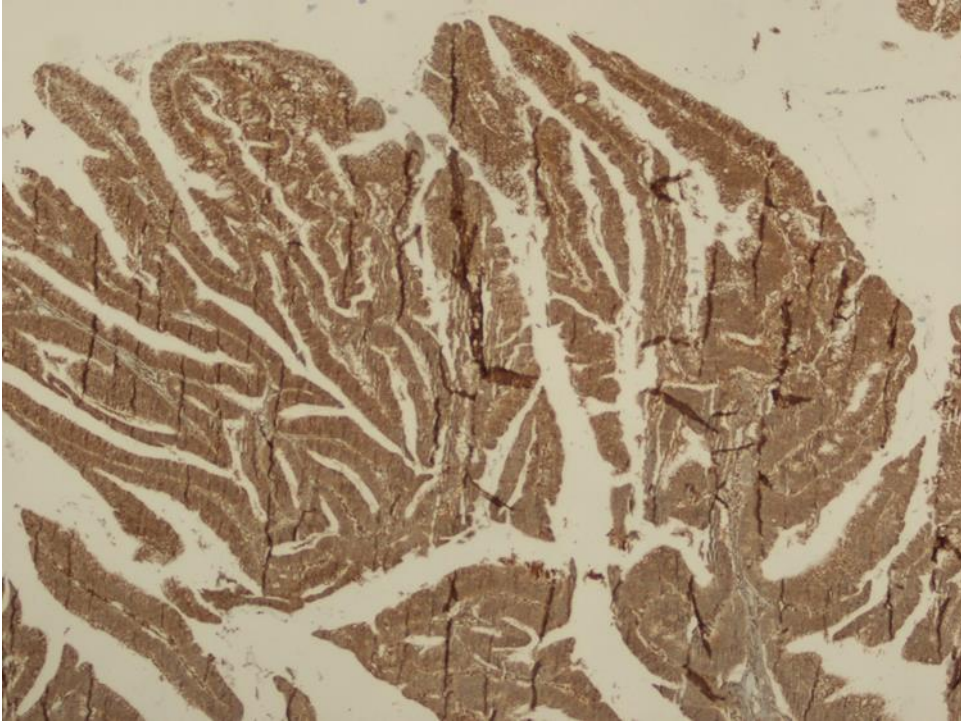
Şekil 4.7 (C). Kolon adenokarsinom kuvvetli sitoplazmik AKT boyanması (X100, İHK)



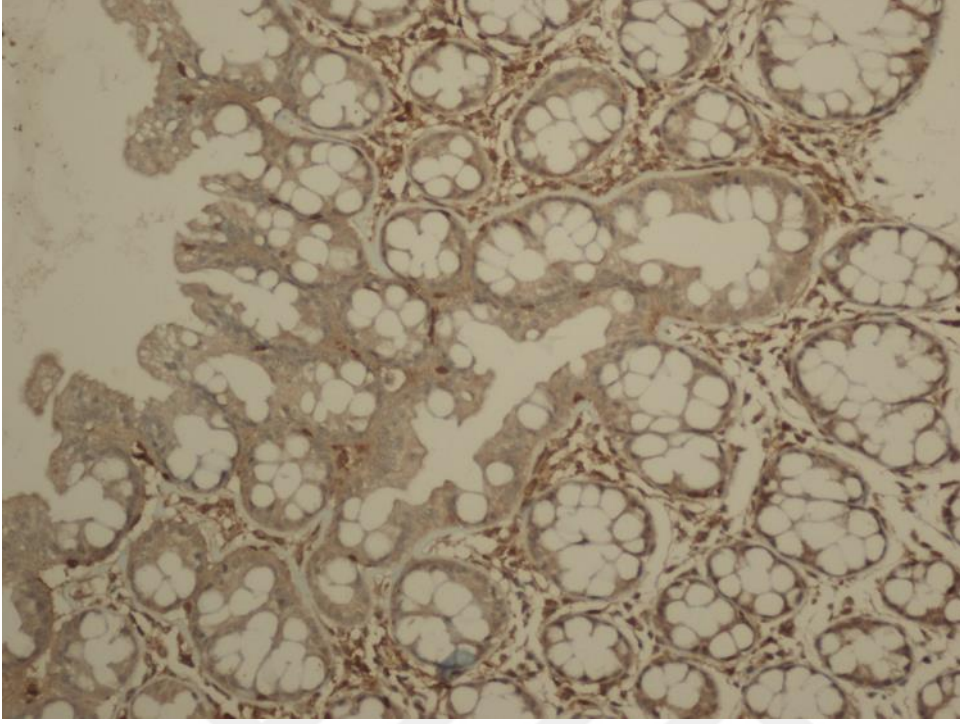
Şekil 4.7 (D). Normal kolon mukozası zayıf sitoplazmik AKT boyanması (X200, İHK)



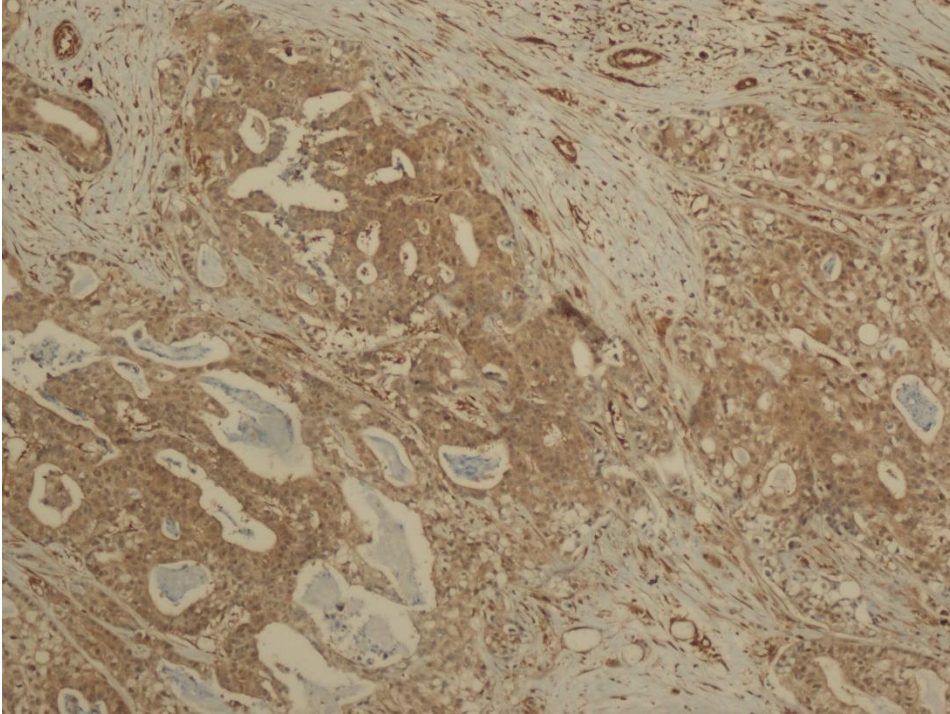
Şekil 4.7 (E). Kolon adenokarsinomu kuvvetli boyanma gösteren sitoplazmik AKT boyanması (X200, İHK)



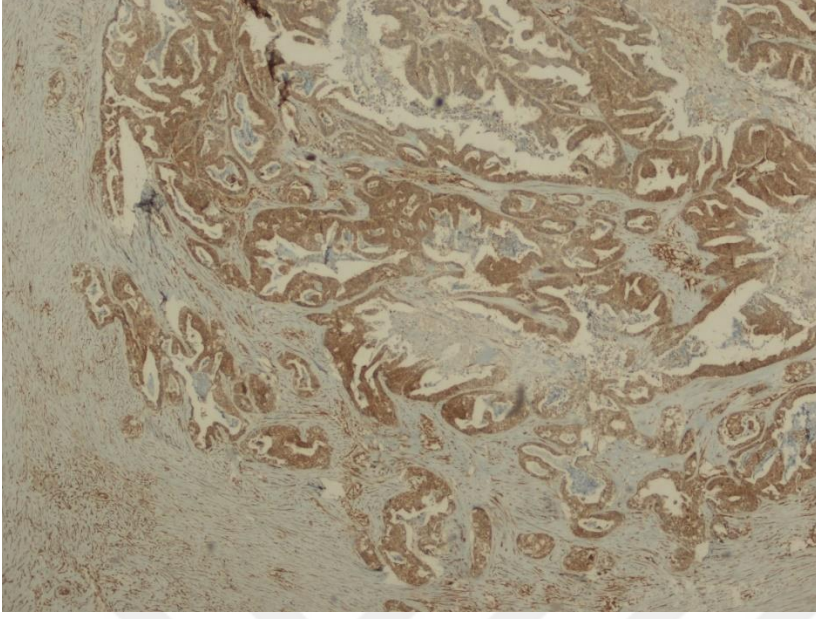
Şekil 4.7 (F). Kolon adenokarsinomu kuvvetli AKT boyanması (X100, İHK)



Şekil 4.7 (G). Kolon mukozası zayıf sitoplazmik AKT boyanması (X100, İHK)



Şekil 4.7 (H). Karaciğer metastazı sitoplazmik akt boyanması (X200, İHK)



Şekil 4.7 (I). Peritoneal metastaz sitoplazmik AKT boyanması (X100, İHK)

İstatiksel analizde, gruplar arasında Akt geni immunhistokimyasal skortlama sistemi açısından farklılık tespit edildi ($P<0,001$). Post-hoc analiz sonuçlarına göre; kolorektal kanser, peritoneal kanser ve karaciğer metastazlı dokulardaki AKT geni skoru istatiksel olarak normal dokuya göre daha yüksekti ($P<0,001$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. AKT geni immunhistokimyasal skrolama sistemi ve yoğunluk yüzdesinin karşılaştırması

AKT grade	KRK (n=49) (%)	PK (n = 28) (%)	KCM (n=35)** (%)	Normal Doku (n=25) (%)	P- değeri†
					< 0,001
0	1 (2) ^a	1 (3,6) ^b	4 (11,4) ^c	12 (48) ^{a,b,c}	
1	3 (6,1) ^a	1 (3,6) ^b	3 (8,6) ^c	11 (44) ^{a,b,c}	
2	15 (30,6) ^a	4 (14,3) ^b	13 (20) ^c	2 (8) ^{a,b,c}	
3	18 (36,7) ^a	7 (25) ^b	7 (22,9) ^c		
4	12 (24,5) ^a	15 (53,6) ^b	8 (22,9) ^c		
	n	AKT*	miR-99b	miR-135b	p-değeri †
					<0,001
Tümör/KRK	23	60,0 (40,0-75,0) ^{d,e}	16,5 (9,6-22,9) ^{d,f}	3,2 (1,4-6,1) ^{e,f}	
PK	18	80,0 (67,5-81,2) ^{d,e}	12,8 (5,1-23,0) ^d	13,8 (7,4-17,1) ^e	
KCM	22	45,0 (33,7-76,2) ^{d,e}	4,0 (2,2-5,9) ^d	5,1 (2,6-15,0) ^e	
Normal doku	13	5,0 (5,0-15,0) ^{d,e}	0,04 (0,03-0,22) ^d	0,59 (0,08-0,88) ^e	

KRK: Kolorektal Kanser, KCM: Karaciğer metastazı, PK: Peritoneal Karsinomatozis, *: AKT yoğunluk şiddeti (%)
 **: Glisson kapsülüne aşırı invaze yüklü hastalarda dahil edildi, Tanımlayıcı istatistikler; medyan (25.yüzdelik-75.yüzdelik) veya yüzdelik (%) biçiminde ifade edildi. † Friedman test. a: KRK Akt ile normal doku Akt (P = 0,001), b: PK Akt ile normal doku Akt (P < 0,001), c: KCM Akt ile normal doku Akt (P = 0,026), d: AKT ile miR-99b arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,01), e: AKT ile miR-135b arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,01), f: miR-99b ile miR-135b arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p=0,010).

