



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KOLOREKTAL ADENOKARSİNOM
HASTALARINDA METASTAZ OLUŞUMU VE
TERAPİYE YANIT FARKLILIKLARINDAKİ
MOLEKÜLER ALT YAPININ
ARAŞTIRILMASI**

MEHTAP ÇEVİK

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

İSTANBUL, 2022



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES



**INVESTIGATION OF MOLECULAR
BACKGROUND DIFFERENCES IN
METASTASIS FORMATION AND
THERAPEUTIC RESPONSE IN
PATIENTS WITH COLORECTAL
ADENOCARCINOMA**

MEHTAP CEVIK

Ph.D. THESIS
Department of Biology

Thesis Supervisor
Prof. Dr. Belgin SUSLEYICI

ISTANBUL, 2022

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Öğrencisi Mehtap Çevik'in “**Kolorektal adenokarsinom hastalarında metastaz oluşumu ve terapiye yanıt farklılıklarındaki moleküler alt yapının araştırılması**” başlıklı tez çalışması, 31/03/2022 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Belgin SÜSLEYİCİ (Danışman)

Marmara Üniversitesi

Prof.Dr. Atila KARAALP (Üye)

İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Halit Eren TAŞKIN (Üye)

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa

Prof. Dr. Selen YURDAKUL (Üye)

Demiroğlu Bilim Üniversitesi

Prof. Dr. Filiz VARDAR (Üye)

Marmara Üniversitesi

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile Mehtap Çevik'in Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Doktora derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ

TEŞEKKÜR/ÖNSÖZ

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, bilimsel ve akılcı düşünceyi öğreten, bilimsel veya kişisel, karşıma çıkan sorunlarımda çözümci yaklaşımları ile bana destek olan, bilim insanı olma yolunda beni her daim sabırla destekleyen ve fırsatlar sunan, aynı zamanda anne sevgisini ve şefkatini de eksik etmeyen kıymetli Hocam Sayın Prof. Dr. Belgin Süsleyici'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamımın her anında, maddi ve manevi fedakârlıklarda bulunarak beni yetiştiren, sevgisini hiç esirgemeyen ve beni güçlü kılan Annem Müzeyyen Kocamanoğlu'na; her daim yanımda oldukları, koşulsuz sevgileri ve destekleri için kardeşlerim Maviş Merve Kölemen ve Efem Ogün Çevik'e ve iyi bir örnek olmayı dilediğim sevgili yeğenlerim Doğa Nil ve Mutlu Alex'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Her ne kadar uzun yıllardır yanımda olamasa da beni her daim destekleyeceğini ve seveceğini bildiğim rahmetli babam Mehmet Mutlu Çevik'e özlemle teşekkür ederim.

İyi ve kötü her günümde yanımda olan ve olacağını bildiğim can dostum Leyla Aydoğan'a kucak dolusu teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmam sürecinde sağladığı maddi destek dolayısı ile TÜBİTAK-BİDEB 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı'na teşekkür ederim.

Mart 2022

Mehtap ÇEVİK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
	No
ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	VIII
ABSTRACT	X
YENİLİK BEYANI	XII
SEMBOLLER	XIV
KISALTMALAR	XV
ŞEKİL LİSTESİ	XIX
TABLO LİSTESİ	XXIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Kolorektal Kanser Sıklığı	1
1.2. Sporadik Kolorektal Adenokarsinoma Risk Faktörleri	2
1.2.1. Alkol Tüketimi	2
1.2.2. Beslenme Şekli ve İçeriği	3
1.2.3. Bağırsak Mikrobiyotası	3
1.3. Kolorektal Kanser Karsinogenezi	4
1.3.1. Kromozomal Kararsızlık	4
1.3.2. Mikrosatellit Kararsızlığı	5
1.3.3. CpG Adası Metilatör Fenotip	5
1.4. Kolorektal Karsinomun Genetik Modelleri	6
1.4.1. Kalıtsal Kolorektal Kanserler	6
1.4.1.1. Adenomatoz Polipozis Sendromu	6
1.4.1.2. MUTYH Polipozisi	7
1.4.1.3. Peutz-Jeghers Sendromu	7
1.4.1.4. Kalıtsal Polipoz Olmayan Kolorektal Kanser	7
1.4.2. Sporadik Kolorektal Kanser	8
1.5. Primer Tümör Lokalizasyonu	9
1.6. Kemoterapi	12
1.6.1. Floro-Pirimidinler	12
1.6.2. Kombine Terapi	15

1.7. Yan Etkiler	16
1.7.1. El-Ayak Sendromu	16
1.7.2. Nötropeni	17
1.7.3. Mukozit	17
1.7.4. Diyare	18
1.8. Pirimidin Yolağı Temel Molekülleri	19
1.8.1. Dihidropirimidin Dehidrojenaz	19
1.8.1.1. <i>DPYD</i> Polimorfizmleri	20
1.8.2. Metilentetrahidrofolat Redüktaz	24
1.8.2.1. <i>MTHFR</i> Gen Polimorfizmleri	25
1.8.3. Timidilat Sentaz	26
1.9. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş	27
1.9.1. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş Uyarıcı <i>SNAI1</i>	29
1.9.2. Lisil Oksidaz Benzeri Protein 2	31
1.10. İmmün Kontrol Noktası Molekülleri	34
1.10.1. Programlı Hücre Ölümü-1	36
1.10.1.1. <i>PD-1</i> Gen Polimorfizmleri	38
1.10.2. Programlı Hücre Ölümü Ligandları	39
1.10.2.1. <i>PDL-1</i> Gen Polimorfizmleri	41
1.11. Anjiyogenez ve Kanser Gelişimindeki Önemi	42
1.11.1. Anjiyogenezi Kontrol Eden Faktörler	44
1.11.2. VEGF Sinyal Yolu ve VEGF-A	45
1.11.2.1. <i>VEGF-A</i> Polimorfizmleri	47
1.11.3. Anti-VEGF Terapi	49
1.12. Amaçlar	52
2. MATERYAL ve YÖNTEM	55
2.1. Materyal	55
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	55
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	56
2.2. Yöntem	57
2.2.1. Çalışma Grubunun Seçimi	57
2.2.2. Kan Örneklerinin Toplanması	58

2.2.3. DNA İzolasyonu	58
2.2.4. DNA Miktarlarının Ölçümü	60
2.2.5. Genotipleme	60
2.2.5.1.MikrodizinYöntemi ile Genotipleme	60
2.2.5.2.Kütle Spektrometresi ile Genotipleme	69
2.2.6. Toksisite Değerlendirilmesi	78
2.2.7. DPYD Fenotiplerin Belirlenmesi	78
2.2.7.1.5-FU Normal Metabolizörler	79
2.2.7.2.5-FU Orta Derece Metabolizörler	79
2.2.7.3.5-FU Zayıf Metabolizörler	79
2.2.8. İstatistiksel Analiz	79
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	81
4. SONUÇLAR	196
5. KAYNAKLAR	198
6. EKLER	268
7. ÖZGEÇMİŞ	254

ÖZET

Çalışmamızda kanser gelişiminin farklı basamaklarında ve ilaç metabolizmasında görev alan dihidropirimidin dehidrogenaz (*DPYD*), metilentetrahidrofolat redüktaz (*MTHFR*), timidilat sentaz (*TYMS*), *SNAI1*, lisil oksidaz benzeri protein 2 (*LOXL2*), programlı hücre ölümü-1 (*PD-1*), programlı hücre ölümü ligandı 1 (*PDL-1*), vasküler endotelial büyüme faktörü A (*VEGF-A*) genlerine ait spesifik polimorfizmlerin kolorektal kanser (KRK) ile ilişkilerini Türk toplumunda detaylı olarak ortaya çıkarmayı hedefledik. Çalışmamızdan elde edeceğimiz sonuçlar ile KRK etiyolojisinde tam olarak ortaya çıkarılmamış genetik etkileşimleri ve yeni terapötik hedefleri tespit etmeyi ve mevcut tedavi seçeneklerin iyileştirilmesine yönelik veriler elde etmeyi amaçladık.

Çalışmaya toplamda histolojik olarak doğrulanmış 103 KRK hastası ve kanser veya otoimmün bozukluk öyküsü olmayan 86 gönüllü dahil edilmiştir. Genotip analizleri *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* polimorfizmleri için mikrodizin bazlı *Infiniti Plus* analizörü (*AutoGenomics Inc.*); *SNAI1*, *LOXL2*, *PD-1*, *PDL-1* ve *VEGF-A* polimorfizmleri için ise kütle spektrometresi temeline dayanan *MassARRAY* platformu (*Agena Bioscience*) kullanılarak yapılmıştır.

Çalışma grubumuzda *DPYD* 496A>G polimorfizminin 5-FU kaynaklı 0-2 seviyede yan etkiler ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir ($p=0.02$). *PD-1* rs36084323 CT ($p<0.001$), *PD-1* rs7421861 GA ($p=0.007$) ve *PDL-1* rs2282055 GG ($p=0.040$) genotipleri azalan KRK riski ile ilişkili bulunmuştur.

LOXL2 rs6999447 CT+TT ve *SNAI1* rs6125849 GA+AA genotiplerinin sinerjetik birlikteliği artan metastaz riski ile ilişkili bulunmuştur (OR:5.739, $p=0.019$ ve OR:4.562, $p=0.03$). *VEGF-A* -460TT ve CT+TT genotiplerinin azalan karaciğer metastazı riski ile ilişkili olduğu saptanmıştır (OR:0.080 $p=0.02$ ve OR:0.191, $p=0.04$, sırası ile). *VEGF-A* +405GC+CC ve *DPYD* 496AG+GG genotipleri sol kolon kanseri geliştirme riski ile yakın ilişkili bulunmuşlardır (OR:5.208, $p=0.04$ ve OR:4.777, $p=0.05$).

DPYD 85TC+CC genotiplerine sahip hastaların progresyonsuz ve genel sağ kalım sürelerinin daha uzun olduğu belirlenmiştir (Log rank=6.60, $p=0.01$ ve Log rank=4.40, $p=0.04$). *PDL-1* rs2282055 TT genotipine sahip hastaların GG genotipinde olanlara

kıyasla daha uzun progresyonsuz ve genel sağ kalım gösterdikleri saptanmıştır (Bonferroni düzeltilmiş Log rank $p=0.013$ ve $p=0.009$). *VEGF-A* +405GC+CC genotipine sahip hastalarda bevasizumab kullanımının daha kısa progresyonsuz sağ kalımla bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Log rank=4.61, $p=0.03$).

Araştırmamızda Türk toplumunda KKK hassasiyeti, metastazı, primer tümörün yeri, prognozu ve kemoterapi cevabında etkili genetik risk faktörleri ve yeni potansiyel terapötik bölgeler belirlenmiştir. Bulgularımızın KKK biyolojisi ve kemoterapisinde rol alan genetik mekanizmalarının anlaşılması yoluyla kişiselleştirilmiş tedavi rejimlerinin iyileştirilmesine katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal Kanser, *DPYD*, Metastaz, Sağ Kalım, *PD-1*, *PDL-1*, *SNAI1*, *LOXL2*, *VEGF-A*

ABSTRACT

In the present study, we aimed to reveal the detailed relationships between colorectal cancer (CRC) and specific genetic variations on dihydropyrimidine dehydrogenase (*DPYD*), methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*), thymidylate synthase (*TYMS*), *SNAI1*, lysyl oxidase-like protein 2 (*LOXL2*), programmed cell death-1 (*PD-1*), programmed cell death ligand 1 (*PDL-1*), vascular endothelial growth factor A (*VEGF-A*) genes, which are involved in different stages of cancer development and drug metabolism, in Turkish population. We intended to detect genetic interactions that have not been well established in CRC etiology and new therapeutic targets, and to obtain data to improve existing therapeutic options.

A total of 103 histologically confirmed CRC patients and 86 volunteers without cancer or autoimmune disorder history were included in the study. Microarray based Infiniti Plus analyzer (AutoGenomics Inc.) was used for genotyping of *DPYD*, *MTHFR* and *TYMS* polymorphisms and mass spectrometry based MassARRAY platform (Agena Bioscience) was used for *SNAI1*, *LOXL2*, *PD-1*, *PDL-1* and *VEGF-A* polymorphisms.

In our study group, *DPYD* 496A>G polymorphism was found to be associated with 5-FU-induced grade 0-2 adverse events ($p=0.02$). *PD-1* rs36084323 CT ($p<0.001$), *PD-1* rs7421861 GA ($p=0.007$) and *PDL-1* rs2282055 GG ($p=0.040$) genotypes were found to be associated with reduced CRC risk.

The synergetic existing of *LOXL2* rs6999447 CT+TT and *SNAI1* rs6125849 GA+AA genotypes were related with increased metastasis risk (OR:5.739, $p=0.019$ and OR:4.562, $p=0.03$, respectively). *VEGF-A* -460TT and CT+TT genotypes were found to be involved in reduced liver metastasis risk (OR:0.080 $p=0.02$ and OR:0.191, $p=0.04$, respectively). Only *VEGF-A* +405GC+CC and *DPYD* 496AG+GG genotypes were closely related with left colon cancer risk (OR:5.208, $p=0.04$ and OR:4.777, $p=0.05$, respectively).

The *DPYD* 85TC+CC genotypes was found to be related with longer progression-free and overall survival (Log rank=6.60, $p=0.01$ and Log rank=4.40, $p=0.04$, respectively). Patients with *PDL-1* rs2282055 TT genotype showed longer progression-free and overall survival compared to GG genotype (Bonferroni corrected Log rank $p=0.013$ and

p=0.009). We found that bevacizumab treatment resulted in shorter progression-free survival in patients with the *VEGF-A* +405GC+CC genotypes (Log rank=4.61, p=0.03).

In our study, along with new potential therapeutic targets, genetic risk factors effective in CRC sensitivity, metastasis, primary tumor location, prognosis and chemotherapy response were determined in Turkish population. Our findings will contribute to understanding the genetic background of CRC biology and chemotherapy and provide data for improving of personalized therapy regimens.

Keywords: Colorectal Cancer, *DPYD*, Metastasis, Survival, *PD-1*, *PDL-1*, *SNAI1*, *LOXL2*, *VEGF-A*

YENİLİK BEYANI

Araştırmamızda kolorektal kanser (KRK) karsinogenezinde, malignitesinde ve tedavisinde rol alan farklı moleküler genetik mekanizmaların aydınlatılması ve yeni ilaç hedeflerinin keşfi amacı ile KRK hastalarında karsinogenezin farklı basamaklarında görev alan molekül kodlayan DNA bölgelerindeki polimorfizmlerin etkilerini detaylı olarak inceledik.

Çalışmamızda kemoterapi sonrası gözlenen yan etkilerin ve ilaç cevaplarının 5-FU metabolizmasında rol alan DPYD, MTHFR ve TYMS genlerindeki polimorfizmler ile ilişkilerini inceledik ve bu varyantların allel sıklıklarını da tespit ederek 5-FU kaynaklı ciddi yan etkilerin ortadan kaldırması/azaltılması için Türk toplumuna ait genetik risk haritasının oluşturulmasına temel olabilecek veriler elde ettik. Araştırmamızda DPYD 496A>G polimorfizminin 5-FU kaynaklı advers olaylara karşı koruyucu olabileceğini tespit ettik ve elde ettiğimiz verilerin DPYD 496A>G polimorfizminin fonksiyonel olarak sınıflandırılmasına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz. Ayrıca VEGF-A +405G>C polimorfizminin hasta sağ kalım süreleri üzerinden bevasizumab tedavisi cevabı ile ilişkili olabileceğini saptamış olup bu konuda öncü sayılabilecek sonuçlar kaydettik.

KRK karsinogenezinde ve invazyonunda görev alan endotelyal-mezenkimal geçişte görevli SNAI1 ve LOXL2; bağışıklık cevabında görevli PD-1 ve PDL-1; anjiyogenezde görevli VEGF-A moleküllerinin fonksiyonlarını etkileyebilecek polimorfizmlerin etkilerinin ortaya çıkarılması amacı ile KRK hastaları ile kanser teşhisi ve geçmişi olmayan kontroller karşılaştırmalı olarak analiz edildi. PD-1 rs36084323 ve rs7421861 ve PDL-1 rs2282055 polimorfizmleri KRK için genetik birer risk faktörü olarak tespit edilmiş olup bu konuda Türk toplumundaki ilk verileri literatüre kazandırdık. Bilgimiz dahilinde çalışmamız PDL-1 rs2282055 polimorfizminin KRK riski ile ilişkisini ortaya koyan ilk çalışma olma niteliğini taşımaktadır.

KRK'da primer tümör yeri hastalığın seyri, prognozu ve ilaç cevabı ile doğrudan ilişkili olabileceğinden ve genetik farklılıkların tümüyle ortaya çıkarılmasının tedavi başarısını artırma potansiyeli olduğundan araştırmamızda DPYD, MTHFR, TYMS, SNAI1, LOXL2, PD-1, PDL-1 ve VEGF genlerine ait spesifik varyasyonların primer tümör lokalizasyonuna olan etkilerini inceleyerek literatüre geniş çapta veri kazandırdık. Çalışmamızda DPYD 496A>G ve VEGF-A +405G>C polimorfizmleri primer tümör

lokalizasyonu ile ilişkili bulunmuş olup sonuçlarımız KRK'nın kişiselleştirilmiş tedavi rejimlerinde primer tümör yerinin etkisinin farkındalığını artırması açısından önem taşımaktadır.

Metastazın KRK'da mortalitenin temel sebebi olması sebebi ile, metastazı tetikleyen ve seyrini etkileyen, bireyler arasında da değişiklik gösteren moleküler genetik etkileşimlerin aydınlatılması amacı ile DPYD, MTHFR, TYMS, SNAI1, LOXL2, PD-1, PDL-1 ve VEGF genlerine ait varyasyonların KRK metastazı ile olan ilişkilerini detaylı olarak inceledik. Çalışmamız Türk KRK hastalarında metastaz sürecinde VEGF-A -460C>T ve DPYD 496A>G polimorfizmlerinin etkilerini ortaya koyan ilk çalışmadır. Araştırmamız aynı zamanda KRK hastalarında SNAI1 rs6125849 polimorfizminin tek başına; LOXL2 rs6999447 ile SNAI1 rs6125849 polimorfizmlerinin ise sinerjetik olarak metastatik fenotiple sonuçlanan etkilerini ilk kez rapor eden çalışma olma niteliği taşımaktadır.

Son olarak, hastaların sağ kalım sürelerini etkileyen genetik faktörlerin ve etkileşimlerin tespit edilmesi hastalığın seyri ile ilgili başarılı bir prognoz ile sonuçlandığından DPYD, MTHFR, TYMS, SNAI1, LOXL2, PD-1, PDL-1 ve VEGF polimorfizmlerin KRK hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalım süreleri ile ilişkilerini inceledik. Çalışmamızda PD-1 rs36084323, PDL-1 rs822336 ve PDL-1 rs2282055, DPYD 85T>C polimorfizmleri hastaların sağ kalım süreleri ile ilişkili bulunmuştur. Bilgimiz dahilinde sonuçlarımız PD-1, PDL-1 ve DPYD polimorfizmlerinin Türk KRK hastalarının sağ kalımlarına olan etkilerini kapsamlı şekilde ortaya koyan ilk çalışmadır ve konu ile ilgili sınırlı veri bulunan literatüre yeni bilgiler kazandırmıştır.