Çalışmada KRAS ile hastaların tümör evresi açısından değerlendirmesinde; wild tip hastaların ortanca evresi 4 (3-4) ve mutant tip hastaların ortanca evresi 4 (4-4) idi (P = 0,601). Ayrıca hastalarda KRAS mutasyonu durumu ile yaş, tümör lokalizasyonu, vücut kitle indeksi, tümör boyutu, CEA, CA19-9 düzeyleri ve PCİ karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık tespit edilmedi (P > 0,05). Diğer taraftan KRAS durumu ile tümörün tarafı karşılaştırıldığında; wild tip KRK'larda sol taraf yerleşimi (%52,4) iken mutant tip KRK'larda daha fazla sağ taraflı yerleşim (%21,4) mevcuttu (P=0,014) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. KRAS mutasyon durumuna göre hastaların özellikleri

	Toplam	Wild tip	Mutant tip	P
Tümör tarafı				0,014
Sol	37 (72,5)	27 (52,9)	10 (19,6)	
Sağ	14 (27,5)	5 (9,8)	9 (17,6)	
Tümör lokalizasyonu				0,628
Kolon	30 (58,8)	18 (35,3)	12 (23,5)	
Rektum	21 (41,2)	14 (27,5)	7 (13,7)	
Yaş	58,5 (47,5-68)	54 (43-67)	57 (35,5-68,2)	0,553
Vücut kitle indeksi	20,8(18,8-23,7)	22 (19,6-26,9)	25,6 (18,3-32,4)	0,326
CEA	12 (4-61)	11 (4,8-22)	41 (3-147)	0,219
CA19-9	18 (3,1-123)	11,8 (2-30,9)	40 (2,8-225)	0,793
Tümör evreleme	4 (3-4)	4 (3-4)	4 (2,5-4)	0,946
PCI (ortanca)	16 (7-24)	17 (10-26)	9 (5,2-23)	0,382

CA19-9: Karbonhidrat antijen 19-9, CEA: Carsinoembriyogenik antijen, PCI: Peritoneal karsinomatozis İndeksi

Çalışmada, grupların klinik ve histopatolojik değerlendirmesinde, peritoneal karsinomatozisli hastaların ortalama yaşı karaciğer metastazlı gruba göre [58,1 (12,145) yıla karşı 65,6 (18,610) yıl] ($P = 0,002$) daha düşüktü. Ayrıca grup 1’de (PK) nükslü vakaların sayısı daha fazlaydı (%38,4’e karşı %9,6) ($P = 0,004$). Bununla birlikte çalışmada PK gelişen grupta tümör evresi daha düşüktü ($P = 0,017$). Yatış süresi olarak karaciğer metastazlı hastalar daha kısa yatış süresine sahipti [17 (16,5-53) güne karşı 18 (15-35)] ($P = 0,014$). Histopatolojik değerlendirmede, PK gelişen grupta müsinöz component oranı daha fazlaydı [22 (34,4) karşı 3 (4,7)] ($P = 0,001$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Gruplar arası klinik ve patolojik verilerin değeriendirilmesi

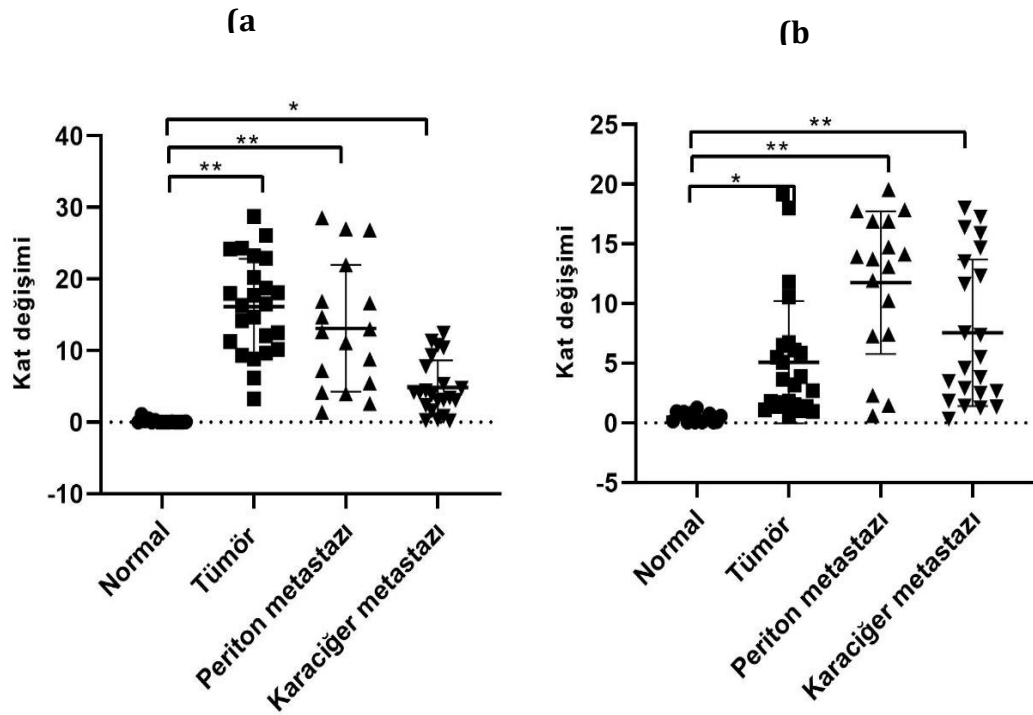
	Total (n = 74)	Peritoneal kanser (n = 46) (Grup 1)	Karaciğer metastazi (n = 28) (Grup 2)	P value
Yaş	59,917 (13,500)	58,1 (12,145)	65,6 (18,610)	0,002
Cinsiyet (n) (%)				
Bayan	29 (39,2)	19 (25,7)	10 (13,5)	
Erkek	45 (60,8)	27 (36,5)	18 (13,5)	
ASA	3 (2,5 - 3)	3 (3-3)	3 (2-3)	0,382
Vücut kitle indeksi	24,3 (5,283)	22,8 (4,931)	29 (3,605)	0,06
Yeşim yeri (n) (%)				0,332
Kolon	41 (55,4)	28 (37,8)	13 (17,6)	
Rektum	33 (44,6)	18 (24,3)	15 (20,3)	
Sol taraf /sağ taraf (n) (%)				0,595
Sol taraf	57 (77)	34 (45,9)	23 (31,1)	
Sağ taraf	17 (23)	12 (16,2)	5 (6,8)	
Kras durumu (n) (%)				0,968
Wild tip	32 (62,7)	17 (33,3)	15 (29,4)	
Mutant tip	19 (37,3)	11 (21,6)	8 (15,7)	
Tümör çapı	5,2 (1,699)	5,67 (1,714)	4 (1)	0,134
Nüks vaka (n) (%)	35 (47,9)	28 (38,4)	7 (9,6)	0,004
Neoadjuvan tedavi (n) (%)	17 (23,6)	9 (12,5)	8 (11,1)	0,613
Preop CEA	11,4 (5,9-93)	12 (4-97)	10,8 (9,65-17,4)	0,152
Preop CA19-9	49,4 (7-262)	70 (18-256)	2 (2-1645)	0,096
Adjuvant tedavi (n) (%)	65 (94,2)	40 (58)	25 (36,2)	>0,999
Radioterapi (n) (%)	24 (35,8)	12 (17,9)	12 (17,9)	0,253
Evre	4 (4-4)	4 (3-4)	4 (4-4)	0,017
Yatış süresi	17,5 (15,5-37,5)	18 (15-35)	17 (16,5-53)	0,014
Takip süresi	17,2 (13,7-27,2)	15,6 (13,1-20,4)	31,3 (22,9-41,7)	<0,001
Lenf nodu invazyonu (n) (%)	51 (76,1)	34 (50,7)	17 (25,4)	0,075
Müsinöz component (n) (%)	25 (39,1)	22 (34,4)	3 (4,7)	0,001
Grade	2 (1,5-2)	2 (2-2)	2 (1-2)	0,306
Lenfovasküler invazyon (n) (%)	38 (70,4)	21 (38,4)	17 (31,5)	0,635
Nöral invazyon (n) (%)	29 (67,4)	17 (39,5)	12 (27,9)	0,279

ASA: American Society of Anesthesiologist, CA19-9: Karbonhidrat antijen 19-9, CEA: Carsinoembriyogenik antijen

4.3. MİRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNDE DEĞİŞİMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

KRK'lı hastaların tümör, periton metastazı, karaciğer metastazı ve normal dokularına ait parafin blok örneklerinden izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapıldıktan sonra miR-99b ve miR-135b ekspresyon seviyeleri, U6-2 kontrol miRNA ile normalize edilmiş ve elde edilen bulgular Şekil 19 ve 20'de sunuldu.

RT-PCR analizi sonuçlarına göre; KRK tümör dokularında miR-99b ve miR-135b ekspresyon düzeyi normal dokuya göre kıyaslandığında sırasıyla 19,7- ($P = 0,001$) ve 3,53- kat ($P = 0,027$) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi. Ayrıca, normal dokuya kıyasla periton metastazına ait dokularda miR-99b ve miR-135b ekspresyon seviyeleri sırasıyla 12,55- ($P = 0,001$) ve 9.68-kat ($P = 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmasına rağmen, karaciğer metastazı dokularında sırasıyla 3,97- ($P = 0,038$) ve 5,23-kat ($P = 0,002$) olarak belirlendi. Sonuç olarak normal dokuya göre miR-99b ekspresyon seviyesi en yüksek düzeyde tümör dokuda artmasına rağmen, miR-135b ekspresyon düzeyinin en düşük seviyede olduğu tespit edildi (Şekil 4.8, Tablo 4.8).

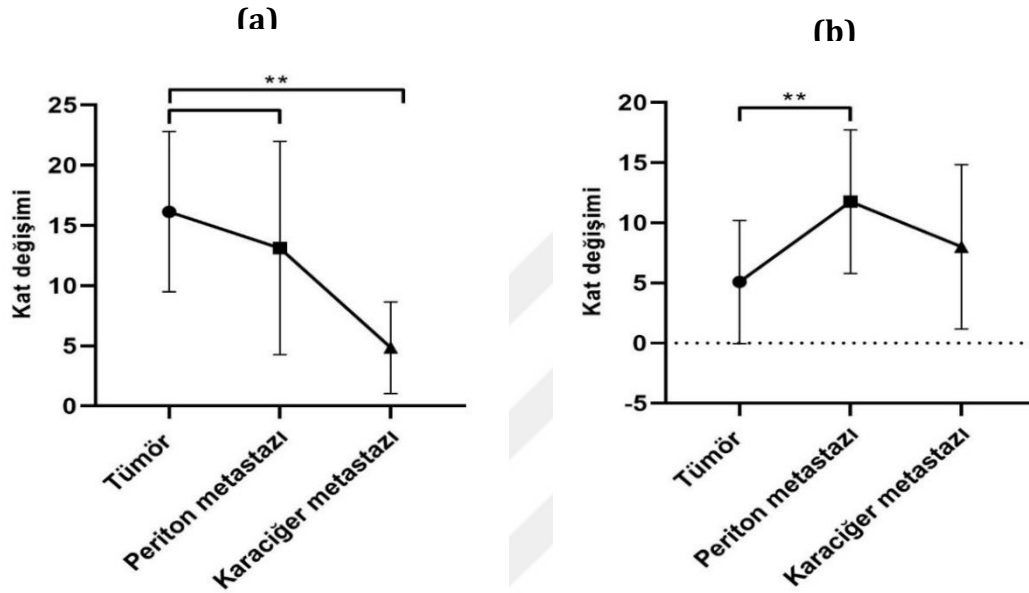


Şekil 4.8. Tümör, periton metastazı ve karaciğer metastazı dokularında normal dokuya kıyasla (a) miR-99b ve (b) miR-135b ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$)

Tablo 4.8. Tümör, periton metastazı ve karaciğer metastazı dokularında normal dokuya kıyasla miR-99b ve miR-135b ekspresyon düzeylerindeki kat değişimleri ve p değerleri

	Tümör		Periton metastazı		Karaciğer metastazı	
	Kat değişimi	p	Kat değişimi	p	Kat değişimi	p
Hsa-miR-99b	19,70	0,001	12,55	0,001	3,97	0,038
Hsa-miR-135b	3,53	0,027	9,68	0,001	5,23	0,002

Ayrıca, tümör doku ile kıyaslandığında periton ve karaciğer metastazında miR-99b ekspresyon düzeyinin sırasıyla 0,64- (P = 0,145) ve 0,20-kat (P = **0,001**) azaldığı belirlenmesine rağmen, miR-135b ekspresyon düzeyinin sırasıyla tümör dokuya göre 2,74-kat (P = **0,001**) ve 1,48-kat (P = 0,116) arttığı analiz edildi (Şekil 4.9, Tablo 4.9).



Şekil 4.9. Periton metastazı ve karaciğer metastazı dokularında tümör dokuya kıyasla (a)miR-99b ve (b) miR-135b ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi (p<0,05*; p<0,01**)

Tablo 4.9. Periton metastazı ve karaciğer metastazı dokularında tümör dokuya kıyasla miR-99 ve miR-135b ekspresyon düzeylerindeki kat değişimleri ve p değerleri

	Periton metastazı		Karaciğer metastazı	
	Kat değişimi	p	Kat değişimi	p
Hsa-miR-99	0,64	0,145	0,20	0,001
Hsa-miR-135b	2,74	0,001	1,48	0,116

Çalışmada tablo 4.5’de ise ölçüm yapılan bölgeler içerisinde miR-99b, miR-135b ve AKT düzeyleri yönünden yapılan karşılaştırmalar bulunmaktadır.

KRK açısından AKT, miR-99b ve miR-135 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup ($p<0,001$), tümör AKT’ye göre sırasıyla; miR-99b ve miR-135b KRK düzeyi daha düşük idi ($p=0,002$ ve $p<0,001$). Ayrıca, miR-99b KRK’ya göre miR-135b KRK da istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü ($p=0,010$).

PC açısından AKT, miR-99b ve miR-135b arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup ($p<0,001$), söz konusu farka neden olan durum; tümör PC’ye göre miR-99b ve miR-135b PC ölçümlerinin daha düşük olması idi ($p<0,001$ ve $p<0,001$).

KCM açısından da AKT, miR-99b ve miR-135b arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup ($p<0,001$), söz konusu farka neden olan durum; tümör KCM’ye göre miR-99b ve miR-135b KCM ölçümlerinin daha düşük olması idi ($p<0,001$ ve $p<0,001$). Normal dokudan alınan AKT, miR-99b ve miR-135b arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup ($p<0,001$), söz konusu farka neden olan durum; normal AKT’ye göre miR-99b ve miR-135b normal doku ölçümlerinin daha düşük olması idi ($p<0,001$ ve $p=0,010$).

Tablo 4.5. AKT geni İHC skorlama sistemi ve yoğunluk yüzdesinin karşılaştırması

AKT grade	KRK (n=49) (%)	PK (n = 28) (%)	KCM (n=35) (%)	Normal Doku (n=25) (%)	P- değeri†
					< 0,001
0	1 (2) ^a	1 (3,6) ^b	4 (11,4) ^c	12 (48) ^{a,b,c}	
1	3 (6,1) ^a	1 (3,6) ^b	3 (8,6) ^c	11 (44) ^{a,b,c}	
2	15 (30,6) ^a	4 (14,3) ^b	13 (20) ^c	2 (8) ^{a,b,c}	
3	18 (36,7) ^a	7 (25) ^b	7 (22,9) ^c		
4	12 (24,5) ^a	15 (53,6) ^b	8 (22,9) ^c		
	n	AKT*	miR-99b	miR-135b	p-değeri †
					<0,001
Tümör/KRK	23	60,0 (40,0-75,0) ^{d,e}	16,5 (9,6-22,9) ^{d,f}	3,2 (1,4-6,1) ^{e,f}	
PK	18	80,0 (67,5-81,2) ^{d,e}	12,8 (5,1-23,0) ^d	13,8 (7,4-17,1) ^e	
KCM	22	45,0 (33,7-76,2) ^{d,e}	4,0 (2,2-5,9) ^d	5,1 (2,6-15,0) ^e	
Normal doku	13	5,0 (5,0-15,0) ^{d,e}	0,04 (0,03-0,22) ^d	0,59 (0,08-0,88) ^e	

KRK: Kolorektal Kanser, KCM: Karaciğer metastazı, PK: Peritoneal Karsinomatozis, *: AKT yoğunluk şiddeti (%) Tanımlayıcı istatistikler; medyan (25.yüzdelik-75.yüzdelik) veya yüzdelik (%) biçiminde ifade edildi. † Friedman test. a: KRK Akt ile normal doku Akt ($P = 0,001$), b: PK Akt ile normal doku Akt ($P < 0,001$), c: KCM Akt ile normal doku Akt ($P = 0,026$), d: AKT ile miR-99b arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$), e: AKT ile miR-135b

arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$), f: miR-99b ile miR-135b arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,010$).

Tablo 4.10'da KRAS açısından wild olan grup ile mutant olan grup arasında miR-99b, miR-135b ve AKT düzeyleri yönünden yapılan karşılaştırmalar bulunmaktadır.

Wild ile mutant grup arasında sırasıyla; miR-99b (KRK,PK, KCM ve normal doku), miR-135b (KRK,PK, KCM ve normal doku) ve AKT (KRK,PK, KCM ve normal doku) ölçümleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık görülmedi ($p>0,05$).

Tablo 4.10. KRAS açısından olguların miR-99b, miR-135b ve AKT düzeyleri

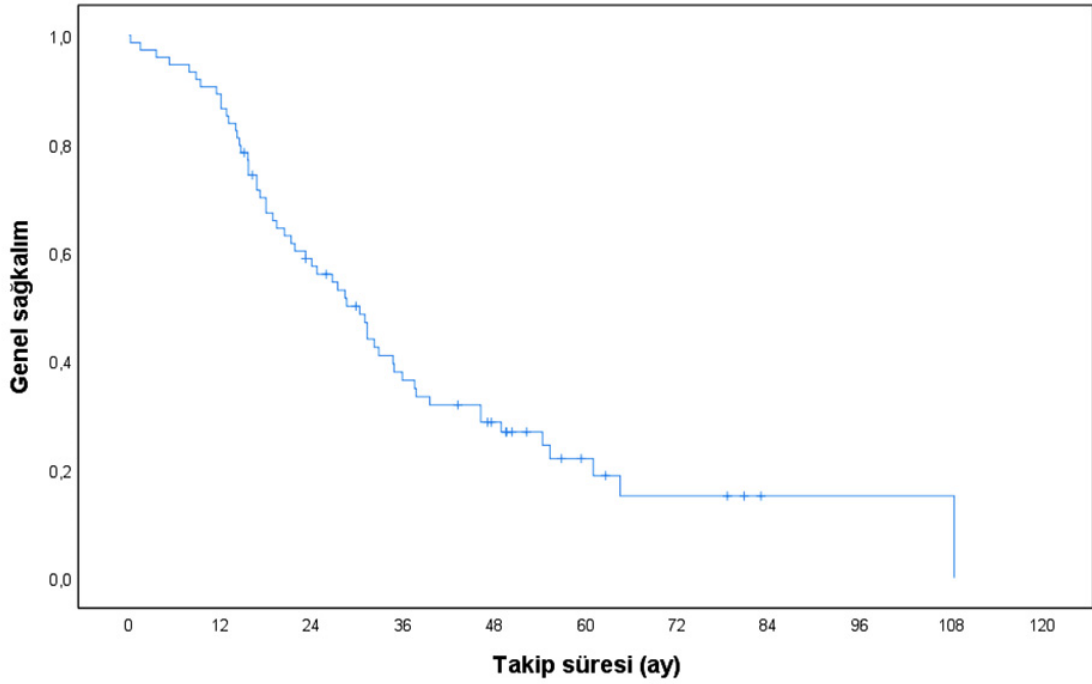
	Wild	Mutant	p-değeri †
AKT			
<i>Tümör</i>	50,00 (30,00-71,25)	65,00 (36,25-77,50)	0,176
<i>PC</i>	70,00 (43,75-80,00)	77,50 (51,25-80,00)	0,792
<i>KCM</i>	45,00 (15,00-70,00)	52,50 (32,50-80,00)	0,535
<i>Normal</i>	10,00 (5,00-15,00)	5,00 (5,00-10,00)	0,211
miR-99b			
<i>KRKc</i>	18,03 (8,99-24,05)	12,10 (9,63-22,90)	0,650
<i>PC</i>	16,63 (4,17-26,00)	11,09 (6,35-21,83)	0,827
<i>KCM</i>	4,16 (2,84-8,53)	2,32 (0,66-3,68)	0,109
<i>Normal</i>	0,04 (0,03-0,27)	0,04 (0,02-0,05)	0,412
miR-135b			
<i>KRKc</i>	5,30 (2,03-9,55)	1,71 (1,39-5,86)	0,227
<i>PC</i>	13,74 (6,90-16,92)	7,44 (7,04-20,90)	0,827
<i>KCM</i>	5,05 (2,33-15,10)	3,81 (3,28-16,24)	0,841
<i>Normal</i>	0,15 (0,08-0,78)	0,55 (0,06-1,17)	0,489

Tanımlayıcı istatistikler; medyan (25. yüzdelerik-75.yüzdelerik) biçiminde ifade edildi. † Mann Whitney U testi.