Tez çalışmamız bireylere has genetik farklılıklardan yararlanarak KRK onkogenezinde, malignitesinde, ilaç cevabında ve sağ kalımında rol oynayan moleküler genetik arka planının anlaşılmasına ve klinik pratikte izlenen terapötik seçeneklerin iyileştirilmesine katkı sağlamanın yanı sıra yeni araştırmalara teşvik edici niteliktedir.

SEMBOLLER/SYMBOLS

%	:Yüzde
α	:Alfa
β	:Beta
κ	:Kappa
nm	:Nanometre
ng	:Nanogram
mg	:Miligram
μ l	:Mikrolitre
ml	:Mililitre
M	:Molar
°C	:Santigrat Derece
mm ³	:Milimetreküp
kDa	:Kilodalton
M	:Molar
nM	:Nanomolar
μ M	:Mikromolar
mM	:Milimolar
U	:Unit
Na ⁺	:Sodyum İyonu
K ⁺	:Potasyum İyonu
Mg ⁺²	:Magnezyum İyonu
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür

KISALTMALAR/ABBREVIATIONS

KRK	:Kolorektal Kanser
KIN	:Kromozomal Kararsızlık
CAMF	:CpG Ada Metilatör Fenotipi
MSI	:Mikrosatellit Kararsızlık
HEK	:Heterozigotluk Kaybı
APC	:Adenomatoz Polipozis Koli
PI3K	:Fosfoinositid 3-Kinaz
MAP	:Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz
LS	:Lynch Sendromu
MLH1	:MutL homolog-1
IGF2	:İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2
HET	:Hatalı Eşleşme Tamiri
AP	:Adenomatoz Polipozis
MP	:Mutyh Polipozisi
PJS	:Peutz-Jeghers Sendromu
STK-11	:Serin Treonin Kinaz 11
HNPCC	:Hereditör Non-Polipoz Kolorektal Kanser
MSI-H	:Yüksek Mikrosatellit Kararsızlık
MSI-L	:Düşük Mikrosatellit Kararsızlık
MSS	:Mikrosatellit Kararlılığı
HNPCC	:Hereditör Non-Polipoz Kolorektal Kanser
TNM	:Tümör Nod Metastaz
MSH2	:Muts Homolog Genleri 2
MSH6	:Muts Homolog Genleri 6
HETy	:Hatalı Eşleşme Tamiri Yetersizliği
EGFR	:Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
H₂S	:Hidrojen Sülfid
5-FU	:5-Fluorourasil
TS	:Timidilat Sentetaz
DPD	:Dihidropirimidin Dehidrojenaz
TYMP	:Timidilat Fosforilaz

FUDR	:5-Floro-2'-Deoksiüridin
TK1	:Timidin Kinaz 1
FdUMP	:Florodeoksiüridin Monofosfat
dUMP	:Deoksiüridin Monofosfat
dTMP	:Deoksitimidin Monofosfat
dTTP	:Deoksitimidin Trifosfat
CH2 THF	:5,10-Metilen Tetrahidrofolat
DHF	:Dihidrofolat
UTP	:Uridin Trifosfat
FUTP	:Florouridin Trifosfat
dTTP	:Deoksitimidin Trifosfat
5-DHFU	:5-Dihidroflorourasil
DPYS	:Dihidropirimidinaz
FUPA	:Floro-Beta-Ureidopropiyonat
UPB1	:B-Ureidopropionaz
FBAL	:Floro-Beta-Alanine
CDA	:Sitidin Deaminaz
CES	:Karboksil Esteraz
5-dFCR	:5-Deoksi-5-Florositidin
TYMP	:Timidin Fosforilaz
FAD	:Flavin Adenin Dinükleotit
THF	:Tetrahidrofolat
TNF-α	:Tümör Nekroz Faktör Alfa
IL-1β	:Interlökin 1 beta
NF-κB	:Aktif B Hücrelerinin Nükleer Faktör Kappa-Hafif Zincir Arttırıcısı
EDTA	:Etilendiamintetraasetik Asit
EMG	:Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
LOXL2	:Lisil Oksidaz Benzeri Protein 2
LOX	:Lisil Oksidaz
TIMP1	:Metalloproteinaz-1
MMP9	:Matris Metalopeptidaz 9
GSK3β	:Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta

HIF-1α	:Hipoksi İle İndüklenabilir Faktör 1 α
VEGF	:Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
ASH	:Antijen Sunan Hücre
THR	:T Hücre Reseptörü
MHK	:Majör Histo-Uyumluluk Kompleksi
CTLA-4	:Sitotoksik T Lenfosit ile İlişkili Antijen-4
PD-1	:Programlı Hücre Ölümü-1, <i>Programmed Cell Death-1</i>
PDL	:Programlı Hücre Ölümü-1 Ligandı, <i>Programmed Cell Death Ligand</i>
IgV	:İmmüoglobulin V
ITSM	:Tirozin Bazlı Anahtar Motifi
THR	:T Hücre Reseptörü
ITIM	:İmmün Reseptör Tirozin Bazlı İnhibitör Motifi
PI3K	:Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PKB (AKT)	:Protein Kinaz B
PDCD1	:Programlı Hücre Ölümü-1 Geni
SSPE	:Subakut Sklerozan Panensefalit
BHRHK	:Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinom
IL	:İnterlökin
DLL4	:Delta Benzeri 4
bFGF	:Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
TGF	:Dönüştürücü Büyüme Faktörü
EGF	:Epidermal Büyüme Faktörü
PDGF	:Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PIGF	:Plasental Kaynaklı Büyüme Faktörü
VEGFR	:Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü
PDGFR	:Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
FDA	:Food And Drug Administration
ASPE	:Allele Özgü Primer Uzaması
RFU	:Bağıl Floresan Birimi
PZR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MALDI-TOF	:Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon-Uçuş Süresi
SAP	:Shrimp Alkalın Fosfataz

UV	:Ultra Violet
OR	:Odds Oranı
CI	:Güven Aralığı



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa
No

Şekil 1.1: Sağ kolon kanseri ve sol kolon kanseri arasındaki temel farklılıklar	10
Şekil 1.2: Floropirimidinlerin anabolizması ve katabolizması	14
Şekil 1.3: Metilentetrahidrofolat redüktazın DNA sentezi ve metilasyondaki rolü	25
Şekil 1.4: Tipik bir endotelial mezenşimal geçiş sürecinin ana hatları	29
Şekil 1.5: LOXL2'nin SNAI1 üzerinden endotelial mezenkimal dönüşümdeki etkisi	32
Şekil 1.6: Tümör progresyonunda immün kontrol noktası moleküllerinin T hücresi aktivasyonu ve inaktivasyonundaki fonksiyonları	35
Şekil 1.7: Tümör anjiyogenezindeki temel yapılar	45
Şekil 1.8: VEGF-VEGFR etkileşimlerinin moleküler yolağı	46
Şekil 1.9: Kanser tedavisinde sıklıkla reçete edilen anti-VEGF ajanları ve temel etki mekanizmaları	50
Şekil 2.1: DNA izolasyonu optimizasyon süreçleri	58
Şekil 2.2: İzole edilen DNA'ların miktarlarının ve saflıklarının ölçülmesi	60
Şekil 2.3: Allel spesifik primerler ve yapılarındaki anti-zip kodlar	61
Şekil 2.4: Multipleks PZR reaksiyonu hazırlık aşamaları	64
Şekil 2.5: Allel spesifik primer uzama reaksiyonu	65
Şekil 2.6: Bir BioFilmChip'in temsili iç tasarımı	66
Şekil 2.7: Genotipleme öncesi magazinlerin (A), intellipacelerin (B), amplikonları içeren plakanın (C) cihaza yerleştirilmesi	69
Şekil 2.8: Infiniti Plus genotipleme platformu	69
Şekil 2.9: MassARRAY genotipleme platformu	70
Şekil 2.10: iPLEX reaksiyonu ve MassArray genotip analizi temel basamakları	71
Şekil 2.11: MassArray platformunda analiz sonrası elde edilen örnek genotip sonucuna ait bir elektroferogram	78
Şekil 3.1: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalım sürelerinin primer tümörün yerine göre	85

dağılımları

Şekil 3.2: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *DPYD* 85T>C polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **109**

Şekil 3.3: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *DPYD* 496A>G polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **109**

Şekil 3.4: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *DPYD* 85T>C polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **111**

Şekil 3.5: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *DPYD* 496A>G polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **111**

Şekil 3.6: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *MTHFR* 677C>T polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **113**

Şekil 3.7: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *MTHFR* 1298A>C polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **113**

Şekil 3.8: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *MTHFR* 677C>T polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **114**

Şekil 3.9: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *MTHFR* 1298A>C polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **115**

Şekil 3.10: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **116**

Şekil 3.11: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **117**

Şekil 3.12: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının **125**

progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *SNAI1* rs6125849 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

Şekil 3.13: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **125**

Şekil 3.14: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *SNAI1* rs6125849 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **127**

Şekil 3.15: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *LOXL2* rs6999447 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **127**

Şekil 3.16: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *PD-1* rs2227982 ve rs36084323 polimorfizmlerine ait genotiplere göre dağılımları **142**

Şekil 3.17: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *PD-1* rs2227982 ve rs36084323 polimorfizmlerine ait genotiplere göre dağılımları **143**

Şekil 3.18: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs10815225 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **145**

Şekil 3.19: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs10815225 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **145**

Şekil 3.20: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs2282055 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **146**

Şekil 3.21: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs2282055 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **148**

Şekil 3.22: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs2297136 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları **149**

Şekil 3.23: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin <i>PDL-1</i> rs2297136 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları	149
Şekil 3.24: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin <i>PDL-1</i> rs822336 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları	150
Şekil 3.25: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin <i>PDL-1</i> rs822336 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları	150
Şekil 3.26: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin <i>VEGF-A</i> +405G>C polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları	158
Şekil 3.27: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin <i>VEGF-A</i> -460C>T polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları	158
Şekil 3.28: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin <i>VEGF-A</i> +405 G>C polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları	160
Şekil 3.29: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin <i>VEGF-A</i> -460C>T polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları	160

TABLO LİSTESİ/LIST OF TABLE

Sayfa

No

Tablo 2.1: NA172 Coriell DNA beklenen genotip dağılımları	62
Tablo 2.2: Hot Start/Multipleks PZR karışımı içeriği	63
Tablo 2.3: Hot Start/Multipleks PZR koşulları	64
Tablo 2.4: BioFilmChip üzerine spotlanmış polimorfik bölgeler	67
Tablo 2.5: MassARRAY platformunda iPLEX reaksiyonu ile analiz edilen polimorfik bölgeler ve DNA'daki konumları	72
Tablo 2.6: PZR karışımı içeriği	73
Tablo 2.7: Multipleks PZR reaksiyon koşulları	74
Tablo 2.8: SAP karışımı içeriği	74
Tablo 2.9: SAP reaksiyon koşulları	75
Tablo 2.10: iPLEX uzama karışımı içeriği	76
Tablo 2.11: iPLEX uzama reaksiyon koşulları	76
Tablo 2.12: DPDY fenotiplerinin belirlenmesinde kullanılan farklı DPD aktivitesine sebep olan alleller	78
Tablo 3.1: KRK hastalarına ve kontrollere ait demografik, klinik ve patolojik özelliklerinin dağılımı	82
Tablo 3.2: Primer tümörün lokasyonuna (sağ kolon, sol kolon) dayalı hasta özellikleri	84
Tablo 3.3: KRK hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalım sürelerinin sağ ve sol kolon kanseri olma durumlarına göre dağılımları	85
Tablo 3.4: Hasta karakteristiklerinin metastaz durumuna göre dağılımları	88
Tablo 3.5: <i>DPYD</i> polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıklarının dağılımları	91
Tablo 3.6: <i>MTHFR</i> ve <i>TYMS</i> polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıklarının dağılımları	92
Tablo 3.7: 5-FU ve ya kapesitabin tedavisi kaynaklı yan etkiler ve tedaviye etkileri	93
Tablo 3.8: <i>DPYD</i> polimorfizmlerine ait genotiplerin 5-FU kaynaklı seviye 0-2 ve seviye 3-4 yan etkilere göre dağılımları	95
Tablo 3.9: <i>MTHFR</i> ve <i>TYMS</i> polimorfizmlerine ait genotiplerin 5-FU kaynaklı	96

seviye 0-2 ve seviye 3-4 yan etkilere göre dağılımları	
Tablo 3.10: DPD enziminin yapısında fonksiyon kaybı ya da azalmasına yol açan varyantlara sahip 5 hastaya ait genotip verileri	98
Tablo 3.11: 5-FU tedavisi sonrası nötropeni tespit edilen hastalar ve taşıdıkları varyantlar	99
Tablo 3.12: 5-FU tedavisi sonrası el ayak sendromu tespit edilen hastalar ve sahip oldukları varyantlar	99
Tablo 3.13: 5-FU tedavisi sonrası mukozit tespit edilen hastalar ve sahip oldukları varyantlar	100
Tablo 3.14: 5-FU tedavisi sonrası diyare tespit edilen hastalar ve sahip oldukları varyantlar	100
Tablo 3.15: Primer tümörün konumuna (sağ kolon, sol kolon) dayalı kodominant, dominant ve resesif modelde <i>DPYD</i> polimorfizmlerinin genotip frekansları	102
Tablo 3.16: Primer tümörün konumuna (sağ kolon, sol kolon) dayalı kodominant, dominant ve resesif modelde <i>MTHFR</i> polimorfizmlerinin frekansları	103
Tablo 3.17: Primer tümörün konumuna (sağ kolon, sol kolon) dayalı kodominant, dominant ve resesif modelde <i>TYMS</i> 14946bp ins/del genotip frekansları	104
Tablo 3.18: Metastatik ve metastatik olmayan kolorektal kanserler ile <i>DPYD</i> 85T>C, 496A>G, 1601G>A polimorfizmlerinin ilişkisi	106
Tablo 3.19: Metastatik ve metastatik olmayan kolorektal kanserler ile <i>MTHFR</i> 677C>T ve 1298A>C polimorfizmlerinin ilişkisi	107
Tablo 3.20: Metastatik ve metastatik olmayan kolorektal kanserler ile <i>TYMS</i> 14946bp ins/del polimorfizminin ilişkisi	108
Tablo 3.21: <i>DPYD</i> 85T>C ve 496A>G polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri	110
Tablo 3.22: <i>DPYD</i> 85T>C ve 496A>G polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri	112
Tablo 3.23: <i>MTHFR</i> 677C>T ve 1298A>C polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri	114

Tablo 3.24: <i>MTHFR</i> 677C>T ve 1298A>C polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri	115
Tablo 3.25: <i>TYMS</i> 14946bp ins/del polimorfizmine ait genotiplerin KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri	116
Tablo 3.26: <i>TYMS</i> 14946bp ins/del polimorfizmine ait genotiplerin KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri	117
Tablo 3.27: <i>SNAI1</i> rs6125849 G>A ve <i>LOXL2</i> rs6999447 C>T polimorfizmlerinin incelediği çalışma grubuna ait demografik, klinik ve patolojik özelliklerinin dağılımı	118
Tablo 3.28: <i>SNAI1</i> rs6125849 G>A ve <i>LOXL2</i> rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıklarının vaka ve kontrollerdeki dağılımları	120
Tablo 3.29: <i>SNAI1</i> rs6125849 G>A ve <i>LOXL2</i> rs6999447 C>T polimorfizmleri ile kolorektal kanser riski arasındaki olasılık oranları	121
Tablo 3.30: <i>SNAI1</i> rs6125849 G>A ve <i>LOXL2</i> rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının primer tümör lokalizasyonuna göre dağılımları	122
Tablo 3.31: <i>SNAI1</i> rs6125849 G>A ve <i>LOXL2</i> rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının metastaz varlığına göre dağılımları	123
Tablo 3.32: <i>SNAI1</i> rs6125849 G>A polimorfizminin KRK metastazı ile ilişkisi	124
Tablo 3.33: <i>SNAI1</i> rs6125849 G>A ve <i>LOXL2</i> rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri	124
Tablo 3.34: <i>SNAI1</i> rs6125849 G>A ve <i>LOXL2</i> rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri	126
Tablo 3.35: Kolorektal kanser metastazı riski öngören <i>LOXL2</i> rs6999447 ve <i>SNAI1</i> rs6125849 polimorfizmlerine ait genotiplerin ikili lojistik regresyon modeli	128
Tablo 3.36: <i>PD-1</i> ve <i>PDL-1</i> polimorfizmlerinin incelendiği vaka ve kontrolleri içeren çalışma grubuna ait karşılaştırmalı klinik, demografik ve	129

patolojik veriler

Tablo 3.37: <i>PD-1</i> rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıklarının vaka ve kontrollerdeki dağılımları	130
Tablo 3.38: <i>PDL-1</i> rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıklarının vaka ve kontrollerdeki dağılımları	132
Tablo 3.39: <i>PD-1</i> rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmleri ile kolorektal kanser riski arasındaki olasılık oranları	134
Tablo 3.40: <i>PDL-1</i> rs10815225, rs2282055, rs2297136 ve rs822336 polimorfizmleri ile kolorektal kanser riski arasındaki olasılık oranları	135
Tablo 3.41: Kolorektal kanser riski öngören rs36084323 ve rs822336 polimorfizmlerine ait genotiplerin ve hasta karakteristiklerinin ikili lojistik regresyon modeli	136
Tablo 3.42: Kolorektal kanser riski öngören <i>PD-1</i> rs36084323 ve <i>PDL-1</i> rs2282055 polimorfizmlerine ait genotiplerin ve hasta karakteristiklerinin ikili lojistik regresyon modeli	137
Tablo 3.43: <i>PD-1</i> rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının primer tümör lokalizasyonuna göre dağılımları	137
Tablo 3.44: <i>PDL-1</i> rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının primer tümör lokalizasyonuna göre dağılımları	138
Tablo 3.45: <i>PD-1</i> rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının metastaz varlığına göre dağılımları	139
Tablo 3.46: <i>PDL-1</i> rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının metastaz varlığına göre dağılımları	140
Tablo 3.47: <i>PD-1</i> rs2227982 ve rs36084323 polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri	141
Tablo 3.48: <i>PD-1</i> rs2227982 ve rs36084323 polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri	142
Tablo 3.49: <i>PDL-1</i> rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri	144

Tablo 3.50: <i>PDL-1</i> rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotiplerin KHK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri	147
Tablo 3.51: <i>VEGF-A</i> polimorfizmlerinin incelediği çalışma grubuna ait demografik, klinik ve patolojik özelliklerinin dağılımı	151
Tablo 3.52: <i>VEGF-A</i> +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıklarının vaka ve kontrollerdeki dağılımları	153
Tablo 3.53: <i>VEGF-A</i> +405G>C ve -460C>T polimorfizmleri ile kolorektal kanser riski arasındaki olasılık oranları	154
Tablo 3.54: <i>VEGF-A</i> +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının primer tümör lokalizasyonuna göre dağılımları	155
Tablo 3.55: <i>VEGF-A</i> +405GC+CC ve -460CT+TT genotipleri ile sol kolon kanseri riski arasındaki olasılık oranları	155
Tablo 3.56: <i>VEGF-A</i> +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının metastaz varlığına göre dağılımları	156
Tablo 3.57: <i>VEGF-A</i> -460C>T polimorfizminin karaciğer metastazı ile ilişkisi	157
Tablo 3.58: <i>VEGF-A</i> +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri	159
Tablo 3.59: <i>VEGF-A</i> +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri	161
Tablo 3.60: <i>VEGF-A</i> +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin bevasizumab reçete edilmiş ve reçete edilmemiş kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerine olan etkileri	162
Tablo 3.61: <i>VEGF-A</i> +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin bevasizumab reçete edilmiş ve reçete edilmemiş kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerine olan etkileri	163

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK), dünya çapında önde gelen ölüm ve hastalık nedenleri arasında yer almaktadır. KRK, meme ve akciğer kanserlerinden sonra en yaygın üçüncü kanser türü olup kanser kaynaklı ölüm sebepleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (Sung ve ark., 2021). KRK, 2020'de 1.9 milyona varan yeni vaka sayısı ile dünya çapında en sık tanı alan üçüncü kanserdir (Sung ve ark., 2021). 2030 yılına kadar KRK'nın küresel yükünün 2.2 milyon yeni vaka ve 1.1 milyon ölüm ile %60 oranında artması beklenmektedir (Ferlay ve ark., 2013).