4.4. SAĞKALIMA ETKİ EDEN FAKTÖRLER

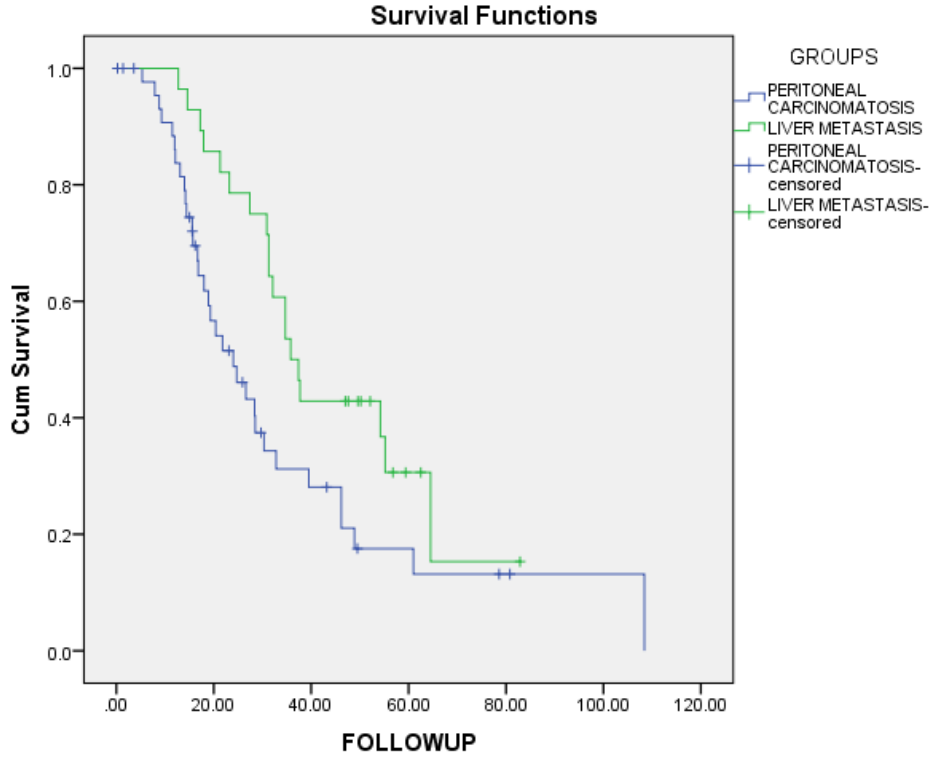
Çalışmaya dahil edilen tüm olgular üzerinden yapılan Kaplan-Meier sağkalım analizine göre kaba sağkalım oranı %24,3 olup 1-3 ve 5 yıllık genel sağkalım oranları sırasıyla; %89,2-%36,4 ve %22,0 olarak tespit edildi. Öte yandan ortalama beklenen yaşam süresi 40,0 (%95 Güven Aralığı: 31,6-48,4) ay idi.

Çalışmada şekil 4.10’da çalışmaya dahil edilen tüm olgulara yönelik genel sağkalıma ilişkin Kaplan-Meier eğrisi yer almaktadır.



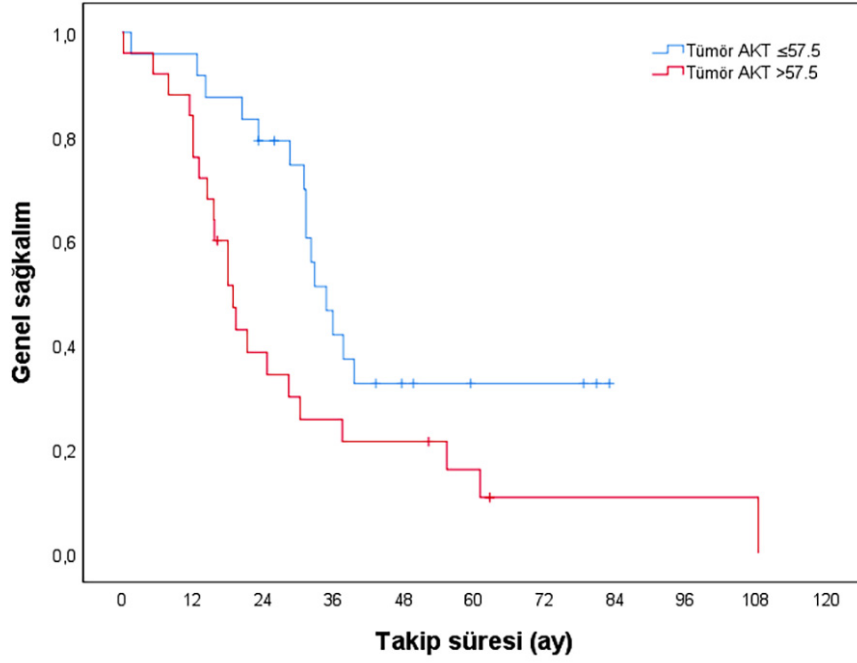
Şekil 4.10. Hastaların Kaplan-Meier sağkalım eğrisi

Şekil 4.11’de Kaplan-Meier sağkalım analizine göre KRK’ya bağlı PK gelişen hastaların medyan yaşam süresi [24 (15,602-32,398) ay], KCM gelişen hastaların medyan yaşam süresinden [35,800 (29,992-41,608) ay] kısaydı (P = 0,027).



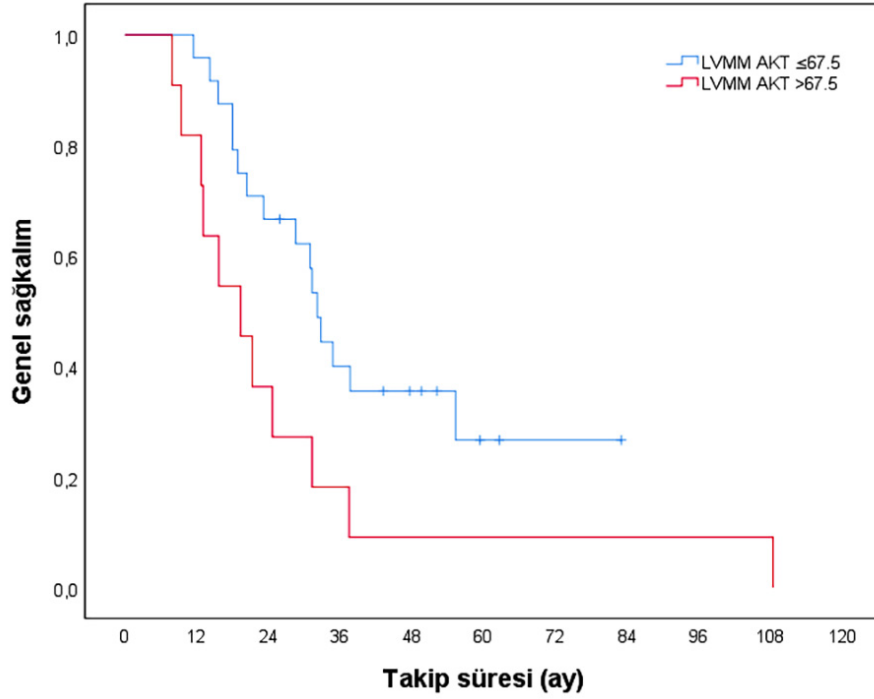
Şekil 4.11. Kaplan Meier eğrisi ile gruplararası sağkalım analizi

Mevcut değerlendirmelere göre Tümör AKT ≤ 57.5 olanlara göre Tümör AKT >57.5 olanlarda ölüm hızı istatistiksel anlamlı olarak 2,178 kat (95% CI: 1,113-4,261) artmakta idi ($p=0,023$). Şekil 4.12’de tümör AKT için tespit edilen optimal cut-off değere göre genel sağkalıma ilişkin Kaplan-Meier eğrileri yer almaktadır. Benzer şekilde KCM AKT ≤ 57.5 olanlara göre KCM AKT >57.5 olanlarda da ölüm hızı istatistiksel anlamlı olarak 2,322 kat (95% CI: 1,045-5,160) artmakta idi ($p=0,039$) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Kaplan Meier eğrisi ile farklı AKT düzeyleri ile sağkalım analizi

Şekil 4.13'te ise KCM AKT için tespit edilen optimal cut-off değere göre genel sağkalıma ilişkin Kaplan-Meier eğrileri yer almaktadır. Diğer göstergelere ilişkin elde edilen cut-off değerler üzerinden yapılan analizlerde ise genel sağkalım üzerinde istatistiksel olarak anlamlı belirleyiciliği olan herhangi bir etkene rastlanmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.11).



Şekil 4.13. Kaplan Meier eğrisi ile KCM AKT düzeyleri ile sağkalım analizi

Tablo 4.11. Genel sağkalım sonuçlarını öngörmeye miR-99b, miR-135b ve akt için optimum kesim (cut-off) noktaları ve buna noktalara göre tek değişkenli Cox'un oransal hazard regresyon analizi sonuçları

	Cut-off points	Hazard oranı	%95 Güven Aralığı		Wald	p-değeri
			<u>Alt sınır</u>	<u>Üst sınır</u>		
miR-99b-KRK	15,61	1,396	0,533	3,659	0,461	0,497
miR-99b-PK	13,85	0,948	0,318	2,829	0,009	0,924
miR-99b-KCM	3,265	1,604	0,600	4,293	0,886	0,347
miR-135b-KRK	2,27	0,444	0,168	1,172	2,690	0,101
miR-135b-PK	13,42	1,015	0,354	2,915	0,001	0,978
miR-135b-KCM	4,2	0,588	0,231	1,497	1,242	0,265
KRK Akt	57,5	2,178	1,113	4,261	5,168	0,023
PK Akt	72,5	1,077	0,440	2,640	0,027	0,870
KCM Akt	67,5	2,322	1,045	5,160	4,279	0,039

Akt: Akt geni, KRK: Kolorektal Kanser, PK: Peritoneal Karsinomatosis, KCM: Karaciğer Metastazı

Genel sağkalımı öngörmeye kantitatif miR-99b, miR-135b ve Akt ölçümleri için en iyi kesim noktalarını belirlemek amacıyla R programında yazılmış web tabanlı utoff Finder algoritmasını (<http://molpath.charite.de/cutoff>) kullanarak söz konusu değişkenlere ait en iyi kesme noktaları elde edildi. Bunun için her bir miR-99b, miR-135b ve akt ölçümü dikate alınarak söz konusu değişkenler ikili sonuçlu (dikotom) yapıya dönüştürüldü. Ardından Log-Rank test istatistiği sonucunun en çok önemliliğe sahip olduğu noktalar en iyi kesim noktaları olarak kabul edildi. Söz konusu kesme noktaları Tablo 4.11’de gösterilmiştir.

Tablo 4.12’de genel sağkalım üzerinde en fazla belirleyici olabileceği düşünülen faktörlerin birlikte etkileri “Enter” metodu kullanılarak incelendi. Çoklu değişkenli Cox’un oransal hazard regresyon modeli verildi.

Tek değişkenli istatistiksel analizler sonucunda $p < 0,25$ olarak saptanan tüm değişkenler aday faktörler olarak regresyon modeline dahil edildiler. Genel sağkalım üzerinde en fazla belirleyici olan etkenler sırasıyla; Tümör AKT, nöral invazyon ve KRAS idi. Diğer faktörlerden bağımsız olarak Tümör AKT ≤ 57.5 olanlara göre Tümör AKT > 57.5 olanlarda ölüm hızı istatistiksel anlamlı olarak 4,591 kat (95% CI: 1,527-13,801) artmaya devam etmekteydi (PS=0,007). Diğer faktörlere göre düzeltme yapıldığında nöral invazyon varlığının (HR=6,264; 95% CI: 1,482-26,470 ve P=0,013) ve KRAS açısından mutant olmanın (HR=2,757; 95% CI: 1,039-7,314 ve P=0,042) ölüm hızını artırdığı gözlemlendi.

Tablo 4.12’de bu kez klinik öngörüler doğrultusunda genel sağkalım üzerinde en fazla belirleyici olabileceği düşünülen faktörlerin birlikte etkilerinin incelendiği çoklu değişkenli Cox’un oransal hazard regresyon modeli gösterildi.

Klinik öngörüler doğrultusunda mevcut modelde genel sağkalım üzerinde en fazla belirleyici olan etkenler sırasıyla; tümör AKT, nüks varlığı ve miR-99b-KRK idi. Diğer faktörlerden bağımsız olarak Tümör AKT düzeyi arttıkça (HR=1,096; 95% CI: 1,026-1,170 ve $p=0,006$), nüks geliştikçe (HR=147,100; 95% CI: 2,951-7332,552 ve $p=0,012$) ve miR-99b-KRK düzeyi büyüdükçe (HR=1,188; 95% CI: 1,004-1,406 ve $p=0,045$) ölüm hızının artırdığı saptandı.

Tablo 4.12. Genel sağkalım üzerinde en fazla belirleyici olabileceği düşünülen faktörlerin birlikte etkilerinin incelenmesi – çoklu değişkenli Cox’un oransal hazard regresyon modeli

	Hazard oranı	%95 Güven Aralığı		Wald	p-değeri
		Alt sınır	Üst sınır		
Model 1					
Rektum tanısı almak	1,068	,384	2,970	0,016	0,899
T evresi	2,491	,828	7,489	2,639	0,104
Lenfovasküler invazyon	1,951	,692	5,505	1,597	0,206
Nöral invazyon	6,264	1,482	26,470	6,227	0,013
KRK Akt (>57,5)	4,591	1,527	13,801	7,367	0,007
Kras - mutant	2,757	1,039	7,314	4,148	0,042
Model 2					
Yaş	1,008	0,861	1,179	0,009	0,925
Evre	0,070	0,004	1,298	3,188	0,074
Nüks	147,100	2,951	7332,552	6,263	0,012
N pozitifliği	9,552	0,616	148,239	2,602	0,107
Nöral invazyon	92,033	0,537	15762,401	2,970	0,085
KRK Akt	1,096	1,026	1,170	7,492	0,006
miR-99b-KRK	1,188	1,004	1,406	4,008	0,045
Kras - Mutant	12,734	0,361	449,481	1,958	0,162

Akt: Akt geni, KRK: Kolorektal Kanser, N: Lenf Nodu, T: Tümör Derinliği

5. TARTIŞMA

KRK Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın üçüncü kanser ve kansere bağlı ölümün üçüncü en yaygın nedenidir. 2014-2019 yıllarında, yıllık insidansı 36,5/100000'dir. İnsidans cinsiyete göre benzerdir ve yaşla birlikte güçlü bir şekilde artar; ortalama tanı yaşı, gelişmiş ülkelerde yaklaşık 70 yıldır (1).

Güçlü kalıtsal bileşenlere rağmen, çoğu KRK vakası sporadiktir ve adenom-karsinom dizisi boyunca birkaç yıl içinde yavaş gelişir. Tedavinin temel taşları cerrahi, neoadjuvan radyoterapi (rektum kanserli hastalar için) ve adjuvan kemoterapi (evre III/IV ve yüksek riskli evre II kolon kanseri hastalar için)'dir. 5 yıllık rölatif sağkalım, evre I hastalığı olan hastalarda %90'dan fazla iken, evre IV hastalığı olan hastalarda %10'dan biraz fazladır (24).

MiRNA, protein kodlayan genlerin ekspresyonunun %60'ına kadar negatif modülasyonundan sorumlu olan kodlamayan RNA'ların en çok çalışılan sınıfını temsil eder (65). Bu miRNA'lar kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA'lara bağlanıp translasyonel baskılama veya mRNA yıkımı ile posttranskripsiyonel gen ekspresyonunun düzenlenmesini gerçekleştirmektedirler. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda kontrolsüz hücre bölünmesinin gerçekleştiği kanser hücrelerinde değişikliğe uğramış miRNA ekspresyonu araştırılmıştır; kanserin başlamasında ve ilerlemesinde, miRNA'lar hedefledikleri genin karakterine göre tümör süpresörler veya onkogenler gibi fonksiyon göstermektedirler (65). MiRNA'ların KRK ile ilk ilişkisi Michael ve ark. (91) on beş yıl önce normal kolon dokusuna kıyasla kolon kanserinde miR-143 ve miR-145 ekspresyonunun azaldığını bildirdiklerinde başlamıştır. O zamandan beri, KRK karsinogenezde miRNA'nın rolünü araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır. Adenomlardan KRK'nın evrimsel ilerlemesi göz önüne alındığında, KRK'daki miRNA'lar ile modüle edilmiş moleküler mekanizmaların derinlemesine anlaşılması büyük bir zorluk haline gelmiştir (65). Wnt/ β katenin, EGFR, TGF β ve TP53 sinyal yollarındaki değişikliklerin, KRK'nın hayatta kalması, çoğalması, invazyonu ve metastazı ile sonuçlandığı gösterilmiştir (65,91). Bu nedenle, birçok çalışma, KRK gelişimi, ilerlemesi ve metastazının altını çizen moleküler bulmacayı tamamlamak için miRNA'lar:mRNA etkileşim ağlarını kurmak için bu yollara odaklanmıştır. EGFR sinyal yolu, hücre proliferasyonuna, farklılaşmasına, göçüne ve apoptoza aracılık eden normal

embriyogenezde kritik bir role sahiptir. EGFR'nin genetik değişikliklerle fonksiyon kazanması kanser gelişimine yol açabilmektedir. KRK'nın yaklaşık %50'sinde EGFR gen amplifikasyonu, KRAS ve BRAF downstream mediatörlerinin mutasyonel aktivasyonu bulunur (65).

Son çalışmalar, onkogenik EGFR yolunun anormal aktivasyonunun TS-miRNA'ların fonksiyon kaybına bağlı olabileceğini bildirmiştir. EGFR yolunda yer alan en önemli TS-miRNA'lardan ikisi, birleşik eylemi KRAS ve BRAF (46) dahil olmak üzere EGFR yolunun birkaç üyesini hedefleyerek çoğalmayı ve migrasyonu azaltan miR-143 ve miR-145'tir. Let-7a'nın fonksiyon kaybı, yüksek KRAS ve c-MYC ve kolon tümörjenez seviyeleri ile ilişkilendirilirken, let-7 KRAS rs712 polimorfizmi, artan KRK riski ile korele idi (92). Son kanıtlar, miR-19a'nın KRAS ve VEGFA'yı hedefleyerek KRK anjiyogenezi engelleyebileceğini ve miR-181d'nin EGFR/KRAS yolunda bir downstream düzenleyicisi olan PEAK1'i tetikleyerek hücre çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu azalttığını doğrulamıştır. Öte yandan, KRAS yolunun aktivasyonu, bazı onkomiR'leri tetikleyebilir ve upregüle edebilir; örneğin, KRK gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan miR-210 ve miR-181a gibi veya KRK invazyonu ve metastazında çok önemli bir role sahip olan miR200c (65)'dir.

AKT-PI3K-mTOR yolu, yaklaşık %15-20 KRK'da amplifiye edilen EGFR yolunun ikinci sinyalleşme merkezini temsil eder (93). AKT-PIK3K-PTEN yolunun amplifikasyonuna hem miR-126, miR-497 ve miR-1 gibi TS-miR'lerin fonksiyon kaybı ya da miR-21, miR-19 ve miR -96 dahil olmak üzere birkaç oncomiR'nin upregülasyonu aracılık eder (65). Bununla birlikte, KRK'daki miRNA'lar-mRNA'lar ağları, daha spesifik KRK metastazı durumunda daha karmaşıktır. MiRNA'lar, kolorektal dolaşımdaki tümör hücrelerinin hareketinin altında yatan EMT'yi kontrol edebilir. Eksozomlarda kapsüllenmeleri ile miRNA'lar, karaciğer metastatik nişinin hazırlanmasında, bağışıklık sisteminin baskılanmasında ve karaciğer fenotipinin Dicer'a-bağlı bir şekilde modüle edilmesinde destek sağlar.