1.1.Kolorektal Kanser Sıklığı

Kolorektal kanserin sıklığı çok sayıda farklı değişkenin etkisi altındadır. Cinsiyete göre değişkenlik gösteren KRK tanısı alma oranlarının erkeklerde en sık tanı alan üçüncü, kadınlarda ise ikinci sırada olduğu bildirilmiştir (Torre ve ark., 2015; Ferlay ve ark., 2010). Bu değişkenliğin nedenleri tam olarak ortaya konulamamış olsa da cinsiyete özgü birtakım risk faktörlerine maruz kalma, endojen ve eksojen hormonların koruyucu etkileri ve kanser tarama süreçlerindeki cinsiyete özgü farklılıklar arasındaki karmaşık etkileşimler ile açıklanabilir (Murphy ve ark., 2011; Meissner ve ark., 2006).

KRK görülme sıklığı coğrafi olarak da çeşitlilik göstermektedir. Bu farklılıklar toplumlardaki birtakım genetik paydalar ile birlikte, farklı diyet ve çevresel risklerle de ilişkilidir (Macrae, 2015). KRK vakalarının yaklaşık %55'i gelişmiş ülkelerde görülmekle birlikte gelişmekte olan ülkelerde de yaygınlık oranı artmaktadır (Ferlay ve ark., 2013; Rawla ve ark., 2019). KRK görülme oranındaki bu artış, sağlıksız beslenme, obezite ve sigara tüketiminin artması gibi risk faktörleri ile açıklanabilir (Rawla ve ark., 2019; Alsheredah ve Akhtar, 2018). Migrasyon çalışmaları KRK'ya bağlı mortalitenin, değişen yaşam tarzı ve diyet gibi sebeplerden dolayı diğer kanserlere kıyasla daha hızlı değişim gösterdiğini ifade etmektedir (Kolonel ve ark., 2006). Ayrıca, nüfusun giderek kalabalıklaşması ve yaşlı nüfusun artmasından dolayı küresel olarak KRK yükünün yükseleceği öngörülmektedir (Araghi ve ark., 2019). Genel olarak, düşük gelirli ve orta gelirli ülkelerde KRK sıklığı artmakla birlikte, yüksek gelirli ülkelerde uygulanan ileri tarama teknikleri ile istikrar kazanmaya veya gerilemeye başlamıştır (Arnold ve ark., 2017a). KRK mortalite oranları ekonomik olarak gelişmiş toplumlarda, kaynakları

yetersiz olan toplumlara kıyasla düşüktür (Chatenoud ve ark., 2014). Gelişmiş ülkelerdeki azalan mortalitenin, erken tanı ve azalan risk faktörleri ile birlikte geniş tedavi olanakları sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir (Bosetti ve ark., 2011).

KRK sıklığının yaşa göre değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Kalıtsal kaynaklı kanserler hariç yaş, KRK oluşumu için temel risk faktörü olarak kabul görmektedir (Levin ve ark., 2008). KRK'nın sıklığı 40 yaş ve altındaki bireylerde nadir gözlenirken, 40 ile 50 yaş arasında belirgin bir şekilde artış gösterir ve sonraki her on yılda yaşa bağlı olarak yükselen bir artış sergilemektedir (Rawla ve ark.,2019; Macrae, 2015).

1.2.Sporadik Kolorektal Adenokarsinoma Risk Faktörleri

1.2.1. Alkol Tüketimi

Kolon kanserojenezinde alkol tüketiminin önemli bir rolü bulunmaktadır (Bishehsari ve ark., 2017). Alkolün oksidatif veya oksidatif olmayan metabolizması sonucu asetaldehit benzeri bir dizi metabolit oluşmaktadır (Dinis-Oliveira, 2016). Bu metabolitler genetik, epigenetik, biyokimyasal ve immünolojik anormalliklere neden olarak kronik enflamasyon ve kanser oluşumunu tetikleyebilir (Bishehsari ve ark., 2017; Shukla ve Lim 2013; Wimberly ve ark., 2013).

Kolorektal kanser hastalarında alkol tüketimi ve mortalite ilişkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda, birbiri ile çelişen veriler bulunmaktadır (Jayasekara ve ark., 2018; Phipps ve ark., 2016; Yang ve ark., 2017). Bu tutarsızlığın temel sebebi alkol tüketiminin sınıflandırılmasındaki çeşitliliğe dayandırılmaktadır. Yapılan bir meta-analiz çalışmasında KRK tanısı öncesinde hafif ve orta şiddette var olan alkol tüketiminin, daha iyi bir sağ kalım ile ilişkili olduğu ve hatta hafif alkol tüketiminin KRK'ya özgü mortalitenin azalması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2019). Alkol ve KRK riski ilişkisi ile ilgili yapılan çalışmalardan çelişkili sonuçlar ortaya çıkmasının bir diğer nedeni de alkol metabolizmasında rol alan genlerin dikkate alınmamış olmasıdır (Hughes ve ark., 2017). Ancak çoğu çalışmada alkol tüketiminin kanser oluşma riski üzerine etkileri incelendiğinde küçük miktarlarda bile olsa alkol tüketiminin KRK riskinin artırdığı bildirilmiştir (Cai ve ark., 2014; Fedirko ve ark., 2011).

1.2.2. Beslenme Şekli ve İçeriği

Diyet yolu ile alınan besinler farklı mekanizmalar aracılığıyla KRK üzerine etki etmektedir. Alınan besinin tipi, içeriği ve miktarı KRK riski açısından oldukça değişkenlik gösterir. Birçok çalışmada kırmızı ve işlenmiş etin KRK'yı tetikleyebildiği, kolesterolü yüksek olmayan deniz ürünleri, lifli gıdalar, D vitamini ve selenyum içeriği yüksek olan besinlerin ise azalan KRK riski ile ilişkili oldukları bildirilmiştir (Magalhães ve ark., 2012; Wu ve Schauss, 2012; Kune ve Watson, 2016). Yüksek miktarda linoleik asit gibi çoklu doymamış yağ asidi içeren besinler, onkogenik özelliğine sahip KRAS mutasyonunun mevcudiyeti ile ilişkilendirilmiştir (Weijenberg ve ark., 2007). Bazı diyet bileşenlerinin içeriği kadar miktarlarının da önem taşıdığı bilinmektedir. Örneğin günde 700-1000 mg'dan düşük kalsiyum alımının KRK'nın görülme riskini artırmaktadır (Wu ve ark., 2002). Enflamatuvar potansiyeli düşük diyet bileşenleri karsinogenezde önemli rolü olan kronik inflamasyonu baskılayarak KRK riskini %43 oranında azaltabilmektedir (Fan ve ark., 2017). Özellikle fazla miktarda işlenmiş tahıl, alkol, tuz, bazı yağlar, mısır kaynaklı fruktoz, yağlı etler içeren batı diyeti enflamasyon oluşumunu desteklediğinden KRK oluşumunda önemli rol oynar.

1.2.3. Bağırsak Mikrobiyotası

Kolon çok sayıda mikroorganizmaya ev sahipliği yapmaktadır. Yetişkin bir insanın kolonunda ve kalın bağırsağın diğer kısımlarındaki bakteri sayısı yaklaşık 10^{13} 'dür. Bağırsak mikrobiyotası diyet, antibiyotik tedavisi, hastaneye yatış, kimyasallara maruz kalma ve doğum sırasında vajinal mikrobiyota ile temas gibi çeşitli çevresel faktörler ile şekillenen dinamik bir yapıdır (Azimirad ve ark., 2015; Rostami-Nejad ve ark., 2015.). İn vitro ve in vivo çalışmalar bağırsak mikrobiyotası ve KRK arasında güçlü bir ilişkinin varlığını işaret etmektedir (Drewes ve ark., 2016; Bultman, 2017). Bağırsak mikrobiyotasının diyet yoluyla alınan bileşenlerin tümör oluşumunu teşvik edici ya da tümör baskılayıcı metabolitlere metabolize ederek kanserin ortaya çıkmasında ya da progresyonunda rol aldıkları bilinmektedir (Hullar ve ark., 2014). Bağırsak mikrobiyotası intra-epitelyal tip lenfositleri ve immün hücreleri etkileyerek inflamasyon sürecine dahil olarak kolon epitelinin geçirgenliğini etkileyebildiğinden enerji dengesini değiştirerek KRK ve diğer kanserlere yol açabilir (Bultman, 2017).

Kolorektal kanser için kabul edilen risk faktörleri arasında yaşam şekli, tütün kullanımı, obezite, diyabet ve sedanter yaşam koşulları sayılabilir.

1.3.Kolorektal Kanser Karsinogenezi

Kolorektal kanser oluşumunda rol alan 3 farklı genetik mekanizmanın ayrı ayrı veya birlikte işlev görerek genomik kararsızlığa neden olduğu bilinmektedir. Bu mekanizmalar kromozomal kararsızlık (KIN), CpG adası metilatör fenotipi (CAMF) ve mikrosatellit kararsızlığıdır (*Microsatellite instable*, MSI). Genomik kararsızlık, KRK oluşumunun altında yatan önemli bir özelliktir. Belirtilen temel mekanizmaların yanı sıra onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve diğer bazı spesifik DNA tamir mekanizmaları ile ilişkili genlerde meydana gelen mutasyonlar, diğer kanser türlerinde olduğu gibi KRK oluşumuna sebep olabilmektedir (Fearon ve Vogelstein, 1990).

1.3.1. Kromozomal Kararsızlık

Kolorektal kanser vakalarının %80-85'inden sorumlu olduğu için klasik yol olarak da kabul edilen KIN (Grady ve Carethers, 2008), kromozom sayısındaki bir dengesizlik olan anöploidi ve alellerden birinin kaybı olan heterozigosite kaybına (HEK) yol açar. Anöploidi ve HEK, sporadik tümörlerin %85'ine karşılık gelmekle birlikte adenomatoz polipozis koli (APC) genindeki eşey hücre hattı mutasyonları ile ailesel adenomatoz polipoz vakalarını da içeren KIN tümörlerinde de ana aktörlerdir. Klasik KIN yolu, APC gen mutasyonlarının kazanılmasıyla başlar, sonrasında onkogen KRAS'ın mutasyonel aktivasyonu ve tümör baskılayıcı gen olan TP53'ün etkisizleştirilmesi gerçekleşir (Smith ve ark., 2002). APC'de meydana gelen mutasyonlar, β -katenin'in çekirdeğe translokasyonuna neden olarak tümöröjenez ve invazyonda görevli genlerin transkripsiyonlarına yol açar. KRAS ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) genlerindeki mutasyonlar ise mitojenle aktiveleştirilen protein kinazı (MAP) sürekli olarak uyararak hücre proliferasyonunu artırır. Ayrıca hücre döngüsündeki kontrol noktasında görev yapan p53 proteinini kodlayan TP53 genindeki fonksiyon kaybı mutasyonları hücre döngüsündeki kontrolün kaybolmasına neden olur (Pino ve Chung, 2010).

1.3.2. Mikrosatellit Kararsızlığı

Mikrosatellit kararsızlığı (MSI) replikasyon sırasında meydana gelen hasarların onarımından sorumlu olan DNA tamir mekanizmalarındaki inaktive edici mutasyonlar sonucu meydana gelen aşırı mutajenik bir fenotipten kaynaklanır. Genomun yapısında bulunan kısa DNA zincirlerinde veya tandem tekrarların bulunduğu bölgelerde DNA onarım yeteneği MSI pozitif olan tümörlerde azalır ve böylece mutasyonlar bu bölgelerde birikme eğilimi gösterirler. Bu mutasyonlar protein kodlamayan bölgeleri ve kodlama yapabilen mikrosatellitleri etkilediğinden özellikle onkogenlerin veya tümör baskılayıcı genlerin yer aldığı mikrosatellit bölgelerindeki okuma çerçevesi değiştiğinde tümör gelişimi meydana gelebilir (Boland ve Goel, 2010).

Kolorektal kanserlerde MSI %15 oranında görülürken bu oranın sadece %3'ü kalıtsal Lynch sendromu (LS) ile ilişkilidir. %85 oranında gözlemlenen KKK ise DNA hatalı eşleşme onarım sisteminin önemli bileşenlerinden olan MutL homolog-1 (MLH1) gen promotörünün hipermetilasyonunun neden olduğu sporadik vakalardır (Bak ve ark., 2014; Kunkel ve Erie, 2005). MSI yüksek olan sporadik KKK tümörlerin %83-100'ünde MLH1 promotörünün hipermetilasyonu mevcuttur (Cunningham ve ark., 2001; Kuismanen ve ark., 2000). Sıklıkla sağ kolon kanserlerinde bulunan MSI tümörleri, zayıf farklılaşma ve daha iyi prognoz ile ilişkilidir (Sameer ve ark., 2014). Genel olarak MSI tümörleri sporadik tümörlerden daha iyi prognoza sahiptir (Umar ve ark., 2004).

1.3.3. CpG Adası Metilator Fenotip

Epigenetik kararsızlıklar sonucu ortaya çıkan CpG Adası Metilator Fenotip (CAMF), genel DNA hipometilasyonu ve spesifik promotörlerin hipermetilasyonu ile karakterize edilmektedir. Genetik susturma ve protein fonksiyonu kaybına yol açan onkogen promotörlerinin hipermetilasyonu CAMF tümörlerinin temel özelliğidir. Genetik ve epigenetik değişiklikler kolorektal kanser gelişiminde işbirliği yaparlar ve çoğunlukla epigenetik değişiklikler nokta mutasyonlarından daha etkilidir (Lao ve Grady, 2011). Hipometilasyon hiperplastik ve adenomatoz poliplerde ve karsinomlarda sık görülür (Bariol ve ark., 2003). Satelit bölgelerde olduğu gibi, tekrarlayan DNA dizilerindeki hipometilasyon, genomik kararsızlığa neden olabilir. Ayrıca, epigenetik damgalama veya promotör demetilasyon kaybı retrotranspozonları yeniden aktif hale getirebilir.

Örneğin İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2'nin (IGF2) epigenetik damgalanmasının kaybı, KRK'da neredeyse %40 oranında görülür ve hastalarda MSI'ya yol açar (Cui ve ark., 2002). Promotörlerdeki CpG Adası hipermetilasyonu ise tümör baskılayıcı rolleri olan veya hücre döngüsüne dahil olan genlerin transkripsiyonel inaktivasyonu ile sonuçlanır (Toyota ve ark., 1999). Örneğin BRAF'ta meydana gelen spesifik bir mutasyon DNA tamir mekanizmasında görev alan MLH1'in hipermetilasyonuna yol açmaktadır ve sporadik vakalarda %18.7'lik bir sıklığa sahiptir (Poynter ve ark., 2008).

KRK ortaya çıkmasında bu 3 yolak çoğunlukla beraber çalışır ve birbiriyle bağlantılıdır. Hatalı eşleşme tamiri (HET) genlerinin hipermetilasyonu MSI'ye yol açabilir ve bu mekanizma genellikle CAMF yolu ile ilişkilidir (East ve ark., 2008).

1.4.Kolorektal Karsinomun Genetik Modelleri

1.4.1. Kalıtsal Kolorektal Kanserler

Kalıtsal faktörler, tüm KRK vakalarının yaklaşık %5-15'ine karşılık gelir (Lynch ve Chapelle, 2003). Kalıtsal KRK genellikle çok sayıda kolorektal polip ve polipoz olmayan yapıların gelişimi ile karakterize olan alt sendromlara bölünmüştür.

1.4.1.1.Adenomatoz Polipozis Sendromu

Adenomatoz polipozis (AP) sendromu kromozom 5q21'deki APC geni eşey hattı mutasyonlarının sebep olduğu otozomal dominant bir hastalıktır. AP sendromuna yol açan 1000'den fazla farklı mutasyon bulunmaktadır ve bu mutasyonlar fonksiyonel olmayan bir APC proteinin sentezlenmesi ile (Zeichner ve ark., 2012). AP, yirmili yaşlarda ortaya çıkan yüzbinlerce adenomatoz kolorektal polip ile birlikte izlenen, karakteristik olarak kalın bağırsakların epitelinde çok sayıda polip ile karakterize bir sendromdur (Dalavi ve ark., 2015). AP, KRK vakalarının yaklaşık %1'ini oluşturur. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda AP'nin 1/10.000 -30.000 insidansa sahip olduğu ve cinsiyetten bağımsız olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir (Half ve ark., 2009). Hastaların çoğunda ailenin hastalık öyküsü vardır, ancak yaklaşık %20-%30'u APC geninde 'de novo' gen mutasyonları ile ortaya çıkar (Bisgaard ve ark., 1994). Polipozun prognozu, APC genindeki mutasyona uğrayan alan ile ilişkili olup genin uç noktalarında

veya ekzon 9'da bulunan mutasyonlar hafif polipoz fenotipiyle bağlantılıdır (NCCN, 2014).

1.4.1.2.MUTYH Polipozisi

MUTYH, reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu mutasyonların ve metilasyon, deaminasyon ve hidroksilasyondan kaynaklanan DNA hasarlarının onarımında rol oynayan, baz eksizyonunda görevli MYH glikosilazın sentezinden sorumlu DNA onarım genlerinden biridir (Sampson ve Jones, 2009). Kromozom 1p34.3-p32.1'de bulunan MUTYH geninin her iki alelindeki eşey hattı mutasyonları poliplerin gelişiminden sorumludur. MP yaşamın üçüncü ve dördüncü on yılında çok sayıda kolorektal adenom (genellikle<100) ile ortaya çıkan resesif geçişli bir sendromdur (Nielsen ve ark., 2011). Hastalarda %80 oranında KRK gelişme riski vardır ve ortalama tanı yaşı 40 ile 60 arasındadır (Theodoratou ve ark., 2010).