MiR-99 miR-99a, miR-99b ve miR-100'den oluşan microRNA (miR)-99 ailesi varlığı evrimsel olarak korunmuştur. Farklı hastalıklara göre hedefledikleri miRNA'lara göre davranışları değişebilmektedir. Lösemide tipik olarak onkogeniktirler. Diğer taraftan farklı kanserlerdeki fonksiyonel rolleri ise bir tümör baskılayıcı ve bir tümör destekleyicisi arasında değişir (65).

MiR-99 ailesinin hedefleri onkogenler ve tümör baskılayıcılar listelerinde yer almaktadır. Böylece bu miR ailesinin ikili rolünü oncomiR'ler ve farklı hücrel bağlamlarda TSmiR'ler olarak gösterebilmektedir. MiR-99 ailesi kanserlerdeki fonksiyonel rollerine ek olarak makrofaj inflamatuvar yanıtlarının ve T-hücre si alt kümelerinin biyolojisinin modülasyonunda yer alabilmektedir. Bundan dolayı doku homeostazının korunmasında, periferik toleransın kurulmasında ve ayrıca bir inflamatuvar reaksiyonun çözülmesinde kritik roller uygulamaktadır (65).

Khalaj ve ark. (157) Kanser Genom Atlası veri tabanından 153 AML vakasını analiz ederek tüm miR-99 ailesi üyelerinin ekspresyon seviyesinin AML'nin heterojen popülasyonunu oluşturan çoklu hücrelerin farklılaşma derecesi ile ters orantılı olduğunu buldu. Ayrıca, bu araştırmacılar, miR-99a/b/100'ü lösemik kök hücrelerin kendi kendini yenileme yeteneğinin sürdürülmesi için kritik faktörler olarak tanımladılar. Bununla birlikte lösemik kök hücrelerde ve AML hücre dizilerinde miR-99 hedefinin, bu hücrelerin farklılaşmasını destekleyen Hox transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesi olan HOXA1 olduğu belirlendi.

MiR-99 ailesi KRK'da önemli roller oynamaktadır. Bir TSmiR görevi gören miR-99 aile üyelerinin genellikle kanser metastazını engelleyebilmektedir. Li ve ark. (158) 56 primer KRK klinik numunesi ve ilgili karaciğer metastazları üzerinde yapılan bir çalışmada, miR-99b-5p downregülasyonun KRK'nın karaciğer metastazı sırasında yaygın bir olay olduğunu göstermiştir. MiR-99b-5p aşırı ekspresyon fenokopisi mTOR yıkımını gerçekleştirir, bu da miR-99b-5p'nin mTOR'u hedefleyerek KRK metastazını bloke ettiği anlamına gelebilmektedir. Fujino ve ark. KRK'nın lenf nodu metastazında miR-100'ün downregülasyonunu bildirmiştir (159)

Zheng ve ark. (160) HAGLROS'un yüksek ekspresyonunu, KRK hastaları için daha kısa bir hayatta kalma süresi ile korelasyonunu bulmuştur. Ayrıca, HAGLROS'un downregülasyonu, miR-100/ATG5 eksen ve PI3K/AKT/mTOR yolunun düzenlenmesiyle KRK hücrelerinde apoptozu indükleyebilir ve otofajiyi inhibe edebilmiştir.

miR-135 mikroRNA öncüsü, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan kodlamayan küçük bir RNA'dır ve miR-135b-5p memeliler arasında korunmuş bir transkripttir ve insanlarda 1q32.1 gen lokusunda yer alır. 2008'in başlarında, Nagel ve ark. (161) ilk olarak, miR-135a ekspresyonunun kolorektal adenomlarda ve

karsinomlarda önemli ölçüde yukarı regüle edildiğini bildirdi. Ayrıca, birkaç grup miR-135b-5p'nin yukarı regülasyonunun akciğer kanseri ve baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom dahil olmak üzere diğer kanser türlerinde kanser metastazını desteklediğini gözlemlenmiştir (162,163). Daha yakın zamanlarda, artan kanıtlar miR-135b-5p'nin KRK'nın transformasyonu ve ilerlemesinde rol oynadığını göstermiştir (204,205). Bununla birlikte, miR-135b-5p'nin KRK metastazına dahil olduğu kesin mekanizmalar karmaşık ve belirsizdir.

Li ve ark (166) MiR-135b-5p, TNM evre III/IV olan KRK hastalarının teşhisi için umut verici bir non-invaziv biyobelirteç ve kolorektal kanser için bir müdahale stratejisi geliştirmek için potansiyel bir aday olabileceğini bildirmiştir.

Bizim çalışmamızda, histopatolojik olarak kolorektal adenokarsinom tanısı konulan ileri evreli kolon ve rektum kanserli hastalarda karaciğer metastazı gelişen ve peritoneal kanser gelişen hastalar olmak üzere iki gruba ayrıldı. Karaciğer metastazlı doku ve peritoneal kanserli parafin bloklarından AKT geni, KRAS mutasyonu, miR-99b ve miR-135 düzeylerine bakarak sağkalıma etkisini araştırdık. Çalışmamızdaki kısıtlayıcı faktörler arasında en önemlisi olarak AKT, miR-99b ve miR-135 düzeyi bakılan örnek sayısının az olmasıdır. Az örnek sayısı klinik sonuçlara etki ederek sağkalıma etki edebilecek faktörleri kısıtlayabilmiştir. İkinci olarak, KRAS mutasyonu tespit düzeyinde hastaların çoğunda bulunmasına rağmen hepsinde düzeyi tespit edilememiştir. AKT geni AKT1 ve AKT2'yi birlikte içermesi ve fosfo-AKT düzeyinin ayrı şekilde ölçülmemesi hücre döngüsünde aktive edilmiş AKT'yi tam olarak tespitini zorlaştırmıştır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada KRK nedeniyle KCM ve PK gelişen hastaların klinik değerlerinin, KRAS ve Akt geni, miR99b ve mi135 seviyeleri ve sağkalıma etki eden faktörler kıyaslandı.

KRK, PK ve KCM'li dokulardaki AKT geni İHK grade sınıflama skoru ve yoğunluk yüzdesi istatistiksel olarak normal dokuya göre daha yüksekti ($P<0,001$). Mevcut değerlendirmelere göre ana tümörde Akt yoğunluk yüzdesinin %57.5'in üzerinde olması ölüm hızını istatistiksel anlamlı olarak artmakta idi ($P=0,023$). Benzer şekilde KCM'li hastalarda Akt yoğunluk yüzdesinin %67.5'in üzerinde olması ölüm hızı istatistiksel anlamlı olarak artmakta idi ($P = 0,039$). Bu bulgular eşliğinde Akt'nin KRK oluşumunu arttırdığını ve karaciğere metastazını progrese ettiğini düşündürmektedir.

Ana KRK dokularında miR-99b ve miR-135b ekspresyon düzeyi normal dokuya göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi (sırayla; $P=0,001$, $P=0,027$). Ayrıca, normal dokuya kıyasla periton metastazında ve karaciğer metastazı dokularda miR-99b ve miR-135b ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($P<0,05$). Genel sağkalım üzerinde en fazla belirleyici olan etkenler sırasıyla; ana tümör Akt, nöral invazyon ve KRAS mutant durumu idi. Diğer faktörlerden bağımsız olarak KRK tümör $AKT \leq 57.5$ olanlara göre primer tümör $AKT>57.5$ olanlarda ölüm hızı istatistiksel anlamlı olarak 4,591 kat artmaya devam etmekteydi ($P=0,007$). Diğer faktörlere göre düzeltme yapıldığında nöral invazyon varlığının ($P=0,013$) ve KRAS açısından mutant olmanın ($P=0,042$) ölüm hızını artırdığı gözlemlendi. Klinik öngörüler doğrultusunda mevcut modelde genel sağkalım üzerinde en fazla belirleyici olan etkenler sırasıyla; ana tümör AKT, nüks varlığı ve miR-99b-KRK idi. Diğer faktörlerden bağımsız olarak ana tümörde AKT düzeyi ($P = 0,006$) ve miR-99b arttıkça ($P = 0,045$) ve nüks hasta geliştikçe ($P=0,012$) ölüm hızının artırdığı saptandı.

MiR-99b ekspresyon seviyesi en yüksek düzeyde ana dokuda artmasına rağmen, miR-135b ekspresyon düzeyinin en düşük seviyede olduğu tespit edildi. Ayrıca, ana tümör doku ile kıyaslandığında PK ve KCM'de miR-99b ekspresyon düzeyinin azaldığı belirlenmesine rağmen, miR-135b ekspresyon düzeyinin sırasıyla ana dokuya göre daha çok arttığı analiz edildi. MiR-99b ekspresyonunun ana dokuya göre PK ve karaciğer metastazında azalması, invazyon ve metastazda koruyucu etkisi olduğunu

düşündürmektedir. Diğer taraftan, miR-135b'nin PK ve LVM'de ana dokuya göre ekspresyonun artması invazyon ve metastazı arttırdığını düşündürmektedir. Çalışmamızda örneklem sayısının az olması nedeniyle Akt ve KRAS ile, miR-99b ve miR-135b arasında korelasyon bulunamamasına neden olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; kolorektal kanserde, peritoneal karsinomatozis ve karaciğer metastazlı dokularda yüksek eksprese edilen miR-99b, miR-135b ve artmış Akt geni seviyelerinin normal dokuya göre önemli derecede farklı çıkması karsinomatozis ve metastazda önemli rol oynadığını göstermektedir. Primer tümörde miR-99b'in en yüksek iken, karaciğer metastazında düzeyinin düşmesi miR-99b'nin karaciğer metastazını koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan miR-135'nin ana dokuya göre en yüksek peritonda ve karaciğer metastazında tespit edilmesi karsinomatozisi ve metastazı progrese ettiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Siegel, RL. (2022). Cancer statistics. 2022. *CA Cancer J Clin*, 72, 7-33.
2. Sugarbaker, PH. (1998). Intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Semin Surg Oncol*, 14, 254-61.
3. Elias, D. (2002). Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy. *Cancer*, 92, 71-6.
4. Armaghany, T. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*, 5, 19-27.
5. Fearon, ER. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-67.
6. Schmutz, J. (2004). Quality assessment of the human genome sequence. *Nature*, 429, 365-8.
7. Neumann, J. (2015). Cancer Stem Cell Markers Are Associated With Distant Hematogenous Liver Metastases But Not With Peritoneal Carcinomatosis in Colorectal Cancer. *Cancer Invest*, 33, 354-60.
8. Thomassen, I. (2013). Incidence, prognosis, and treatment options for patients with synchronous peritoneal carcinomatosis and liver metastases from colorectal origin. *Dis Colon Rectum*. 56, 1373-80.
9. Cook, AD. (2005). Surgical resection of primary tumors in patients who present with stage IV colorectal cancer: an analysis of surveillance, epidemiology, and end results data, 1988 to 2000. *Ann Surg Oncol*, 12, 637-45.
10. Desch, CE. (2005). American Society of Clinical Oncology. Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J Clin Oncol*, 23, 8512-9.
11. Lewis, BP. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15-20.
12. Krek, A. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, 37, 495-500.
13. Heublein, S. (2018). Association of differential miRNA expression with hepatic vs. peritoneal metastatic spread in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 18, 201.
14. Mitamura, T. (2013). Downregulation of miRNA-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinase MET. *Oncogenesis*, 2(3):e40.
15. Thiery, JP. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-90.
16. Cao, H. (2015). Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract*, 211, 557-69.
17. Lamb, MN. (2015). Anatomy, physiology, and measurement of physiologic function for colorectal surgery. Scientific American Surgery Decker Intellectual Properties Inc PP 3-12.
18. Sakorafas, GH. (2006). Applied vascular anatomy of the colon and rectum: clinical implications for the surgical oncologist. *Surg Oncol*. 15, 243-55.
19. Alex, Brady. The Mc-Graaw-Hill Company Inc. <https://br.pinterest.com/pin/54254370486951348/>
20. Heald, RJ. (1998). The 'Holy Plane' of rectal surgery. *J R Soc Med*, 81, 503-8.
21. Heald, RJ. (1998). Rectal cancer: the Basingstoke experience of total mesorectal excision. 1978-1997. *Arch Surg*, 133, 894-9.
22. Kapiteijn, E. (2001). Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med*, 345, 638-46.
23. Milla, PJ. (2009). Advances in understanding colonic function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 48 Suppl 2, S43-5.
24. Brenner, H. (2014). Colorectal cancer. *Lancet*. 383, 1490-1502.
25. Levin, B. (2008). Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps. 2008: A joint guideline from the American cancer society, the US multi-society task force on colorectal cancer, and the American college of radiology. *CA Cancer J. Clin*, 58, 130-160.
26. Ferlay, J. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer*, 144, 1941-1953.
27. Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487, 330-337.
28. Guinney, J. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* 21, 1350-1356.
29. Malki, A. (2020). Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci*, 22, 130.
30. Markowitz, SD. (2009). Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med*, 361, 2449-2460.
31. Wu, P. (2012). Differential regulation of transcription factors by location-specific EGF receptor signaling via a spatio-temporal interplay of ERK activation. *PLoS ONE*, 7, e41354.
32. Martini, M. (2014). PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med*. 46, 372-383.

33. DeGraffenried, L.A. (2015). Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway. *Ann Oncol*, 15, 1510–16.
34. Bérout, C. (1996). Database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, 24, 121–124.
35. Kwon, C. (2011). Notch post-translationally regulates? B-catenin protein in stem and progenitor cells. *Nat. Cell Biol*, 13, 1244–1251.
36. Liu, Y. (2006). Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 976–981.
37. Schwarzenbach, H. (2013). Loss of Heterozygosity. In Brenner's Encyclopedia of Genetics. 2nd ed.; Maloy S, Hughes K, Eds, Academic Press: San Diego. CA. USA. 2013; pp. 271–273.
38. Mori, Y. (2001). Instability typing: Comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res*, 61, 6046–6049.
39. González-Ramírez, I. (2011). DNA methylation in oral squamous cell carcinoma: Molecular mechanisms and clinical implications. *Oral Dis*, 17, 771–778.
40. Ogino, S. (2006). CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut*, 55, 1000–1006.
41. Bos, J.L. (1987). Prevalence of RAS mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 327, 293–7.
42. Kafatos, G. (2017). RAS mutation prevalence among patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of real-world data. *Biomark Med*, 11, 751–60.
43. Kwak, M.S. (2018). Clinical predictors for KRAS codon 13 mutations in patients with colorectal cancer. *J Clin Gastroenterol*, 52, 431–6.
44. Mao, C. (2012). PIK3CA exon 20 mutations as a potential biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*, 23, 1518–25.
45. Tejpar, S. (2012). Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol*, 30, 3570–7.
46. Andreyev, H.J. Kirsten Ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter “RASCAL” study. *J Natl Cancer Inst*, 90, 675–84.
47. Heinemann, V. (2009). Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev*, 35, 262–71.
48. Schiripa, M. (2015). Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*, 136, 83–90.
49. Murtaza, B. (2014). Spectrum of KRAS mutations in Pakistani colorectal cancer patients. *Braz J Med Biol Res*, 47, 35–41.
50. Au, H.J. (2009). Health-related quality of life in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab: Overall and KRAS-specific results of the NCIC CTG and AGITG CO.17 Trial. *J Clin Oncol*, 27, 1822–8.
51. Davies, H. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417, 949–54.
52. Maughan, T.S. (2011). Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet*, 377, 2103–14.
53. Tie, J. (2011). Optimizing targeted therapeutic development: analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAF(V600E) mutation. *Int J Cancer*, 128, 2075–84.
54. Hsieh, L.L. (2012). Characteristics and prevalence of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in colorectal cancer by high-resolution melting analysis in Taiwanese population. *Clin Chim Acta*, 413, 1605–11.
55. Datta, S.R. (1999). Cellular survival: A play in three acts. *Genes Dev*, 13, 2905–27.
56. Knobbe, C.B. (2003). Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain pathology*, 13, 507–18.
57. Cheng, J.Q. (1996). Amplification of AKT2 in human pancreatic cancer cells and inhibition of AK12 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 1996; 3641.
58. Roy, H.K. (2002). AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 23, 201–5.
59. Cai, N. (2013). The miR-302-367 cluster suppresses the proliferation of cervical carcinoma cells through the novel target AKT1. *Rna*, 19, 85–95

60. Cui, W. (2013). micro RNA-133a regulates the cell cycle and proliferation of breast cancer cells by targeting epidermal growth factor receptor through the EGFR/Akt signalling pathway. *The FEBS journal*, 280, 3962-74.
61. Guo, C. (2008). The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signalling and is frequently lost in colon cancers. *Genes. Chromosomes and Cancer*, 47, 939-46.
62. Li, J. (2018). MicroRNA758 inhibits malignant progression of retinoblastoma by directly targeting PAX6. *Oncology reports*, 40, 1777-86.
63. Bar, N. (2010). miR-22 forms a regulatory loop in PTEN/AKT pathway and modulates signalling kinetics. *PloS one*, 5, e10859.
64. Li, N. (2018). MiR-182-5p Promotes Growth in Oral Squamous Cell Carcinoma by Inhibiting CAMK2N1. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49, 1329-41.
65. Balacescu, O. (2018). The Impact of miRNA in Colorectal Cancer Progression and Its Liver Metastases. *Int J Mol Sci*, 19, 3711.
66. Calin, GA. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 15524–15529.
67. Zhang, B. (2007). MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 302, 1–12.
68. Johnson, SM. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120: 635–647.
69. Lee, YS. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, 4, 199-227.
70. Pretzsch, E. (2019). Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *J Oncol*, 2019, 7407190.
71. Mann, KM. (2012). “Sleeping Beauty mutagenesis reveals cooperating mutations and pathways in pancreatic adenocarcinoma.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 5934–5941.
72. Dimova, I. (2014). Angiogenesis in cancer-general pathways and their therapeutic implications. *Journal of BUON*, 19, 15–21.
73. Itatani, Y. (2013). Loss of SMAD4 from colorectal cancer cells promotes CCL15 expression to recruit CCR1+ myeloid cells and facilitate liver metastasis. *Gastroenterology*, 145, 1064-1075.e11.
74. Lambert, AW. (2017). Emerging biological principles of metastasis. *Cell*, 168, 670–691.
75. Sluiter, N. (2016). Adhesion molecules in peritoneal dissemination: function, prognostic relevance and therapeutic options. *Clinical and Experimental Metastasis*, 33, 401–416.
76. van der Wal, JB. (2007). Biology of the peritoneum in normal homeostasis and after surgical trauma. *Colorectal Dis*, 9, 9-13.
77. Lemoine, L. (2016). Pathophysiology of colorectal peritoneal carcinomatosis: Role of the peritoneum. *W J Gastroenterol*, 22, 7692-707.
78. Jayne, D. (2007). Molecular biology of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res*, 134, 21-33.
79. Hirohashi, S. (1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*, 153, 333-339.
80. Carmignani, CP. (2003). Intraperitoneal cancer dissemination: mechanisms of the patterns of spread. *Cancer Metastasis Rev*, 22, 465-472.
81. Bracke, ME. (2007). Role of adhesion molecules in locoregional cancer spread. *Cancer Treat Res*, 134, 35-49.
82. Gerber, SA. (2006). Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *Am J Pathol*, 169, 1739-1752.
83. Sawada, K. (2007). c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion. *Cancer Res*, 67, 1670-1679.
84. Osada, S. (2010). Effect of hepatocyte growth factor on progression of liver metastasis in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*, 57, 76-80.
85. Jayne, DG. (1999). A three-dimensional in-vitro model for the study of peritoneal tumour metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 17, 515-523.
86. Heath, RM. (2004). Tumour-induced apoptosis in human mesothelial cells: a mechanism of peritoneal invasion by Fas Ligand/Fas interaction. *Br J Cancer*, 90, 1437-1442.
87. Brinckerhoff, CE. (2002). Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 207-214.
88. Varghese, S. (2007). Site-specific gene expression profiles and novel molecular prognostic factors in patients with lower gastrointestinal adenocarcinoma diffusely metastatic to liver or peritoneum. *Ann Surg Oncol*, 14, 3460-3471.
89. Olcina, MM. (2016). H3K9me3 facilitates hypoxia-induced p53-dependent apoptosis through repression of APAK. *Oncogene*, 35, 793-799.