1.4.1.3.Peutz-Jeghers Sendromu

Peutz-Jeghers sendromu (PJS) bir tümör baskılayıcı gen olan serin treonin kinaz 11'deki (STK-11) eşey hattı mutasyon sonucu oluşan ve toplumda nadir olarak ortaya çıkan otozomal dominant bir polipozis sendromudur (Bogaert ve Prenen, 2014). STK11 geni, hücre metabolizması, hücre polaritesi, apoptoz ve DNA-hasar cevabı gibi çeşitli süreçlerde görev alır. PJS hamartomatoz polipler, mukokutanöz pigmentasyon ve gelişen maligniteye karşı artan duyarlılık ile karakterize edilir (Beggs ve ark., 2010). PJS'ye yol açan STK11 varyantlarının yaklaşık %30'u büyük genomik delesyonlardan kaynaklanmaktadır (Chow ve ark., 2006; Hearle ve ark., 2006). PJS'li yetişkinlerde gastrointestinal kanser gelişme riskinin yüksek olmasının yanı sıra gastrointestinal olmayan kanserlerin özellikle meme kanseri riski ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bogaert ve Prenen, 2014).

1.4.1.4.Kalıtsal Polipoz Olmayan Kolorektal Kanser

Lynch sendromu olarak da bilinen herediter non-polipoz kolorektal kanser (HNPCC), otozomal dominant bir hastalıktır. Sendrom, MutS homolog genleri 2 ve 6 (MSH2, MSH6), MLH1 ve PMS2'de dahil olmak üzere HET genlerindeki mutasyonlar ile karakterizedir. HET genlerinin mutasyonu, DNA HET fonksiyonunun kaybına yol

açarak anormal DNA replikasyonuna, artan spontan mutasyon sıklığına ve MSI'ya neden olur (Martín-López ve Fishel, 2013). HNPCC ailesel kolorektal kanserlerin yaklaşık %50'si; tüm kolorektal kanser vakalarının ise %3'ünden sorumludur (Kastrinos ve Stoffel, 2014). Detaylı bir kolonoskopi sonrası sporadik KRK'nın ortaya çıkması genellikle 10 yıldan fazla sürede gerçekleşirken Lynch sendromunda ise 2 yıl sonra gözlenebilir (Vasen ve ark., 1995).

1.4.2. Sporadik Kolorektal Kanser

Sporadik kolon kanseri, tüm KRK vakalarının %80-85'ini oluşturur ve belirgin bir yatkınlık olmadan genellikle ortalama 50 yaş ve üstü bireylerde ortaya çıkar (Pavlovic-Calic ve ark., 2007). Tüm genom ilişkilendirme çalışmalarına göre KRK'da tespit edilen 80'e yakın mutasyondan sadece 15'inin KRK'ya yol açtığı bildirilmiştir (Wood ve ark., 2007).

Sporadik KRK'ların yaklaşık %70'inden KIN sorumludur. Bu yolla meydana gelen vakalar anöploid karyotip, tümör baskılayıcı gen lokuslarında HEK ve kromozomal yeniden düzenlemeler aracılığıyla meydana gelen sayısal veya yapısal kromozomal anormalliklerin birikmesi ile karakterize edilir (Grady ve Carethers, 2008).

Sporadik KRK'ların yaklaşık %15'i MSI pozitifdir (Weisenberger ve ark., 2006). MSI, yüksek frekansta (MSI-H) veya düşük frekansta (MSI-L) oluşur. MSI-L tümörleri sıklıkla mikrosatellit kararlı (*Microsatellite stable*, MSS) olarak ele alınır (Rajagopalan ve ark., 2003). Sporadik MSI kolon tümörlerinin çoğu CAMF pozitifdir ve yaklaşık %40'ı kolonun sağ bölgesinde bulunur. B-RAF'ta meydana gelen aktive edici mutasyonlar neredeyse sadece MSI ve CAMF pozitif KRK'da meydana gelir (Shen ve ark., 2007). MLH1, MSH2, PMS2 ve MSH6 gibi HET genlerinin eşey hattı mutasyonlarının neden olduğu Lynch sendromunun aksine, sporadik KRK'larda HET eksikliği, vakaların %80'inde HET genlerinin promotör bölgelerinin hipermetilasyonu ile susturulmasından kaynaklanmaktadır (Palomaki ve ark., 2009; Weisenberger ve ark., 2006).

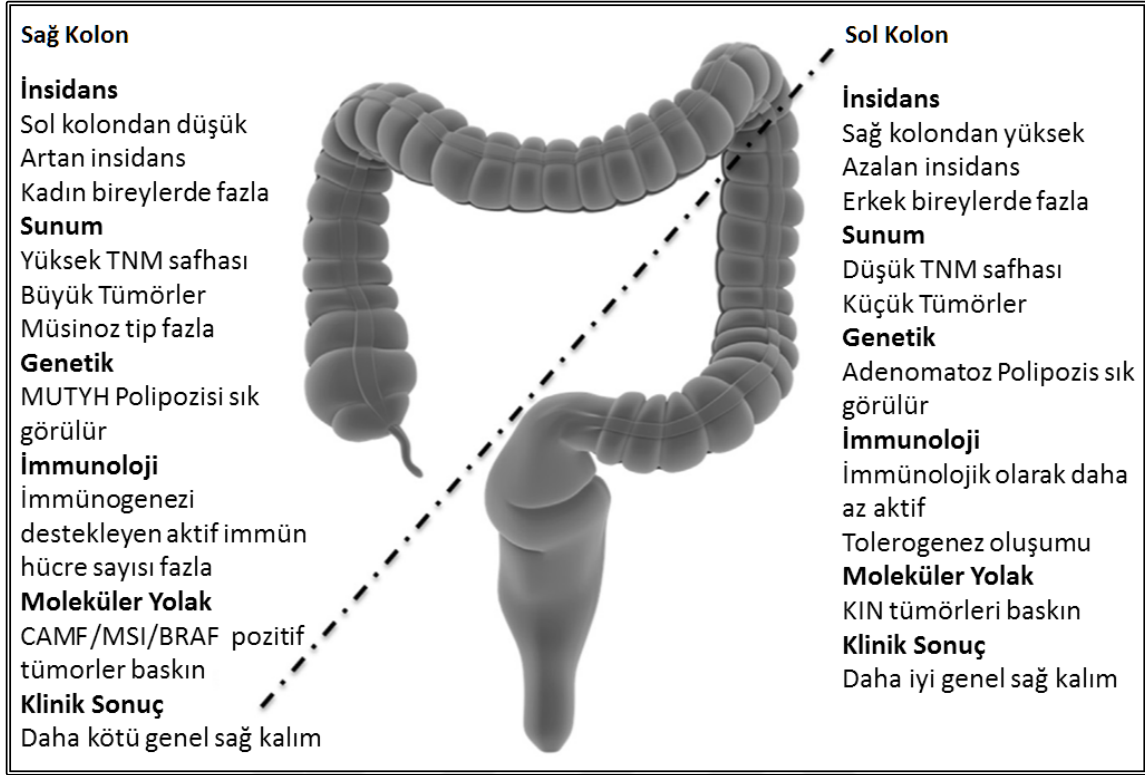
Sporadik proksimal KRK'ların yaklaşık %30-40'ı distal KRK'ların %3-12'sine kıyasla CAMF pozitifdir (Barault ve ark., 2008). CAMF-pozitif KRK'lar, MLH1 promotörünün metilasyonu nedeniyle sıklıkla MSI-H olsalar da %50'den fazlası MSS'dir. Sporadik

KRK'den farklı olarak CAMF, MSI pozitif Lynch sendromunda nadir görülür (Samowitz ve ark., 2005). CAMF pozitif tümörler, BRAF mutasyonları ve MLH1 metilasyonu karakterize olan CAMF yüksek; KRAS mutasyonları ile ilişkili olarak ve CAMF düşük olarak iki gruba ayrılır (Shen ve ark., 2007).

Önceki yıllarda genel anlamda KRK'nin sınıflandırılması sadece klinik ve patolojik özelliklere dayandırılmakta idi. Günümüzde karsinogenezin farklı KRK alt tiplerinde ortaya çıkış sebepleri, genetik farklılıklar, hastalığın gidişatı ve tedavisi için önemli olduğundan patolojik, moleküler ve klinik özelliklerin tümü göz önüne alınarak KRK 5 alt tipe sınıflandırılmıştır. KRK alt tipleri: 1) CAMF-H / MSI-H / BRAF pozitif; 2) CAMF-H / MSI-L veya MSS / BRAF pozitif; 3) CAMF-L / MSS veya MSI-L / KRAS pozitif; 4) CAMF-negatif / MSS; ve (5) HNPCC / CAMF negatif / MSI-H olmak üzere sıralanabilir (Jass, 2007).

1.5.Primer Tümör Lokalizasyonu

Kolon anatomik olarak sağ kolon çekum, yükselen kolon, hepatik fleksura ve transvers kolon; sol kolon ise splenik fleksura, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum bölümlerinden oluşur (Nitsche ve ark., 2016). Sağ ve sol kolon kanseri arasındaki temel farklar **Şekil 1.1**'de özetlenmiştir. Primer tümör orijini sağ ve sol olan kolon kanserleri arasında gözlenen sıklık ve uyumsuzluklardan dolayı ilk defa Bufill ve arkadaşları anatomik bölgeye bağlı olarak KRK'yı sınıflandırmışlardır (Bufill ve ark., 1990). Sağ ve sol kolon bölgesi farklı embriyolojik kökenlerden gelişir. Şöyle ki; sağ kolon embriyonik orta bağırsaktan; sol kolon ise kalın bağırsaktan kökenlenir. Bu anatomik farklılıklar sağ ve sol kolonun mikroçevrelerinin, taşıdıkları mikrobiyomun, klinik özelliklerinin, kromozomal ve moleküler özelliklerinin farklı olmasına yol açar (Brulé ve ark., 2015; Stintzing, 2017). Sağ ve sol kolona ait damarlanmalar birbirinden farklılık göstermektedir. Üst mezenterik arter, duodenumun ortasından transvers kolonun ortasına orta bağırsak orijinli kısımlara; alt mezenterik arter orta transvers kolondan rektuma kadar arka bağırsak orijinli kısımlara kan taşır (San Roman ve ark., 2011).



Şekil 1.1: Sağ kolon kanseri ve sol kolon kanseri arasındaki temel farklılıklar (Lee ve ark., 2015)

Sağ kolondaki tümörler gelişimlerinin ileri safhalarında fark edilirler ve sol kolondaki tümörlere göre daha düşük bir sıklığa ve daha kötü prognoza sahiptirler. (Stintzing, 2017). Sağ kolon kanseri olan hastaların çoğunlukla kadın ve yaş ortalamalarının yüksek olduğu izlenmektedir. Sağ kolon kökenli tümörler sol kolona göre daha büyük tümör çapına, ileri tümör evrelerine ve az farklılaşmış ya da farklılaşmamış tümör patolojisine sahiptirler (Plastiras ve ark., 2019; Sinicrope ve ark., 2015; Jung ve ark., 2017; Benedix ve ark., 2010; Weiss ve ark., 2011; Iacopetta, 2002).

Patolojik olarak da sağ ve sol kolon kanserleri arasında makroskopik farklılıklar da mevcuttur. Sağ kolon kökenli tümörler tipik olarak lümene çıkıntı yapan ve önemli anemilere neden olan hacimli, egzofitik, polipoid lezyonlardır, müsinöz karakterdedirler, yüksek MSI ve CpG adası metilasyonu gösterirler. Sol kolon tümörleri ise sıklıkla infiltrate edici-kısıtlayıcı lezyonlardır, obstrüktif semptomlarla ortaya çıkarlar, kromozomal kararsızlığa sahiptirler ve çoğunlukla anöploiddirler (Papagiorgis ve ark., 2006; Iacopetta, 2002; Bufill ve ark., 1990). Ayrıca, yüksek TNM-evresi, artmış

vasküler invazyon sıklığı, yüksek dereceli ve invaziv tümör sınırı sağ kolon tümörlerinde daha yayginken, sol kolonda dairesel ve polipoid tümörler yaygındır (Snaebjornsson ve ark., 2010; Ghazi ve ark., 2012). AP hastalarında sol kolon kanseri daha yayginken MUTYH ile ilişkili polipozda sağ kolon kanseri daha sıktır (Nielsen ve ark., 2009).

Sağ ve sol kolon kanserlerinin ölüm, sağ kalım ve prognozlarında farklılıklar mevcuttur. Sağ kolon kanserli hastalarda mortalite yüksektir (Benedix ve ark., 2010) ve özellikle 3. evrede daha yüksekken 2. evrede daha düşüktür (Weiss ve ark., 2011). Ölüm riskinin sol kolon kanserlerinde sağ kolona göre %20 oranında daha az olduğu rapor edilmiştir (Petrelli ve ark., 2017). Sağ kolon kanseri daha kötü bir prognoza sahiptir, özellikle uzak organ metastazı varlığında kötü prognozlu olduğu bilinmektedir (Petrelli ve ark., 2017; Arnold ve ark., 2017b; Brulé ve ark., 2015; Chen ve ark., 2016). Her ne kadar metastaz sol kolon kanserinde daha yaygınsa da sağ kolon kanserinde sağ kalım oldukça düşüktür (Benedix ve ark., 2010; Suttie ve ark., 2011; Derwinger ve Gustavsson, 2011; Petrelli ve ark., 2017). Hastalıksız sağ kalım süresi özellikle seviye 3 sağ kolon kanserlerinde anlamlı derecede daha düşüktür (Jung ve ark., 2017).

Klinik, patolojik ve histolojik farkların yanı sıra sağ ve sol kolon kanserleri arasında moleküler farklılıklar da oldukça fazladır. Sol kolon kökenli tümörler genetik olarak kararsız ve fenotipik olarak da daha agresiftir (Elkatan ve ark., 1996). KRAS ve p53 mutasyonları sol kolon kanserlerinde sağ kolona kıyasla daha yüksektir (Lee ve ark., 2015; Soong ve ark., 2000; Iacopetta, 2002; Sugai ve ark., 2006). Sol kolon tümörlerinin neredeyse tamamında, tümör baskılayıcı genlerdeki genetik farklılıklara paralel olarak, 17p, 18 ve 5q kromozomal bölgelerde kayıplar rapor edilmiştir (Delattre ve ark., 1989). Sağ kolon kökenli tümörlerde MSI-H oranı genellikle daha yüksektir (Kloor ve ark., 2010; Sameer ve ark., 2013; Jenkins ve ark., 2007). Buna paralel olarak hatalı eşleşme tamiri yetersizliği (HETy) sağ taraf kolon tümörlerinde belirgin olarak daha yüksektir (Salem ve ark., 2017; Sinicrope ve ark., 2011). CAMF pozitif tümör sıklığı sağ kolon kanserlerinde daha yüksektir (Lee ve ark., 2015). Ayrıca BRAF mutasyonları sol kolon tümörlerine kıyasla sağ kolonda daha sık gözlenmektedir (Salem ve ark., 2017; Lee ve ark., 2015). Ayrıca tümör örneklerinde yapılan analizler

sağ ve sol kolondaki tümörler arasında gen ifadelerinde de farklılıklar olduğunu göstermiştir (Lijuan ve ark., 2021; Peng ve ark., 2018).

Primer tümörün yeri, anti-epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) tedavisinde ve kemoterapi dirençli tedavi için dikkate alınan bir etkiye sahiptir (Brulé ve ark., 2015). Sağ kolon kanseri hastaları anti-EGFR tedavisine zayıf yanıt verdiği için *The National Comprehensive Cancer Network* kılavuzları, yalnızca RAS wild tip sol kolon kanserlerinin tedavisi için anti-EGFR ilaçlarının kullanılmasını önermektedir (NCCN, 2017).

1.6.Kemoterapi

1.6.1. Floro-Pirimidinler

Floropirimidinler, özellikle 5-flourourasil (5-FU) ve kapesitabin, tek başına veya farklı ilaçlarla kombine olarak kolorektal kanserinde içinde bulunduğu birçok kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. 5-FU Heidelberg ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Heidelberg ve ark., 1957). 5-FU, 5. karbonunda hidrojen yerine bir flor atomu bulunan urasil analogudur. 5-FU pirimidin sentezinde rol alan temel enzim olan timidilat sentazın (*Thymidylate synthase*, TYMS) inhibisyonuna sebep olur (Sobrero ve ark., 2000).

5-FU ve kapesitabin ilaçlarının anabolizma ve katabolizmalarında rol alan genler ve etki mekanizmaları **Şekil 1.2'**de verilmiştir. 5-FU'nun %80-85'i karaciğerde dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) tarafından inaktif metabolitlerine dönüştürülür ve orijinal dozun sadece %1-3'ü anabolizma reaksiyonları aracılığı ile sitotoksik etki gösterir (Saif ve ark., 2009). 5-FU'nun karaciğer hücrelerine girişi *SLC22A7* geni tarafından sentezlenen bir taşıyıcı protein tarafından sağlanır (Miura ve ark., 2010). Timidilat fosforilaz (TMP) aracılığıyla önce 5-floro-2'-deoksiüridine (FUDR) dönüşen 5-FU, daha sonra timidin kinaz 1 (TK1) aracılığıyla florodeoksiüridin monofosfata (FdUMP) dönüştürülür. FdUMP, TYMS ile bir kovalent kompleks oluşturur ve TYMS'yi inhibe ederek DNA sentezi için gerekli olan deoksiüridin monofosfatın (dUMP)'nin deoksitimidin monofosfata (dTMP)'ye dönüşümünü önler. TYMS'nin inhibisyonu deoksitimidin trifosfat (dTTP) sentezini bloke ederek hücre içinde dTTP'nin yetersiz kalmasına; dUTP'nin DNA'ya bağlanmasına ve böylece DNA tamir

mekanizmalarının aşırı yüklenmesine sebep olarak hücre ölümünü tetikler (Longley ve ark., 2003; Kunz ve ark., 2009; Saif ve ark., 2009). FdUMP aynı zamanda 5,10-metilen tetrahidrofolatın (CH_2THF) DNA metilasyonunda görev alan dihidrofolata (DHF) eşzamanlı dönüşümünü de bloke eder (Gmeiner, 2005). 5FU'nun diğer aktif metabolitleri uridin trifosfat (UTP) yerine RNA'ya dahil olan florouridin trifosfat (FUTP) ve deoksitimidin trifosfat (dTTP) yerine DNA içine dahil olan florodeoksiüridin trifosfat (FdUTP) olup bu metabolitleri aracılığı ile RNA ve DNA sentezini inhibe eder (Miura ve ark., 2010).

5-FU'nun %80'inden fazlası katabolik reaksiyonlar ile oldukça hızlı bir şekilde elimine edilip idrar yoluyla atılır (Heggie ve ark., 1987). 5-FU sırasıyla dihidropirimidin dehidrogenaz (DPD; *DPYD* geni tarafından kodlanır) aracılığıyla 5-dihidroflorourasile (5-DHFU), dihidropirimidinaz (DPYS) aracılığıyla floro-beta-ureidopropiyonata (FUPA) ve son olarak β -ureidopropionaz (UPB1) aracılığıyla floro-beta-alanine (FBAL) dönüşerek idrarla dışarı atılır (Heggie ve ark., 1987). DPD pirimidin metabolizmasında urasil ve timinin NADPH aracılı 5,6-dihidropirimidinlere indirgenmesini sağlar (**Şekil 1.2**) (Shiotani ve ark., 1981).

Sonuç olarak 5-FU'nun anabolizması, aktif nükleotitler olan FdUMP, FUTP ve FdUTP oluşumunu sağlarken; katabolizması anabolizma için mevcut olan 5-FU miktarını kontrol ettiğinden 5-FU metabolizmasında önemli rol oynadığından katabolik yol, hastaların 5-FU'ya verdiği tepkinin belirlenmesinde kritik rol oynar. DPD aktivitesinin azalması ilacın yarı ömründe artışa ve doza bağlı şiddetli toksisite görülmesine yol açacaktır (Miura ve ark., 2010).

Kapesitabin toksisitesi tümör hücrelerinde daha fazla görülürken, sağlıklı dokularda daha az sıklıkla meydana gelmektedir (Miwa ve ark., 1998; van Cutsem ve ark., 2001).

1.6.2. Kombine Terapi

Klinikte 5-FU tedavisine kıyasla daha iyi etkinlik ve hayatta kalma oranı sağlayan ve sağ kalımı oranını artıran kombin tedaviler kullanılmaktadır (Lucas ve ark., 2011; Wulaningsih ve ark., 2016). Metastatik kolorektal kanser tedavisinde, floropirimidinleri içeren kombin tedaviler genellikle lökovorin (*Leucovorin*, LV, 5'-formiltetrahidrofolat) + floropirimidinler + oksaliptatin (FOLFOX) veya lökovorin + floropirimidinler + irinotekan (FOLFIRI) şeklindedir (Jones ve ark., 2006).

FdUMP bir kofaktör olan CH₂THF varlığında TYMS'ye sıkıca bağlanır; bu etkileşim, yavaş yavaş ayrışan kovalent bağlarla bir arada tutulan TS-CH₂THF-FdUMP kompleksi (üçlü kompleks) oluşumuna yol açar (Santi ve ark., 1974). FdUMP ile TYMS arasındaki ilişki oranı ve üçlü kompleksin stabilitesi, artan CH₂THF konsantrasyonlarında artmaktadır (Danenbergl ve Danenberg, 1978; Lockshin ve Danenberg, 1981). Bu nedenle FdUMP'nin TYMS'e optimal bağlanması için CH₂THF'nin hücre içi seviyelerinin yüksek olması gereklidir. Lökovarin, CH₂THF'nin hücre içi konsantrasyonunu yükselterek dolaylı yoldan 5-FU etkinliğini artırmaktadır (Matherly ve ark., 1990; Park ve ark., 1988). LV, hücreye alındıktan sonra folilpoliglutamat sentetaz ile CH₂THF'ye dönüştürülür. Poliglutamasyon CH₂THF'nin hücredeki tutulumunu arttırmakla kalmayıp aynı zamanda üçlü kompleksin stabilizasyonunu sağlar (Radparvar ve ark., 1989). 5-FU/LV'nin daha iyi klinik sonuçlar verdiği bilinmektedir (Piedbois ve ark., 1992).

İrinotekan, replikasyon sırasında DNA'nın çözülmesinde rol oynayan nükleer bir enzim olan topoizomerez I'in güçlü bir inhibitörü olduğundan çift sarmallı DNA'nın açılmasını engelleyerek kopmalara yol açar (Kawato ve ark., 1991; Jaxel ve ark., 1989). Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda irinotekan ve FU/LV ile yapılan ilk tedavi ile FU/LV tedavisi karşılaştırıldığında oldukça iyi sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir (Saltz ve ark., 2000 ; Douillard ve ark., 20007).

Oxaliptatin, standart kemoterapide kullanılan yeni bir platin türevi ilaçtır. Hücreye girdikten sonra, başta DNA, RNA ve proteinler olmak üzere nükleofilik moleküllere

bağlanır (Graham ve ark., 2000). Oxaliplatin DNA'da iki bitişik guanin veya guanin-adenin bazları arasında çapraz bağ oluşturur. Oxaliplatinin etki mekanizması doğası gereği replikasyon ve transkripsiyon inhibisyonu, proteinlerin yapısına bağlanma, apoptozu indükleme gibi çok farklı şekillerde olabilir. (Mehmood, 2014; Alcindor ve Beauger, 2011).

1.7.Yan Etkiler

5-FU, replikasyonun sürekli meydana geldiği dokuları daha fazla etkilediğinden (Fang ve ark., 2016) gastrointestinal sistem ve deri gibi hızla bölünen dokular 5-FU'nun toksik etkilerine karşı daha fazla hassasiyet göstermektedir (Wang ve ark., 2016). 5-FU kaynaklı ortaya çıkan yan etkiler tipik olarak, dokularda artmış sitotoksik floropirimidin metabolitleri ve 5-FU metabolizmasında rol oynayan genlerdeki varyasyonlardan kaynaklanmaktadır (Miura ve ark., 2010). 5-FU tedavisi, DPD eksikliği olan kişilerde öldürücü olabilir (Fidai ve ark., 2018; Tong ve ark., 2018). 5-FU kaynaklı başlıca toksisiteler arasında avuç içlerinde ve ayak tabanlarında kızarıklık, şişme ve döküntüler şeklinde ortaya çıkabilen el ayak sendromu, nötropeni, sindirim sistemini kaplayan mukoza tabakasının iltihaplanması ve lezyonlar oluşturması ile tipik mukozit sayılabilir.

1.7.1. El-Ayak Sendromu

Klinik çalışmalarda hastaların yaklaşık %77'sinde el-ayak sendromu gözlenmektedir (Hong ve ark., 2012). El-ayak sendromu ölümcül olmasa da semptomların varlığı kişide yaşam kalitesini azaltabilir ve tedavide doz gecikmeleri ve azalmalara gidildiğinde tedavinin başarısını etkileyebilir. Ortaya çıkış sebepleri tam olarak aydınlatılamamış olsa da el ayak sendromunda dilate kan damarları, ödem ve beyaz kan hücresi infiltrasyonu gibi inflamatuvar değişiklikler gözlenmektedir (Nagore ve ark., 2000; Abushullaih ve ark., 2002). Yapılan bir çalışmada kapesitabin ile tedavi edilen hastalarda bazı CES1 ve CDA varyantlarına bağlı olarak el-ayak sendromunun ortaya çıkabileceği rapor edilmiştir (Wheeler ve ark., 2014). 5-FU aracılı el ayak sendromu, 5FU'nun veya metabolitlerinin deride birikmesi ile birlikte doza bağlı olarak ortaya çıkar (Leo ve ark., 1994). DPD inhibitörlerini içeren 5-FU ön ilaçlarının sık sık el-ayak sendromunu tetiklemesinden dolayı özellikle hedef dokudaki yüksek DPD

aktivitesinden kaynaklı 5-FU katabolitlerinin, sendromun ortaya çıkmasından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (Douillard ve ark., 2002; Milano ve ark., 2008).

1.7.2. Nötropeni

Sitotoksik kemoterapiye bağlı nötropeni, yaygın gözlenen yan etkilerden biridir. Tümör hücreleri; anjiyogenez, immün sistemin baskılanması, migrasyon, invazyon ve metastazın teşvik edilmesi için nötrofilleri uyarırlar (Dumitru ve ark., 2013). Ayrıca nötrofillerin anti-kanser ilaçlardan etkilenme potansiyelleri de bulunduğundan (Coussens ve ark., 2013; Gregory ve Houghton, 2011), kemoterapiden olumsuz etkilenmeleri olasılığı yüksektir. Nötropeni, ateşli nötropeni riskini artırma potansiyeli taşıması nedeniyle kemoterapi dozunun azaltılmasına/ertelenmesine, hastaneye yatış ve ölümlere neden olabilir (Kuderer ve ark., 2007). Önceki yıllarda kemoterapi sonrası gözlenen nötropeni, önlenmesi gereken bir yan etki olarak kabul edilmekte iken kemoterapi sırasında ortaya çıkan nötropenin sitotoksik ilaca karşı bir cevap olarak tedavi etkinliğinin bir ölçüsü olarak ele alındığından (Shitara ve ark., 2010; Han ve ark., 2012), kolorektal adenokarsinomunda içinde bulunduğu bazı kanser türleri için özellikle hafif derecedeki nötropenin sağ kalım oranlarını yükselttiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Shitara ve ark., 2009; Yamanaka ve ark., 2007).

1.7.3. Mukozit

Kemoterapide kullanılan sitotoksik ajanlara bağlı olarak, standart kemoterapi rejimleri alan hastaların %40-70'inde genel; %5-15'inde intestinal mukozit gözlemlenmektedir (Scully ve ark., 2006; Chan ve ark., 2003; Jones ve ark., 2006). Mukozit yalnızca ağızla sınırlı olmayıp gastrointestinal kanalın diğer bölgelerine doğru etkisi de giderek artmaktadır. Mukozit belirtileri etkilenen bölgeye bağlı olarak genellikle ağrı, ülser oluşumu, bulantı ve kusma, diyare ve rektal kanamadır. Mukozit daha çok keratinize olmayan mukozayı etkiler. Oral ve gastrointestinal mukozitin sistemik etkileri yorgunluk, yeterli beslenememe, sepsis ve bazen de ölümdür (Villa ve Sonis, 2015; Pulito ve ark., 2020; Al-Ansari ve ark., 2015; Scully ve ark., 2006). Oral mukozitin etkisi diğer bölgelere göre daha şiddetlidir ve kanser tedavisinde en ciddi hematolojik olmayan yan etki olarak kabul edilmektedir (Chan ve ark., 2003). Bağırsak mukozitinin görülme sıklığı ve ciddiyeti, izlenen kemoterapinin içeriğine bağlıdır (Jones ve ark.,

2006). Özellikle 5-florourasil ve irinotekanın birlikte kullanıldığı terapilerin mukozite bağlı oluşan yan etkilerin şiddetinin artmasına sebep olabileceği bilinmektedir (Ribeiro ve ark., 2016; Pereira ve ark., 2016).

5-FU, kolorektal tümörler de dahil olmak üzere birçok tümörün tedavisi sürecinde diyare ve intestinal mukozit gibi doz sınırlayıcı toksisiteler meydana getirir (Macdonald, 1999; Vodenkova ve ark., 2020). 5-FU enterositlerde apoptoza yol açarak kript ve villus uzunluğunu azaltabilir (Soares ve ark., 2008). Yapılan in vivo ve vitro çalışmalar 5-FU'nun TNF- α and IL-1 β seviyelerini artırdığını, (Logan ve ark., 2009; Wu ve ark., 2011) NF- κ B'yı aktive ettiğini (Chang ve ark., 2012) ve NADPH oksidaz aracılığıyla reaktif oksijen türleri üretimine yol açarak, enflamatuvar sitokinlerde artış meydana getirip apoptozu tetiklediğini ortaya çıkarmıştır (Yasuda ve ark., 2012; Logan ve ark., 2009).

Bağırsak mukozasına erişimin sınırlı olması ve güvenilir testlerin az olması nedeniyle mukozit zor tespit edildiğinden diyare dereceleri intestinal mukozitin tanısında belirteç olarak kullanılmaktadır (CTCAE, 2017).

1.7.4. Diyare

Kolorektal kanserde 5-FU bazlı adjuvan tedavi alan hastaların %50-80'inin farklı seviyelerde diyare geliştirdiği; hastalarda ciddi hasarlara yol açabilen 3. ve 4. seviyede diyarenin ise %30 oranında görüldüğü bildirilmiştir (Lee ve ark., 2014a; Gibson ve Stringer, 2009; Yeung, 2021).

Kemoterapi sebebiyle ortaya çıkan, diyare bağırsakta emilim ve sekresyon arasında bir dengesizliğe neden olarak (Gibson ve Stringer, 2009; Yeung, 2021) kardiyovasküler bozukluklara ve ölüme yol açabilecek sıvı ve elektrolitlerin tükenmesine, yetersiz beslenmeye, susuz kalmaya yol açabilir. Diyarenin şiddeti kemoterapide kullanılan ilaçların kombinasyonuna ve ilacın veriliş şekline göre değişkenlik gösterir. Kolorektal kanser tedavisinde diyareye neden olan başlıca terapötik ajanlar 5-FU, kapesitabin ve irinotekandır (Yeung, 2021). 5-FU ve LV beraber uygulandığında ya da 5-FU bolus enjeksiyonuyla tatbik edildiğinde, diyarenin şiddeti artabilir (Vincenzi ve ark., 2008). Rakamsal olarak ifade etmek gerekirse kemoterapi kaynaklı diyare sadece 5-FU uygulamasında hastaların %50'sinde, kombine uygulandığında ise %40'ında

gelişebilmektedir (Moertel ve ark., 1995). Seviye 1 ve 2 diyare oluşumunda 5-FU'ya nazaran kapasitabin daha az sorumlu iken, ileri derece diyarelerde vaka sayısında bir farklılık tespit edilmemiştir (Twelves ve ark., 2005). Nitekim, kısa süreli infüzyonel 5-FU ve haftalık irinotekan uygulamasında hastaların %14'ünde seviye 3 veya 4 diyare gözlenmiştir (Wei ve ark., 2004).

Diyare çoğu durumda mukozitin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Logan ve ark., 2008). Etki mekanizması konusunda literatürde pek veri bulunmasa da fareler üzerinde yapılan bir çalışmada 5-FU uygulaması sonrası sindirim kanalında iyon nakli ve su emiliminden sorumlu aquaporinlerinle ilişkili gen anlatımlarının azaldığı bildirilmiştir (Sakai ve ark., 2012).

1.8.Pirimidin Yolağı Temel Molekülleri

1.8.1. Dihidropirimidin Dehidrojenaz

Dihidropirimidin dehidrojenaz geni tarafından kodlanan DPD enzimi, urasil ve timinin metabolize edilmesinden sorumludur (Alsanosi ve ark., 2014; Daher ve ark., 1990). Bu görevinin yanı sıra 5-FU'nun %80'inden fazlasının parçalanarak idrar yoluyla atılmasını sağlayan katabolik yolaktaki ilk enzimdir (Heggie ve ark., 1987; Diasio, 1998).

Dihidropirimidin dehidrojenaz geni, 1p22 kromozomda lokalize olup 4.399 nükleotid ve 23 ekzondan meydana gelmektedir. Dihidropirimidin dehidrojenaz geni çoğunlukla toksisite riskini artıran veya mutlak bir enzim eksikliği ile sonuçlanabilecek, otozomal resesif bir şekilde kalıtılan polimorfizmik dizilere sahiptir (Palmirotta ve ark., 2017; Palmirotta ve ark., 2018; Deenen ve ark., 2016; Moh'd Khushman ve ark., 2018). 200'den fazla varyantı bulunan *DPYD* genindeki polimorfizmlerin sıklığı farklı etnik gruplar arasında değişkenlik gösterebilmektedir (Ensembl-DPYD, 2022; Toffoli ve ark., 2015; Elraiyyah 2017).

5-FU temelli kemoterapilerde gözlenen şiddetli toksisite vakalarının çoğunda sebep tam olarak bilinmemekle birlikte, büyük oranda DPD enzim eksikliğinden kaynaklandığı ve bu eksikliğin temelinde *DPYD* geni varyantlarının olduğu öngörülmektedir (Palmirotta ve ark., 2017; Palmirotta ve ark., 2018; Lunenburg ve ark., 2020; Bukhari ve ark., 2021; Ruzzo ve ark., 2017).

1.8.1.1.DPYD Polimorfizmleri

DPDY *2A (rs3918290) Polimorfizmi

DPDY 1905+1G>A bölgesinde meydana gelen ve *2A olarak adlandırılan bu polimorfizm ilk olarak Vreken ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Vreken ve ark., 1996). Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalara göre *DPDY* *2A ekzon 14'ün okunması sırasında atlamaya neden olup 165 baz çiftlik alanın delesyon ile ortadan kaldırılmasına sebep olduğundan katalitik olarak inaktif bir enzimin oluşmasına yol açar (Vreken ve ark., 1996; Van Kuilenburg ve ark., 1997; Offer ve ark., 2013). Yapılan birçok çalışmada *DPDY* *2A varyant allel taşıyan bireylerde 5-FU kullanımına bağlı ciddi yan etkiler tespit edilmiştir (Terrazzino ve ark., 2013; Boisdron-Celle ve ark., 2007; Deenen ve ark., 2011; Loganayagam ve ark., 2013; Joerger ve ark., 2015).

DPD aktivitesinin çok azalması hastalarda ciddi yan etkilere ve hatta ölüme neden olabileceğinden, 5-FU zayıf metabolizör fenotipe sahip bireylerin 5-FU bazlı tedavilerden uzak durması önerilir (Amstutz ve ark., 2018; Lunenburg ve ark., 2020).

DPDY *13 (rs55886062) Polimorfizmi

Dihidropirimidin dehidrojenaz *13 ilk olarak Collie-Duguid ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Collie-Duguid ve ark., 2000) ve 1679T>G veya T>A olarak meydana gelir. *DPDY* *13 varyantının DPD enzim aktivitesi üzerindeki rolü tam olarak belirlenememiş olmakla birlikte *DPDY* * 13 varyantını taşıyan bireylerde DPD enzim aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir (Van Kuilenburg ve ark., 2002; Offer ve ark., 2013). *DPDY* *13, *Dutch Pharmacogenetics Working Group* (DPWG) kılavuzunda DPD fonksiyon kaybına yol açan varyantlar arasında yer almaktadır (Lunenburg ve ark., 2020). *DPDYD* *13 varyantı enzim aktivitesini neredeyse tamamen ortadan kaldırdığından 5-FU bazlı terapi gören hastalarda çok ciddi yan etkilere neden olmaktadır (Collie-Duguid ve ark., 2000; Ezzeldin ve ark., 2005; Loganayagam ve ark., 2013; Froehlich ve ark., 2015).

DPYD 2846A>T (rs67376798) Polimorfizmi

DPYD 2846A>T varyant alleli ilk olarak van Kuilenburg ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (van Kuilenburg ve ark., 2000). 2846A>T polimorfizmi 949. kodonda aminoasit değişikliğine (Asp-Val) değişikliğine sebep olur ve DPD enziminde kofaktör bağlanmasına veya elektron taşınmasına müdahale eden yapısal bir değişiklik oluşumuna yol açar (van Kuilenburg ve ark., 2002). Yapılan çalışmalar c.2846A>T varyantının homozigot polimorfik tipteki mevcudiyetinin homozigot yabani genotipe kıyasla DPD aktivitesinde %59 oranında bir düşüşe sebep olduğunu göstermektedir (Offer ve ark., 2014). *DPYD 2846A>T*, DPWG kılavuzunda enzim fonksiyonunda azalmaya neden olan varyantlar arasında yer aldığından (Lunenburg ve ark., 2020), T alleli ciddi 5-FU kaynaklı toksisite ile ilişkilidir (Deenen ve ark., 2011; Boisdron-Celle ve ark., 2007; Loganayagam ve ark., 2013; Joerger ve ark., 2015; Rosmarin ve ark., 2014).