90. Jiang, BH. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol*, 271, C1172-C1180.
91. Michael, MZ. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 1, 882-91.
92. Chen, M. (2018). Overexpression of miR-19a inhibits colorectal cancer angiogenesis by suppressing KRAS expression. *Oncol Rep*, 39, 619-626.
93. Velho, S. (2005). The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer*, 41, 1649-54.
94. Thiery, JP. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-90.
95. Siemens, H. (2011). MiR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle*, 10, 4256-71.
96. Cui, F. (2016). MiR-375 inhibits the invasion and metastasis of colorectal cancer via targeting SP1 and regulating EMT-associated genes. *Oncol Rep*, 36, 487-93.
97. Chen, Y. (2016). MicroRNA-374a suppresses colon cancer progression by directly reducing CCND1 to inactivate the PI3K/AKT pathway. *Oncotarget*, 7, 41306-41319.
98. Hur, K. (2013). MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*, 62, 1315-26.
99. Sun, Y. (2014). MiR-429 inhibits cells growth and invasion and regulates EMT-related marker genes by targeting Onecut2 in colorectal carcinoma. *Mol Cell Biochem*, 390, 19-30.
100. Geng, L. (2014). MicroRNA-192 suppresses liver metastasis of colon cancer. *Oncogene*, 33, 5332-40.
101. Costa, V. (2017). MiR-675-5p supports hypoxia induced epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells. *Oncotarget*, 8, 24292-24302.
102. Cai, HK. (2017). MicroRNA-194 modulates epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer metastasis. *Onco Targets Ther*, 10, 1269-1278.
103. Squadrito, ML. (2014). Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Rep*, 8, 1432-46.
104. Hoshino, A. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527, 329-35.
105. Qiu, M. (2015). Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study. *Oncotarget*, 6, 38658-66.
106. Meehan, K. (2016). The contribution of tumour-derived exosomes to the hallmarks of cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 53, 121-31.
107. Takano, Y. (2017). Circulating exosomal microRNA-203 is associated with metastasis possibly via inducing tumor-associated macrophages in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8, 78598-78613.
108. Shao, Y. (2018). Colorectal cancer-derived small extracellular vesicles establish an inflammatory premetastatic niche in liver metastasis. *Carcinogenesis*, 39, 1368-1379.
109. Peng, ZY. (2019). Downregulation of exosome-encapsulated miR-548c-5p is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Cell Biochem*, 120, 1457-1463.
110. Yan, S. (2018). Exosomal miR-6803-5p as potential diagnostic and prognostic marker in colorectal cancer. *J Cell Biochem*, 119, 4113-4119.
111. Fu, F. (2018). Circulating Exosomal miR-17-5p and miR-92a-3p Predict Pathologic Stage and Grade of Colorectal Cancer. *Transl Oncol*, 11, 221-232.
112. Monzo, M. (2017). Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer. *Oncotarget*, 8, 30859-30869.
113. Teng, Y. (2017). MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun*, 8, 14448.
114. Whiteside, TL. (2016). Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *J Clin Invest*, 126, 1216-23.
115. Lan, H. (2015). MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. *Biomed Res Int*, 2015, 125094.
116. Wang, J. (2014). Identification of a circulating microRNA signature for colorectal cancer detection. *PLoS One*, 9, e87451.
117. Toiyama, Y. (2014). Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Ann Surg*, 259, 735-43.
118. Hibner, G. (2018). Relevance of MicroRNAs as Potential Diagnostic and Prognostic Markers in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 19, 2944.
119. Kuipers, EJ. (2015). Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15065.
120. Nadel, MR. (2005). A national survey of primary care physicians methods for screening for fecal occult blood. *Ann Intern Med*, 142, 86-94.

121. Segnan, N. (2005). Score Working Group-Italy. *J Natl Cancer Inst*, 97, 347-57.
122. Anne, BB. (2007). Colorectal cancer. *Clinical Review BMJ*, 335, 715-8.
123. Brenner, DJ. (2005). Mass screening with CT colonography: should the radiation exposure be of concern? *Gastroenterology*, 129, 328.
124. Kodner, IJ. (1994). Colon Rektum and Anus. *Diagnosis Schwartz Principles of Surgery*, 2, 1262-64.
125. Köksal, F. (2011). Kolorektal Karsinogeneziste Mikro Rna'nın Rolü. *Tez*, Sayfa 21-23.
126. Di Como, Joseph A. (2015). "Adenosquamous carcinoma of the colon and rectum: a population based clinical outcomes study involving 578 patients from the Surveillance Epidemiology and End Result (SEER) database (1973–2010)". *Journal of the American College of Surgeons*. 221 (4): 56
127. Mitrovic, B. (2012). Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol*, 25, 1315-25.
128. Fenoglio – Preiser, CM. (1999). Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of large intestine. In *Gastrointestinal Pathology an atlas and text*. 2 th. ed. Philadelphia: Lippincot-Raven Publishers, 909-1068.
129. National Comprehensive Cancer Network (NCCN): Rectal Cancer. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/rectal.pdf. Published August 7. 2018. Accessed January 29. 2019.
130. Brenner, H. (2012). Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: the EURO CARE study. *Int J Cancer*, 2012, 131, 1649–58.
131. Quirke, P. (2014). EURECCA consensus conference highlights about colorectal cancer clinical management: the pathologists expert review. *Virchows Arch*, 464, 129–34.
132. Valentini, V. (2014). EURECCA consensus conference highlights about rectal cancer clinical management: The radiation oncologist's expert review. *Radiother Oncol*, 110, 195–198.
133. van de Velde, CJ. (2013). EURECCA colorectal: multidisciplinary mission statement on better care for patients with colon and rectal cancer in Europe. *Eur J Cancer*, 49, 2784–90.
134. Taylor, FG. (2014). Preoperative magnetic resonance imaging assessment of circumferential resection margin predicts disease-free survival and local recurrence: 5-year follow-up results of the MERCURY study. *J Clin Oncol*, 32, 34–43.
135. Veldkamp, R. (2005). Laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: short-term outcomes of a randomised trial. *Lancet Oncol*, 6, 477–484.
136. Bonjer, HJ. (2015). A Randomized Trial of Laparoscopic versus Open Surgery for Rectal Cancer. *N Engl J Med*, 372, 1324–1332.
137. Ramji, KM. (2016). Comparison of clinical and economic outcomes between robotic, laparoscopic, and open rectal cancer surgery: early experience at a tertiary care center. *Surg Endosc*, 30, 1337-43
138. Sauer, R. (2004). Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*, 351, 1731–40.
139. Glimelius, B. (2013). Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 24, vi81–vi88.
140. Labianca, R. (2013). Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 24, vi64–72.
141. McCleary, NJ. (2013). Impact of age on the efficacy of newer adjuvant therapies in patients with stage II/III colon cancer: findings from the ACCENT database. *J Clin Oncol*, 31, 2600–6.
142. Van Cutsem, E. (2014). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 25, 1–9.
143. Willett, CG. (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med*, 10, 145–7.
144. Hurwitz, H. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 350, 2335-42.
145. Giantonio, BJ. (2007). Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*, 25, 1539–44.
146. Kubicka, S. (2013). Bevacizumab plus chemotherapy continued beyond first progression in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with bevacizumab plus chemotherapy: ML18147 study KRAS subgroup findings. *Ann Oncol*, 24, 2342–9.
147. Ayez, N. (2012). Outcome of microscopic incomplete resection (R1) of colorectal liver metastases in the era of neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol*, 19, 1618–27.
148. Evrard, S. (2014). Combined ablation and resection (CARE) as an effective parenchymal sparing treatment for extensive colorectal liver metastases. *PLoS One*, 9, e114404.

149. Falcone, A. (2007). Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nor. *J Clin Oncol*, 25, 1670–6.
150. Heinemann, V. (2014). FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 15, 1065–75.
151. Benoist, S. (2006). Complete response of colorectal liver metastases after chemotherapy: does it mean cure? *J Clin Oncol*, 24, 3939–45.
152. Segelman, J. (2012). Incidence, prevalence and risk factors for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg*, 99: 699-705.
153. Franko, JSQ. (2016). Prognostic value of isolated peritoneal versus other metastatic sites in colorectal cancer patients treated by systemic chemotherapy: Findings from 9,265 patients in the ARCAD database. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 4, abstr 656.
154. Verwaal, VJ. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 21, 3737-3743
155. Kuijpers, AM. (2013). Cytoreduction and HIPEC in the Netherlands: nationwide long-term outcome following the Dutch protocol. *Ann Surg Oncol*, 20, 4224-4230
156. Rychahou, PG. (2008). Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20315-20.
157. Khalaj, M. (2017). MiR-99 regulates normal and malignant hematopoietic stem cell self-renewal. *J Exp Med*, 214, 2453-2470.
158. Li, W. (2015). MiR-99bb-5p suppresses liver metastasis of colorectal cancer by down-regulating mTOR. *Oncotarget*, 6, 24448-62.
159. Fujino, Y. Downregulation of microRNA-100/microRNA-125b is associated with lymph node metastasis in early colorectal cancer with submucosal invasion. *Cancer Sci*, 108, 390-397.
160. Zheng, Y. (2019). Long noncoding RNA HAGLROS regulates apoptosis and autophagy in colorectal cancer cells via sponging miR-100 to target ATG5 expression. *J Cell Biochem*, 120, 3922-3933.
161. Nagel, R. (2008). Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res*, 68, 5795–5802.
162. Lin, CW. (2013). MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the hippo pathway and LZTS1. *Nat Commun*, 4, 1877.
163. Zhang, L. (2013). MicroRNA-135b acts as a tumor promoter by targeting the hypoxia-inducible factor pathway in genetically defined mouse model of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*, 331, 230–238.
164. Valeri, N. (2014). MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. *Cancer Cell*, 25, 469–483.
165. Wu, W. (2014). MicroRNA-135b regulates metastasis suppressor 1 expression and promotes migration and invasion in colorectal cancer. *Mol Cell Biochem*, 388, 249–259
166. Li, L. (2020). Identification of stool miR-135b-5p as a non-invasive diagnostic biomarker in later tumor stage of colorectal cancer. *Life Sci*, 260, 118417.

EK

Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 11/12/2020-E.11069



T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı



Sayı : 71522473/050.01.04/ 587
Konu : Girişimsel Olmayan Etik Kurul
Başvuru Dosyası Hk.

Sayın Prof. Dr. Mustafa DUMAN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Kartal Koşuyolu Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Gastroenteroloji Cerrahisi Bilim Dalı

İlgi : Girişimsel Olmayan Etik Kurul Başvuru Dosyası Hk.

Destekleyicisi olduğunuz "Kolorektal Kanserde Peritoneal Karsinomatozise ve Karaciğer Metastazına Etki Eden Hücre İçi Sinyal Yolakları ve mikroRNA Ekspresyonunun İlişkisi" isimli çalışmanın ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup; çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen şekilde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına etik kurul üyelerince karar verilmiştir. Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hasan Çetin EKERBİÇER
Etik Kurulu Başkanı

Yücel DEMİR
Etik Kurulu Sekr.

11 / 12 / 20

Evrakı Doğrulamak İçin : <http://193.140.253.232/envision.Sorgula/BelgeDogrulama.aspx?V=BEGLBUZHB>

Fakülte Girişimsel Olmayan Etik Kurulu- Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dekanlık, Kocacık Kampüsü, Kocacık, Adapazarı/Sakarya

E-Posta : etik@sakarya.edu.tr Elektronik Ağ : www.tip.sakarya.edu.tr