DPYD 1129-5923C>G (rs75017182) Polimorfizmi

DPYD 1129-5923C>G polimorfizmi intron 10 üzerinde yer alan ve alternatif splices üzerine etkili bir HapB3 haplotipidir (van Kuilenburg ve ark., 2010). Bu bölgenin HapB3 ile bağlantılı olan pre-mRNA işlenmesini ve enzim aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (Nie ve ark., 2017). 1129-5923C>G polimorfik bölgesi erken bir dur (*stop*) kodonu oluşumuna sebep olur. *DPYD 1236G>A* varyasyonu herhangi bir aminoasit değişikliğine neden olmadığı için *DPYD1129-5923C>G* varyasyonu ile tam bağlantı dengesizliği içindedir. HapB3 üyesi olan bu varyantlar DPD enzim aktivitesini %50 oranında azaltır (Lunenburg ve ark., 2020). 1129-5923C>G polimorfik bölgesinin 5-FU kaynaklı toksisitesi ile ilişkisine dair literatürdeki veriler çelişkilidir (Deenen ve ark., 2011; Froehlich ve ark., 2015; Gross ve ark., 2008; Loganayagam ve ark., 2013; Jennings ve ark., 2013; Lee ve ark., 2016a).

DPYD *9A (rs1801265) Polimorfizmi

*9A(85T>C) polimorfizmi Cys29Arg amino asit değişikliğine sebep olur. *9A varyasyonunun DPD aktivitesini azaltıcı etkisi olduğuna dair veriler bulunmakla birlikte (Gentile ve ark., 2016), 5-FU kaynaklı tedavilerde meydana gelen yan etkilerle ilişkisi

halen tam olarak ortaya konulamamıştır ve birbiri ile çelişkili sonuçlar bulunmaktadır (Pellicer ve ark., 2017; Maharjan ve ark., 2019; Nie ve ark., 2019; Varma ve ark., 2019). DPWG kılavuzu *9A'yı fonksiyonel allel olarak tanımlamasına rağmen ciddi floropirimidin kaynaklı toksisitesi ile bağlantılı olup olmadığına dair kanıtların yetersiz olduğunu bildirmektedir (Lunenburg ve ark., 2020).

DPYD 234-123G>C (rs41309171) Polimorfizmi

DPYD 234-123G>C polimorfik bölgesi ile ilgili literatürde çok az veri bulunmaktadır. Sınırlı düzeydeki veriye göre intron 3'te yer alan bu bölge urasil metabolizması ile ilişkili değildir (Sistonen ve ark., 2014). *DPYD 234-123G>C* polimorfizminin DPD enzimi üzerine etkisi henüz bilinmemektedir.

DPYD 299-302delTCAT (rs72549309 veya rs539032572) Polimorfizmi

299-302delTCAT polimorfizmi (bazı kaynaklarda c.295_298delTCAT veya *DPYD* *7 olarak geçmektedir) ilk defa Vreken ve arkadaşlarına ait çalışmada delTCAT₂₉₆₋₂₉₉ olarak literatüre girmiş olup 4 baz çiftlik delesyona sebep olur (Vreken ve ark., 1997). 299-302delTCAT varyasyonu çerçeve kayması mutasyonuna sebep olarak DPD fonksiyon kaybına sebep olmaktadır. 299-302delTCAT varyasyonu hem DPWG'de hem de Klinik Farmakogenetik Uygulama Konsorsiyum'u (CPIG) kılavuzunda fonksiyon kaybına sebep olan varyantlar arasında yer alır ancak her iki kılavuzda da hakkında yeterli sayıda çalışma olmadığından diğer fonksiyon kaybı varyantlarından farklı ele alınmaktadır (Lunenburg ve ark., 2020; Amstutz ve ark., 2018; CPIC, 2020).

DPYD 496A>G (rs2297595) Polimorfizmi

van Kuilenburg ve arkadaşları tarafından tanımlanan 496A>G polimorfizmi, ekzon 6 üzerinde yer alır ve Met166Val değişimine yol açar (van Kuilenburg ve ark., 2000). 496A>G *DPYD* varyantları arasında en çok çalışılan polimorfizmlerden biri olmasına rağmen DPD ve ilaç cevabı üzerindeki etkisi tam olarak belirlenememiştir. DPWG kılavuzunda DPD yapısında değişikliğe neden olmayan tam fonksiyona sebep olan polimorfizm olarak kabul edilmekle birlikte bu şekilde değerlendirilmesi için yeterli derecede kanıt bulunmadığı da belirtilmektedir (Lunenburg ve ark., 2020). Literatürde 496A>G polimorfizminin özellikle ilaç cevabı üzerine olan etkisi açısından sonuçları

birbiri ile çelişen sonuçlar bulunmaktadır (Del Re ve ark., 2019; Falvella ve ark., 2015; Gentile ve ark., 2016; Pellicer ve ark., 2017) ve işlevinin tam olarak ortaya çıkması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

DPYD 775A>G (rs45589337) Polimorfizmi

Ekzon 8 üzerinde yer alan *DPYD* 775A>G polimorfizmi, Lys259Glu değişikliğine sebep olur. 775A>G polimorfizminin bulunduğu bölge, DPD'nin flavin adenin dinükleotide (FAD)'a bağlanma bölgesi II'ye yakın bölümündeki yüksek oranda korunmuş bir ilmeğin parçasıdır (Gross ve ark., 2003). *DPYD* 775A>G DPD aktivitesinde dikkate değer bir azalmaya yol açmaz ve CPIG kılavuzuna göre normal fonksiyonlu allel olarak kabul edilmektedir (CPIC, 2020). Ancak sınırlı sayıda çalışmaya dahil edilen bu varyasyonun 5-FU kaynaklı bazı yan etkilerle ilişkili olabileceğine dair sonuçlar da mevcuttur (Kleibl ve ark., 2009).

DPYD *4 (rs1801158) Polimorfizmi

534. kodonda serin-asparagin değişikliğine sebep olan 1601G>A polimorfizmi, Ridge ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olup düşük DPD aktivitesi ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Ridge ve ark., 1998). Ekzon 13 üzerinde bulunan bu varyasyon CPIG kılavuzunda DPD aktivitesinde etkisi olmayan normal fonksiyon gösteren allel olarak kabul edilmiştir (CPIG, 2020). DPWG'de ise bu varyant için öngörülen bir DPD enzim aktivitesini ve ciddi floropirimidin toksisitesini ilişkilendirmek için yeterli kanıt olmadığı rapor edilmiştir (Lunenburg ve ark., 2020). Ancak literatürde 5-FU toksisitesi ile 1601G>A polimorfizmi arasında pozitif korelasyon bildiren çalışmalar da mevcuttur (Loganayagam ve ark., 2013).

DPYD 1587T>C (rs140125782) Polimorfizmi

DPYD 1587T>C polimorfizmi amino asit değişikliğine sebep olmayan sinonim bir varyanttır (NCBI, rs140125782). Toplumlardaki görülme sıklığı çok düşük olan bu varyantın DPD aktivitesine ya da 5-FU kaynaklı toksisiteye olan etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

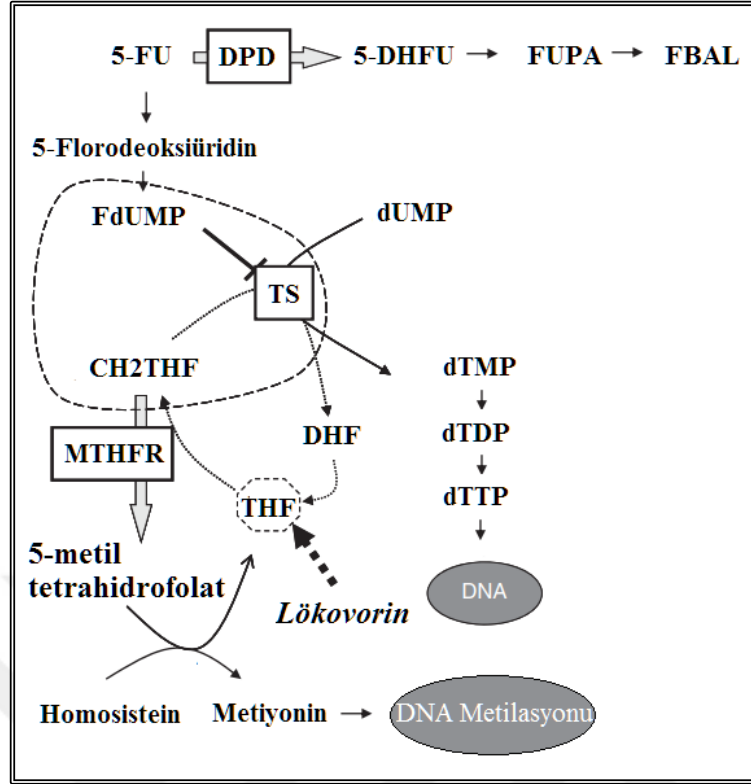
1.8.2. Metilentetrahidrofolat Redüktaz

5-FU'nun aktif metaboliti olan FdUMP, CH₂THF varlığında timin sentezinden sorumlu TYMS'ye kovalent bağlarla bağlanarak DNA sentezini baskılayan bir kompleks oluşturur (Santi ve ark., 1974). Bu üçlü kompleksin stabilitesi, ortamdaki CH₂THF konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve optimal etki için hücre içi CH₂THF seviyelerinin yüksek olması gerekmektedir (Danenberg ve Danenberg, 1978; Lockshin ve Danenberg, 1981).

Folat yolunun temel enzimi olan metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) hücre içi CH₂THF'nin konsantrasyonunun korunmasında görev alır (Lurje ve ark., 2008). CH₂THF, TYMS ile birlikte dUMP'nin dTMP'a dönüştürülmesinde rol alır (**Şekil 1.3**) (Rosenblatt, 2001). DNA sentezi ve nükleotid dengesinin korunması için dTMP gerekli olduğundan MTHFR DNA sentezi ve onarımında önemli bir rol oynar (Goyette ve ark., 1994). Nitekim diyet yoluyla alınan folat ve MTHFR aktivitesinin eksikliğinin bağırsak tümörlerinin oluşumunu uyarması arasındaki bağlantıyı özetlemektedir (Knock ve ark., 2006).

MTHFR aynı zamanda CH₂THF'yi (geri dönüşümsüz olarak), homosisteinin metiyonine dönüşümü için gerekli olan, 5-metil tetrahidrofolata çevirip DNA metilasyonunda metil donörü olarak kullanılan S adenosil metiyoninin oluşmasına yardımcı olarak DNA metilasyon paternlerinin korunmasında görev alır (Goyette ve ark., 1994; Frosst ve ark., 1995; Lurje ve ark., 2008).

MTHFR geni 1p36.3'te lokalizedir (Goyette ve ark., 1994). *MTHFR* geni içinde bulunan varyant bölgeler enzim aktivitesini etkileyerek hücre içi folat dağılımı üzerinden ile 5-FU ilaç cevabını değiştirebilir (De Mattia ve Toffoli, 2009). Birçok çalışma 5-FU temelli kemoterapideki tümör yanıtı ile *MTHFR* polimorfizmleri arasında ilişki olduğunu bildirmiştir (Lee ve ark., 2013; Glimelius ve ark., 2011; Derwinger ve ark., 2009; Nahid ve ark., 2018). MTHFR aktivitesi, 5-FU tedavisinde aktif metabolit olan FdUMP'nin metil gruplarını geri dönüştüren ve metiyonini sentezleyen folat yolunda görev alan DHF'nin CH₂THF'ye dönüşümünü bloke etmesi sebebi ile de önemlidir (Thorn ve ark., 2011).



Şekil 1.3: Metilentetrahidrofolat redüktazın DNA sentezi ve metilasyondaki rolü (Thomas ve ark., 2011)

1.8.2.1.MTHFR Gen Polimorfizmleri

***MTHFR* 677C>T (rs1801133) Polimorfizmi**

MTHFR C677T (rs1801133) polimorfizmi, ekzon 4'te yer alır ve oldukça korunmuş olan kodon 222'deki alaninin yerine valin geçmesine sebep olur (Guenther ve ark., 1999). Bu bölgedeki polimorfik değişimler *MTHFR* enziminin aktivitesini azaltır ve CH_2THF birikimine yol açar. Biriken fazla CH_2THF , *TYMS*'yi dolayısı ile DNA sentezini inhibe eden 5-FU-*TYMS*- CH_2THF üçlü kompleksinin stabilitesini artırır ve anti-tümör etkilerini kolaylaştırır (Cohen ve ark., 2003; Sohn ve ark., 2004; Toffoli ve ark., 2008). Bu polimorfizm proteinde kofaktörün bağlanma noktası olan katalitik domaini etkiler. Oluşan bu etki sonucunda enzimin termolabilitesi artar, aktivitesi azalır ve plazmadaki homosistein miktarı artarken folat miktarı azalır (Bagley ve Selhub, 1998; Robien ve Ulrich, 2003).

MTHFR 677TT genotipine sahip hastalar normal enzim aktivitesinin %30'una sahipken, CT genotip taşıyıcıları normal enzim aktivitesinin yaklaşık %60'ına sahiptir, bu nedenle ortamda CH_2THF biriktirmesi gerçekleşir ve DNA sentezinin inhibisyonundan sorumlu 3'lü kompleksin stabilitesi ve 5-FU etkinliği artar (Santi ve ark., 1974). Homozigot CC genotipi, 5-metil-THF birikmesine yol açarak timidilat ve pürin sentezinde azalmaya sebep olur. DNA sentezinde CH_2THF 'nin mevcut olması, urasilin DNA'ya yanlış bağlanmasını azaltmaktadır. Urasilin DNA'ya yanlış bağlanması urasil eksizyon onarım işlemleri sırasında kromozomal anormallikler ve kararsızlık riskini artıran çift iplik kırıkları ile sonuçlanmaktadır (Frost ve ark.,1995).

***MTHFR* 1298A>C (rs1801131) Polimorfizmi**

Metilentetrahidrofolat redüktaz geninin 7. ekzonu üzerindeki 1298A>C noktasında meydana gelen bu varyasyon 429. kodonda glutamin yerine alanin amino asidi geçmesi ile sonuçlanır (Weisberg ve ark., 1998; van der Put ve ark., 1998). Bu varyasyonun enzimin C-terminal ucundaki adenosilmetiyonin düzenleyici alanını etkileyerek enzim aktivitesinde %40'lık azalmaya neden olur. Bununla birlikte *MTHFR* A1298C varyantının termolabil enzim oluşumuna ya da plazma homosistein değişikliklerine neden olmadığı bildirilmiştir (Weisberg ve ark., 2001).

1.8.3. Timidilat Sentaz

Timidilat sentaz geni 18p11.32 kromozomuna lokalizedir. TYMS, de novo pirimidin sentezinde, hücre proliferasyonunda ve hücrenin hayatta kalmasında rol oynayan önemli bir enzimdir (Hori ve ark., 1990). TYMS, DNA sentezi için gerekli olan dUMP'nin dTMP'ye dönüştürülmesinden ve DNA metilasyonunda işlevsel olan CH_2THF 'nin DHF'ye dönüşümünden sorumludur (Hardy ve ark., 1987).

Floropirimidinler TYMS'yi baskılama özellikleri sebebi ile dTMP yetersizliğine ve dolayısı ile DNA hasarı, kromozom anormallikleri ve apoptoza yol açar (Chen ve ark., 2017). Kanserli dokularda düşük TYMS miktarının floropirimidin etkinliğini arttırdığı bilinmektedir (Leichman ve ark., 1997). Dolayısı ile 5-FU'nun aktif metabolitinin birincil hedefi olması nedeniyle TYMS genindeki enzim aktivitesini etkileyen bazı gen varyasyonları 5-FU tedavisini etkilemekle birlikte klinik sonuçlara dair mevcut veriler

birbiri ile çelişmektedir (Lima ve ark., 2013; Mandola ve ark., 2004; Nie ve ark., 2019; Pérez ve ark., 2010).

TYMS 1494/del TTAAAG 6bp (rs11280056) Polimorfizmi

6 baz çiftlik delesyona sebep olan *TYMS* 1494/del TTAAAG polimorfizmi Ulrich ve çalışma arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Ulrich ve ark., 2000). Daha sonraki yıllarda yapılan bir in vitro çalışma bu varyasyonun *TYMS* gen anlatımını düşürdüğünü ortaya koymuştur (Mandola ve ark., 2004).

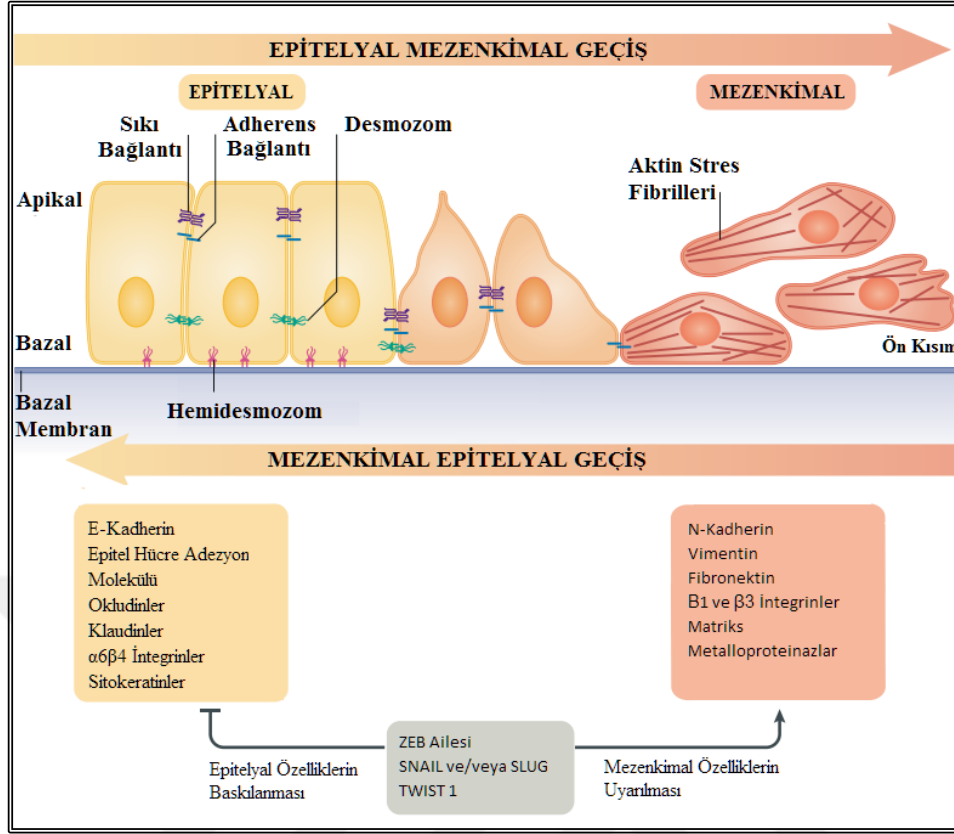
1.9.Epitelial-Mezenkimal Geçiş

Kanser hastalarında gözlenen mortalitenin yaklaşık %90'ından sorumlu olan metastaz sürecinde, kanser hücreleri orijinal dokularından ayrılarak uzak doku ve organlara yerleşirler (Gupta ve ark., 2006; Nguyen ve ark., 2009). Kanser hücrelerinin metastatik süreçleri tamamlayabilmesi için öncelikle bazal ve ekstrasellüler membrandan ayrılabilme yeteneği kazanıp, anoikis olarak bilinen bir tür programlanmış hücre ölümünün üstesinden gelmeleri gerekir (Kim ve ark., 2012). Kanser hücrelerinin epitelial-mezenşimal geçiş (EMG) yolu ile anoikisi aşabildikleri bilinmektedir.

Epitelial-mezenşimal geçiş, kanser gelişimi sırasında ortaya çıkan, epitel hücrelerinin fibroblastik özellikler kazandığı, geri dönüşümlü ve dinamik bir süreçtir (Yang ve ark., 2020; Dongre ve Weinberg, 2019) (**Şekil 1.4**). Yara iyileşmesi ve embriyonik dönemde gelişimin normal akışı olarak meydana gelen (Kalluri ve Weinberg, 2010; Nakaya ve Sheng, 2008; Nakaya ve Sheng, 2009; López-Novoa ve Nieto, 2009) EMG sayesinde kanser hücreleri, invazyon ve metastaz geliştirebilmeleri için gerekli olan hareket kabiliyeti, invazivite ve hücre dışı matriksin bileşenlerini parçalayabilme gibi özellikler kazanırlar (Kalluri ve Weinberg, 2010; Nieto ve ark., 2016; Thiery, 2002). EMG, hücresel bağlantıların bozulması, neoplastik hücrelere özel morfolojik değişiklikler, epitelial fenotip belirteçlerinin azalacak yönde düzenlenmesi, mezenkimal belirteçlerin aşırı anlatımı, hücresel hareketlilik ve matriks metaloproteinazlarda artış gibi önemli olayları içermektedir (de Freitas Silva ve ark., 2014; de Moraes ve ark., 2019; Kalluri ve Weinberg, 2010). Epitelial-mezenkimal geçişin kanser invazivliği ve metastazdaki

rolü önemli olduğundan kanserin kötü prognozu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Behrens ve ark., 1991; Mani ve ark., 2008).

Hücrelerin fibroblast benzeri özellikler kazanması ile sonuçlanan EMG, hücre-hücre bağlantılarında rol alan E-kaderin gibi moleküllerin kaybı sonucu meydana gelebilmektedir. E-kaderin, epitelyal morfogenez sırasında adherens bağlantılarının kurulmasını düzenler ve doku bütünlüğünün korunması için oldukça önemlidir (Hay, 1995). Ayrıca E-kaderinin, tümör istilasının baskılanmasında da kilit rolü vardır (Perl ve ark., 1998). EMG sırasında tümör hücreleri E-kaderin ve diğer yapışkan moleküllerin anlatımını aşağı yönde düzenleyerek yüksek hareketlilik kazanırlar (Peinado ve ark., 2007; Yılmaz ve Christofori, 2009; Birchmeier ve ark., 1991; Hajra ve ark., 1999; Ji ve ark., 1997). Son yıllarda yapılan çalışmalar, E-kaderinin transkripsiyonunu baskılayan bazı transkripsiyon faktörlerinin varlığını ortaya koymuştur (Peinado ve ark., 2007). Snail ailesinin üyeleri olan SNAI1 ve SNAI2 embriyonik gelişim ve tümör ilerlemesi sırasında görev alan güçlü E-kaderin baskılayıcıları ve majör EMG indükleyicileri olarak karakterize edilmiştir (Barrallo-Gimeno ve Nieto, 2005; Batlle ve ark., 2000; Cano ve ark., 2000; Bolós ve ark., 2003; Nieto 2002). Snail/Slug'ın sinerjik susturulması sonucunda hücre bağlantılarında görevli β -katenin, E-kaderin ve okludin sentezinin yukarı yönde; fibronektin, vimentin ve N-kaderin gibi mezenkimal belirteçlerin ise aşağı yönde düzenlendiği, neoplastik hücre göçünün ve istilasının önemli derecede azaldığı rapor edilmiştir (Zheng ve ark., 2015).



Şekil 1.4:Tipik bir endotelyal mezenşimal geçiş sürecinin ana hatları (Dongre ve Weinberg, 2019)

Kanserlerin neden olduğu ölümlerin yaklaşık %90'ının birincil tümörlerin metastazı kaynaklı olduğu göz önünde bulundurulduğunda (Christofori, 2006), tüm metastaz sürecinde rol alan moleküler mekanizmaları anlamak ve tedavi için yeni hedefler belirlemek oldukça önem kazanmaktadır. SNAIL gibi metastatik süreçlerde rol alan genler üzerine etkili transkripsiyon faktörleri EMG sürecinin kilit düzenleyicileri ve kanser tedavisi için umut verici yeni terapötik hedefler olarak kabul edilmektedir (Banyard ve Bielenberg, 2015; Bray ve ark., 2019; Paduch, 2016).

1.9.1. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş Uyarıcı SNAIL

Çinko-parmak transkripsiyon faktörü olan SNAIL, E-kaderini kodlayan *CDH1* geni anlatımını baskılayarak EMG'de temel bir rol oynar (Thiery 2002; Mani ve ark., 2008; Vleminckx ve ark., 1991; Perl ve ark., 1998; Peinado ve ark., 2007; Batlle ve ark., 2000; Perez-Moreno ve ark., 2003). SNAIL normal gelişim sürecinde EMG'nin gerekli olduğu

aşamalar başta olmak üzere birçok embriyonik aşamada ifade edilir (Nieto 2002; Peinado ve ark., 2007). Her ne kadar *SNAIL* bir EMG indükleyicisi olarak bilinse de hücrelerin hayatta kalması, apoptoz, adezyon ve hücre döngüsü gibi çeşitli hücresel süreçlerde de rol almaktadır (Kajita ve ark., 2004; Barrallo-Gimeno ve Nieto, 2005; Vega ve ark., 2004). *SNAIL*'in bazı durumlarda siklin D2 gen anlatımının bastırılması ve p21Cip anlatımının uyarılması yoluyla bir hücre döngüsü düzenleyicisi olarak da hareket edebildiği rapor edilmiştir (Vega ve ark., 2004).

SNAIL'in E-kaderinin baskılanması, uzak organ metastazı, azalan nüksüz sağ kalım, zayıf prognoz ya da zayıf klinik cevap ile bağlantılı çeşitli karsinogenik süreçlerde görev aldığı bilinmektedir (Peinado ve ark., 2007; Cheng ve ark., 2001; Blanco ve ark., 2002; Zhou ve ark., 2004; Côme ve ark., 2006; Martin ve ark., 2005; Moody ve ark., 2005). Bununla birlikte *SNAIL*'in kolon kanserinin de içinde bulunduğu çeşitli kanser türleri üzerine etkisi yapılan birçok in vivo ve in vitro çalışma tarafından da kanıtlanmıştır (Blanco ve ark., 2002; Elloul ve ark., 2005; Rosivatz ve ark., 2002; Miyoshi ve ark., 2005; Sugimachi ve ark., 2003; Pálmer ve ark., 2004; Blechschmidt ve ark., 2008; Yang ve ark., 2007; Yuan ve ark., 2013; Côme ve ark., 2006; Moes ve ark., 2012; Pena ve ark., 2009; Olmeda ve ark., 2007a; Olmeda ve ark., 2007b).

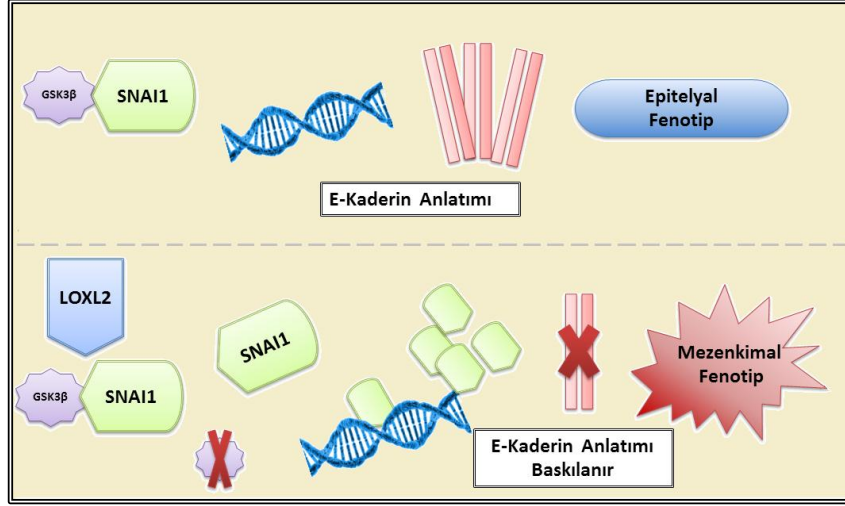
SNAIL geni *Drosophila melanogaster*'da gastrulasyonun transkripsiyonel düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Nieto, 2002). *SNAIL* geni kromozom 20q13.13 üzerinde yer alır ve 29 kDa'luk bir protein kodlar (Mauhin ve ark., 1993). *SNAIL*'in C-terminal bölgesi, spesifik DNA dizilerini tanıyan çinko parmak bölgesi içerirken, N terminal bölgeleri ise baskılayıcı aktiviteleri için kritik olan bir SNAG bölgesi taşır (Hemavathy ve ark., 2000; Nieto 2002; Peinado ve ark., 2004; Peinado ve ark., 2007). *SNAIL* geninin spesifik bölgelerinde meydana gelebilecek polimorfizmler, bu bölgelerin yapı ve işlevlerinde değişikliğe sebep olarak EMG üzerinden kanser gelişimine katkı sağlayabileceğinden, son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır. Nitekim yapılan çalışmalarda *SNAIL* geninde yer alan bazı polimorfizmlerin çeşitli kanser türlerine olan yakınlık ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2018; Wang ve ark., 2020; Yang ve ark., 2014).

***SNAIL* rs6125849 Polimorfizmi**

SNAIL geni 5907 nükleotitten oluşmaktadır. rs6125849 G>A polimorfizmi ise *SNAIL* gen bölgesinin 5' bölgesinde, 1098 nükleotid uzakta yer almaktadır (NCBI, rs6125849). RegulomeDB, NCBI ve 3DSNP gibi veri tabanlarından elde edilen verilere göre, rs6125849 varyasyonu DNAaz I'e aşırı duyarlı ve histon modifikasyonu bulunan bölgede yer almaktadır. Bu bölge ayrıca E2F6 ailesi gibi transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı bölgedir. Bu sebeple bu bölgede meydana gelen G>A değişiminin E2F6 ailesi üyelerinin bağlanma afinitesini azaltabileceği ve *SNAIL* transkripsiyonunu etkileyerek tümör gelişimini inhibe edebileceği düşünülmektedir (Wang ve ark., 2018).

1.9.2. Lisil Oksidaz Benzeri Protein 2

Lisil oksidaz benzeri protein 2 (LOXL2), hem hücre içi hem de hücre dışı fonksiyonlara sahip, C-terminalinde yüksek oranda korunmuş bir katalitik alanı olan lisil oksidaz (LOX) gen ailesinin bir üyesidir (Jourdan-Le ve ark., 1999; Barker ve ark., 2012). LOXL2'nin temel hücre dışı fonksiyonu, hücre dışı matriste yer alan kollajen ve elastinin kovalent çapraz bağlantılarını kataliz etmektir. LOXL2'nin hücre içi fonksiyonu histon kuyruklarını değiştirmek ve tümörlerin metastatik potansiyelini artıran hücre polaritesini azaltmaktır (Barker ve ark., 2011; Cuevas ve ark., 2014). Hücre içi LOXL2, Snail ve E-kaderini içine alan sinerjetik yollarla EMG'yi destekler (Peinado ve ark., 2005a) (**Şekil 1.5**). Tümör mikroçevresinde meydana gelen hipoksi tarafından indüklenen LOXL2, hücre dışında metalloproteinaz-1 (TIMP1) ve matris metalopeptidaz 9'un (MMP9) doku inhibitörünün anlatımını ve aktivitesini teşvik ederek hücre dışı matrisi; hücre içinde ise hücre iskeletini yeniden şekillendirerek ve yapışma moleküllerin birikmesini artırarak tümör istilasını ve metastazını teşvik eder (Barker ve ark., 2011; Wong ve ark., 2014).



Şekil 1.5: LOXL2'nin SNAIL üzerinden endotelial mezenkimal dönüşümdeki etkisi

EMG sürecinde LOXL2, Snail'in lizin 98 ve 137 kalıntıları oksitleyip, glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK3β) tarafından bozulmasını engelleyerek Snail'i stabilize eder ve Snail artışına sebep olarak, E-kaderin anlatımı baskılar (Peinado ve ark., 2005b; Millanes-Romero ve ark., 2015). LOXL2 aynı zamanda E-kaderin'in H3K4me3 histonunu doğrudan oksitlerken epigenetik mekanizmalar üzerinden E-kaderin anlatımının azalmasına ve hücrelerin malign transformasyonuna yol açar (Herranz ve ark., 2016). Böylelikle LOXL2, EMG'yi indükleyen transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi, FAK/Akt/mTOR sinyal yolağı ve EMG ile ilgili genlerin epigenetik düzenlenmesi gibi farklı yollarla EMG'yi teşvik eder (Millanes-Romero ve ark., 2015; Herranz ve ark., 2016; Cuevas ve ark., 2014; Deng ve ark., 2021). Buna ek olarak, LOXL2'nin hücre içi aktivitesi Snail'i de içine alan moleküler yollar aracılığıyla hipoksi ile indüklenebilir faktör 1α/vasküler endotelial büyüme faktörü (HIF-1α/VEGF) sinyal yollarının aktivitesini artıracak yönde düzenler (Fan ve ark., 2020). LOXL2 yalnızca EMG değil anjiyogenik süreçlerde de rol alarak kanserin ilerlemesini hızlandırır (Wang ve ark., 2019; Shao ve ark., 2019; Peng ve ark., 2019). LOXL2'nin farklı kanser türlerindeki işlevi ve hangi mekanizmalar aracılığı ile etki ettiği Wen ve arkadaşlarının çalışmasında ayrıntılı olarak derlenmiştir (Wen ve ark., 2020).

LOXL2'nin yer aldığı moleküler yollar aracılığıyla tümör gelişimi, EMG, anjiyogenez gibi süreçlerdeki dolayısı ile metastazdaki rolünden dolayı kanser

araştırmalarında son yıllarda giderek popüler hale gelmektedir. Nitekim gerek hücre içi gerek hücre dışı yüksek LOXL2 seviyelerinin, KRK'nında dâhil olduğu kanser türlerinde kısa sağ kalım süreleri, kötü prognoz, kemoterapi ve radyoterapi duyarlılığı ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Fan ve ark., 2020; Wu ve ark., 2016; Zhan ve ark., 2018; Torres ve ark., 2015; Tian ve ark., 2019; Choi ve ark., 2019; Barker ve ark., 2011; Park ve ark., 2017; Cui ve ark., 2018; Tanaka ve ark., 2018; Mizuno ve ark., 2016; Xie ve ark., 2019; Cebrià-Costa ve ark., 2020). KRK ve diğerk bazı kanser türlerinde artan LOXL2 seviyelerinin metastazı desteklediğı bildirilmiştir (Kato ve ark., 2020; Park ve ark., 2016; Park ve ark., 2017; Salvador ve ark., 2017; Barker ve ark., 2011). Özellikle KRK'da çoğı durumda normal kolon dokusunda bulunmayıp sadece tümör dokusunda tespit edilmesi sonrası (Martins ve ark., 2001) LOXL2, metastatik KRK hücrelerine spesifik, umut vadeden potansiyel terapötik hedef haline gelmiştir. Bu konuda hem KRK hem de diğerk kanserlerde LOXL2'nin baskılanmasına dayalı terapötik ajan çalışmaları rapor edilmiştir (Musso ve ark., 2016; Hutchinson ve ark., 2017; Leung ve ark., 2019; Smithen ve ark., 2019).

Yapılan çalışmalar LOXL2'nin gen anlatım seviyelerindeki artışın kanser invazivliğini ve malignitesini artırdığını da ortaya koymuştur. Her ne kadar LOXL2 gen anlatımı hipoksi, hücre dışı matriks sertliğı gibi farklı faktörlerin etkisinde olsa da (Wu ve ark., 2018a; Schietke ve ark., 2010) LOXL2 proteinini kodlayan gen bölgelerindeki bazı değışimlerin de LOXL2 anlatım seviyelerini değıştirebileceğı öngörülebilir. Literatürde LOXL2 geni üzerinde yer alan polimorfizmlerin tümör gelişimine etkileri ile ilgili belirgin bir veriye rastlamadığımızdan çalışmamızın bu konuda öncü olacağı düşüncesindeyiz.

İnsan LOXL2 geni, kromozom 8p21.3 üzerinde yer alır ve 774 amino asitlik uzun bir proteini kodlar (Jourdan-Le Saux ve ark., 1998). LOXL2 proteini, N-terminalinde bir sinyal peptidi ve sistein bakımından zengin bir bölge içerir ve C-terminalinde korunmuş bir LOX katalitik alanına sahiptir (Csiszar ve ark., 2001). LOXL2 geni polimorfizmlerini araştıran çalışmaların büyük çoğunluğu çok yeni olup genelde intrakraniyal anevrizma ile ilgilidir (Luo ve ark., 2021; Wu ve ark., 2018b). LOXL2 polimorfizmlerinin kansere yatkınlık, prognoz, metastaz gibi süreçler ile ilişkisini inceleyen çalışmalardan elde edilen veriler halen yetersizdir.

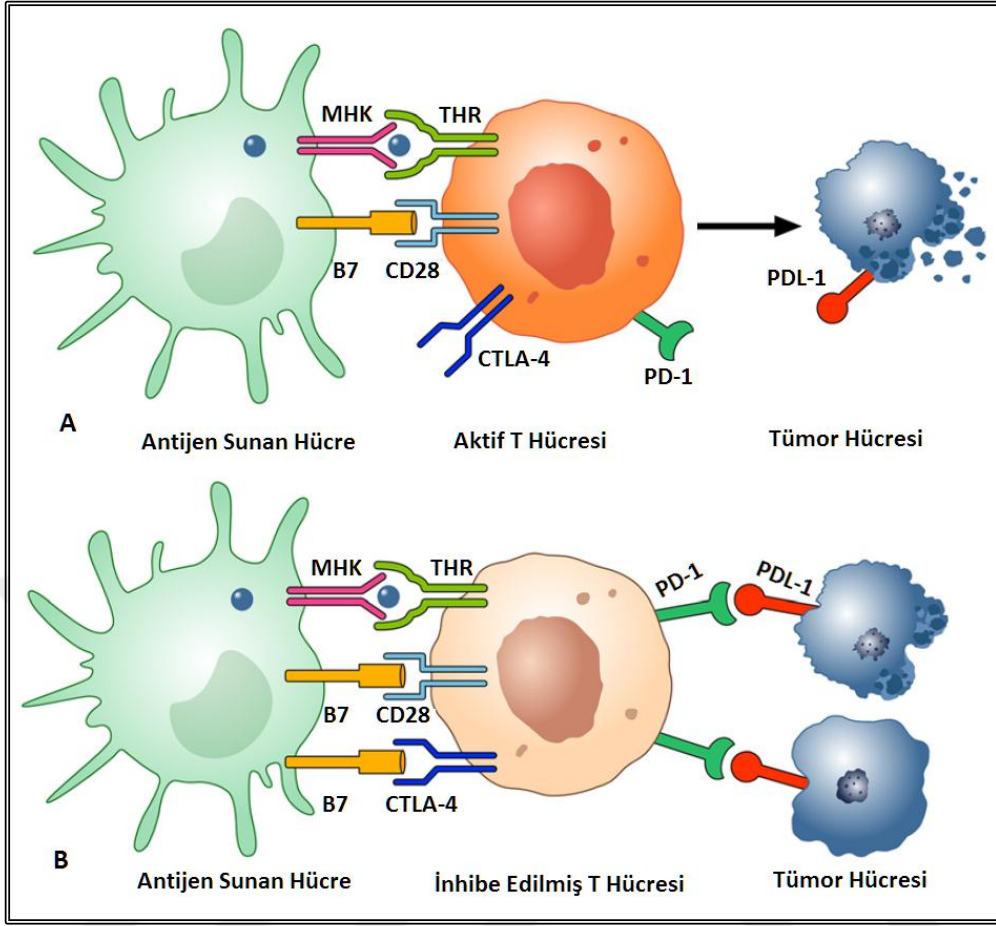
LOXL2 rs6999447 Polimorfizmi

LOXL2 rs6999447 polimorfizmi chr8:23368501 noktasındaki C>T değişimi ile karakterize intronik bir varyanttır. NCBI verilerine göre kodlama bölgesindeki ATG (Metionin) dizisinin 3' yönünde ve 149 nükleotit uzağında yer alır (NCBI, rs6999447). *LOXL2* rs6999447 varyasyonunun protein işlevi üzerindeki etkisi bilinmemektedir.

1.10. İmmün Kontrol Noktası Molekülleri

Son yıllarda yapılan çalışmalar, tümör gelişiminde bağışıklık sistemindeki mikro ortamların oldukça önemli olduğuna işaret etmektedir (Rutkowski ve ark., 2015; Peske ve ark., 2015). Normal fizyolojik koşullarda karsinogenezin başlangıç aşamasında olan bazı tümör hücreleri bağışıklık elemanları tarafından anormal hücreler olarak tanımlanarak ortadan kaldırılırlar. Pratikte, tümör hücreleri bağışıklık sistemi elemanlarından kaçabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirirler (Hanahan ve Weinberg, 2011; Kerkar ve Restifo, 2012; Poschke ve ark., 2011). Günümüzde bağışıklık sisteminden kaçışın kanser gelişiminde oldukça önemli rol oynadığı bilinmektedir (Mortezaee, 2020).

Tümör hücrelerinin konağın bağışıklık sisteminden kaçmasında ise T hücrelerinin kilit rol oynadığı dşnlmektedir (Whiteside, 2015). T hücrelerinin aktivasyonunda iki adımlı sinyal sistemi görev alır. İlk adımda antijen sunan hücrelerin (ASH) yüzeyindeki antijen kaynaklı peptit ve majör histo-uyumluluk kompleksi (MHK) ile T hücresinin yüzeyinde bulunan T hücre reseptörünün (THR) bağlanması gerekmektedir. İkinci adımda ise antijenden bağımsız olarak meydana gelen ve immün kontrol noktaları olarak bilinen CD28/B7 ailesinin reseptörleri ve ligandları tarafından sağlanan T hücresi aktivasyonunu uyarıcı veya inhibe edici ko-sinyaller gereklidir (Chen 2004; Inman ve ark., 2007). Eğer antijen-MHK kompleksi ve THR bağlanmasını takiben CD28 gibi ko-stimülatör reseptörlerin bağlanması gerçekleşmiş ise T hücreleri aktive olur, çoğalır ve spesifik antijene doğru göç etmeye başlarlar. Ancak antijen-MHK kompleksi ve THR bağlanmasını takiben bir ko-inhibitör reseptörü bağlanmış ise T hücresi aktivasyonu baskılanır (La-Beck ve ark., 2015; Kroemer ve Zitvogel, 2021) (**şekil 1.6**).



Şekil 1.6: Tümör progresyonunda immün kontrol noktası moleküllerinin T hücresi aktivasyonu ve inaktivasyonundaki fonksiyonları (Pirozzi ve ark., 2021)

T hücre aktivasyonunun ikinci adımdan sorumlu olan CD28/B7 aile üyelerindeki bir reseptör birden çok ligandı devreye sokabilirken aynı durum tam tersi durumda da geçerlidir. T hücresi aktivasyonunu uyarıcı etkiye sahip CD28 ile inhibe edici karakterdeki CTLA-4 (sitotoksik T lenfosit ile ilişkili antijen-4) aynı ligandları (B7-1 ve B7-2) paylaşabilirler (Esensten ve ark., 2016; Xiao ve Freeman, 2015). Birbirlerine homolog olan bu moleküller birbirleri ile rekabet ederek T hücrelerinin aktivasyonunu kontrol altında tutarlar (Schildberg ve ark., 2016). T hücrelerinin aktivasyonunda görev alan diğer CD28/B7 aile üyeleri Programlı Hücre Ölümü-1 (*Programmed Cell Death-1*, PD-1) ve ligandları (*Programmed Cell Death Ligand*, PDL) PDL-1 ve PDL-2'dir (Chen 2016; Starzyńska ve ark., 2020).

1.10.1. Programlı Hücre Ölümü-1

Programlı hücre ölümü-1 (*Programmed Cell Death-1*, PD-1, CD279) proteini ilk olarak 1992'de programlı hücre ölümüne uğrayan bir murin T hücresi hibridomundan izole edilmiştir (Ishida ve ark., 1992). CD28/B7 ailesine ait bir immün baskılayıcı reseptör olan PD-1, 50~55 kDa ağırlığında ve 288 amino asitten oluşan bir transmembran proteinidir (Vibhakkar ve ark., 1997; Francisco ve ark., 2010; Salmaninejad ve ark., 2018; Patsoukis ve ark., 2020). PD-1 proteininin hücre dışında kalan kısmı immünoglobulin V (IgV) benzeri bir alan ve transmembran domaininden oluşur. Hücre içi kuyruğu ise, tirozin bazlı anahtar motifi (ITSM) ve immün reseptör tirozin bazlı inhibitör motif dizilerinden oluşmaktadır (Boussiotis ve ark., 2014).

Bağıışıklık sisteminin negatif düzenleyicisi olan PD-1, timustaki TCD4⁺ ve TCD8⁺ hücreleri, B hücresi, doğal öldürücü hücreler ve TCD4⁺ ve CD8⁺ hücreleri, aktif monositler, dendritik hücreler, makrofajlar ve olgunlaşmamış Langerhans hücreleri gibi çeşitli aktive edilmiş bağışıklık hücrelerinde ifade edilir (Sharpe ve ark., 2007). PD-1 aynı zamanda antijene sürekli olarak maruz kalan T hücrelerinin yüzeyinde de ifade edilir ve bu durum tükenmiş T hücrelerinin belirteçlerinden birisidir (Ahmadzadeh ve ark., 2009).

PD-1, periferik toleransın korunmasında önemli bir rol oynar (Boussiotis 2016). PD-1'in PDL-1 veya PDL-2 ile bağlanması PD-1'in immün reseptör tirozin bazlı inhibitör motifini (ITIM) aktive eder ve tirozin fosfataz içeren src homolog-2 bölgesini güçlendirir (Okazaki ve ark., 2001; Latchman ve ark., 2001). Sonrasında ise T lenfositlerin aktivasyonunu ve çoğalmasını zayıflatan, sitokin salgılanmasını baskılayan, T lenfosit apoptozunu uyaran ve periferik toleransı koruyan fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ve protein kinaz B (AKT) aktivasyonunu baskılar (Latchman ve ark., 2001; Francisco ve ark., 2010; Parry ve ark., 2005; Toor ve ark., 2020). Böylelikle T hücrelerinin aktivasyonu baskılanarak immünolojik denge sağlanmış olur (Berger ve Pu 2018). T hücreleri etkinleştirildiğinde, PDL-1 ifadesi artar. T hücresi aktivasyonunu takiben, PD-1/PDL etkileşimleri, T-hücresi çoğalmasını ve sitokin üretimini kendi içerisinde sınırlar (Topalian, Drake ve Pardoll, 2012).

PD-1'in immün sistem üzerine birbiri ile çelişen yararlı ve zararlı iki farklı etkisi mevcuttur. Normal koşullar altında PD-1/PDL yolağı, uyarıcı ve inhibitör sinyaller arasındaki dengeyi düzenleyerek başarılı koruyucu bağışıklık tepkilerine, T hücresi homeostazının korunmasına ve iç toleransın sürdürülebilirliğine yardımcı olur (Zamani ve ark., 2016; Salmaninejad ve ark., 2019). Ancak bazı kanser hücreleri PD-1/PDL yolağı aracılığı ile normal anti-tümör bağışıklık tepkilerini sınırlayarak bağışıklık sisteminin gözetiminden kaçabilirler (Blank ve ark., 2005). Tümör hücreleri, konağın bağışıklık gözetiminden kaçmak için T hücrelerinin inaktivasyonuna zemin hazırlayan PD-1 reseptörlerine bağlanmaları amacı ile uyarlanabilir ve dirençli yapıda olan PDL'leri kullanırlar (Redd ve ark., 2018). PD-1 sinyal yolağının tümör bağışıklığına aracılık ettiğine dair ilk kanıt 2002'de kaydedilmiştir (Iwai ve ark., 2002). Daha sonra PDL-1'in aşırı ifadesinin T hücrelerinin sitolitik aktivitesini bozduğu, tümör oluşumunu ve tümör invazivliğini önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Rodig ve ark., 2003).

Ancak sonraki yıllarda kanser gelişiminde T hücre aktivitesini ve çoğalmasını azaltan PD-1 ve ligand bağlantılarının baskılanmasının, T hücrelerinin aktivasyonlarının ve anti-tümör cevabının önemli ölçüde artmasına yol açtığı da ortaya konulmuştur (Brahmer ve ark., 2012). Tümör gelişiminde hastaların kendilerine özel bir anti-tümör immün tepkisinin var olduğu rapor edilmiştir (Pardoll ve ark., 2012). 2018 yılında ise Nobel Fizyoloji Ödülü, PD-1 ve CTLA-4 ile bağışıklık düzenlemesinin başarılı bir anti-kanser terapötik yaklaşım olduğunu keşfettikleri için Tasuku Honjo ve James P.Allison'a verildi (Ballas 2018). James P.Allison ve Tasuku Honjo bağışıklık kontrol noktası moleküllerini baskılayarak kanser immünoterapisini keşfetmişlerdir. İmmün kontrol noktasını hedef alan benzer tedavi süreçleri kanser hücreleri üzerine doğrudan etki etmek yerine endojen anti-tümör aktivitesini yeniden geliştirmek için konağın bağışıklık sisteminin gücünü kullanarak fonksiyon görür (Marin-Acevedo ve ark., 2018).

Günümüzde otoimmün ve bulaşıcı hastalıkların yanı sıra PD-1, PDL-1 veya PDL-2 seviyelerinin tümör prognozu ve hayatta kalım süreleri ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (Bian ve ark., 2019; Nakano ve ark., 2019). Fonksiyonel gen polimorfizmlerinin mRNA ve protein seviyelerini ve fonksiyonlarını etkileyebileceği bilindiğinden (Zou ve ark., 2018), PD-1'in kanser immünolojisindeki immün baskılayıcı ve anti-tümör fonksiyonları da dikkate alındığında, *PD-1* gen polimorfizmlerinin kanser

riski, gelişimi ve prognozu ile önemli derece ilişkili olabileceği kaçınılmaz bir gerçektir. Yapılan araştırmalar *PD-1* geni üzerinde yer alan bazı polimorfizmlerin kolon, mide, yemek borusu, meme ve karaciğer dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin gelişimi ve prognozu ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir (Salmaninejad ve ark., 2018; Qiu ve ark., 2014; Savabkar ve ark., 2013; Wagner ve ark., 2021). *PD-1*'i kodlayan *PDCD1* (*Programmed cell death protein 1*) geni 2. kromozom üzerinde yer almaktadır (2q37.3) (McPherson ve ark., 2014) ve *PDCD1* geni üzerinde yer alan çok sayıda polimorfizm tanımlanmıştır.

1.10.1.1. *PD-1* Gen Polimorfizmleri

***PD-1* rs2227981 Polimorfizmi**

rs2227981 polimorfizmi *PD-1.5* şeklinde de ifade edilmektedir. Ekzon 5'te (+7785 A>C) meydana gelen *PD-1.5* varyasyonu, proteinin nihai aminoasit diziliminde bir değişikliğe yol açmayan sessiz bir mutasyona (Ala/Ala) sebep olmasına rağmen, farklı kanser türleri ile yapılan çalışmalar *PD-1.5* polimorfizminin kanser riski ile ilişki olduğunu göstermiştir (Savabkar ve ark., 2013; Mojtahedi ve ark., 2012; Hua ve ark., 2011). Sessiz bir mutasyona yol açmasına rağmen *PD-1.5* ve kanser riski arasındaki ilişkiye dair tespit edilen bulgular, muhtemelen *PD-1* gen anlatım seviyesini değiştirmeye yol açabilecek diğer bir *PD-1* varyasyonu ile *PD-1.5* arasındaki bağlantı dengesizliğinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Salmaninejad ve ark., 2018).

***PD-1* rs2227982 Polimorfizmi**

PD-1.9 olarak da ifade edilen ve 5. ekzonda meydana gelen rs2227982 varyasyonu (+7625G>A) aminoasit diziliminde alanin yerine valin amino asidinin gelmesiyle sonuçlandığından protein yapısında ve fonksiyonunda değişimler meydana getirerek farklı bir fenotipe yol açar (Qiu ve ark., 2014; Liu ve ark., 2011). rs2227982 varyasyonunun transkripsiyon splayında rol aldığı da bildirilmiştir (Salmaninejad ve ark., 2018).

PD-1 rs36084323 Polimorfizmi

PD-1.1 olarak da adlandırılan rs36084323 tek nükleotid polimorfizmi *PDCD1* geninin promotör bölgesinde (–606C>T), transkripsiyon başlangıç noktasından –538 nükleotit uzaklıkta, amino asit kodlamayan bölgede yer almaktadır (Mahmoudi ve ark., 2015; De Re ve ark., 2019). Promotör bölgesinde yer alan varyasyonlar genin aktivasyonu ve transkripsiyonun baskılanması ile ilgili olabileceğinden (Liu ve ark., 2014; Zamani ve ark. 2015), PD-1.1 polimorfizmi kanser riski ve progresyonu ile yakından ilişkilidir.

PD-1 rs7421861 Polimorfizmi

PD-1.7 olarak da bilinen rs7421861 polimorfizmi çok sayıda düzenleyici ve splaying kontrol elemanların bulunduğu intron 1’de yer almaktadır (Majewski ve Ott, 2002; Gazave ve ark., 2007). PD-1.7 polimorfizminin splay bölgesinde bozulmaya, translasyonel baskılamaya veya mRNA’nın ikincil yapısının modifikasyonuna neden olabileceği bildirilmiştir (Tang ve ark., 2015; Baralle ve Baralle, 2005).

1.10.2. Programlı Hücre Ölümü Ligandları

PD-1’in bilinen iki ligandı bulunmakta olup bunlar B7 ailesine ait olan programlanmış hücre ölümü ligandı-1 (PDL-1, CD279 ve B7-H1) ve PDL-2’dir (CD273 ve B7-DC) (Sanmamed ve Chen, 2014; Dong ve ark., 1999). PDL-1 ve PDL-2, PD-1 reseptörüne bağlanarak periferik ve merkezi immün hücre toleransının korunmasında önemli bir rol oynarlar (Boussiotis, 2016).

PDL-1, *PDCDL1* geni tarafından kodlanmakta olup 9. kromozom üzerinde p24.1’de yer almaktadır (NCBI, *PDCDL1*). PDL-1 hücre dışı bölgesinde Ig- ve IgC benzeri alanlara sahip 290 amino asitten oluşan, 33 kDa’lık glikoprotein yapıda bir tip 1 transmembran proteindir (Freeman ve ark., 2000; Chen 2016).

PDL-1 normal koşullarda PD-1’e bağlanarak bağışıklık sisteminin homeostazisinin devamlılığının sürdürülmesinde ve yangı ve/veya enflamasyon sırasında otoimmüitenin önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Dermani ve ark., 2019). PDL-1, T hücrelerindeki spesifik PD-1 reseptörlerine bağlandığında sitotoksik T hücresi aktivitesini düşürür ve normal hücreleri kollateral hasardan korur (Park ve ark., 2010).

Kanserli dokularda ise tümör mikro çevresinde PDL-1 ifade eden tümör hücrelerinden kaynaklanan PD-1/PDL-1 etkileşimi, tümör hücrelerinin immün kaçışında önemli bir role sahip olup antijene özgü ve tümör hücrelerine hedefli aktif T hücrelerinin apoptoza teşvik edilmesine yol açarak kanser gelişimini kolaylaştırır (Kashani-Sabet, 2010; Dermani ve ark., 2019).

PDL-1 hem hematopoietik hem de hematopoietik olmayan hücrelerde ifade edilmektedir (Ceeraz ve ark. 2013). Fizyolojik koşullar altında PDL-1 T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler, monositler, mezenkimal kök hücreleri, kemik iliğinden türetilmiş mast hücreleri, vasküler endotelial hücreler, keratinositler, pankreas adacığı hücrelerinin yanı sıra enflamasyon ve/veya enfeksiyon indüksiyonu olmaksızın plasenta, testis ve gözün ön odası gibi doku ve organlarda da düşük seviyelerde yapısal olarak ifade edilir (Seliger, 2019; Sun ve ark., 2018; Kythreotou ve ark., 2018). PDL-1 çoğunlukla CD4⁺ T hücrelerine spesifik sınıf 2 MHK ve kostimulatör molekülleri ifade eden makrofajlarda, B hücreleri ve dendritik hücreler gibi bağışıklık hücrelerinin ve ASH'lerin yüzeyinde ve aynı zamanda CD8⁺ T hücrelerine antijen sunan ASH'lerin yüzeyinde ifade edilir (Francisco ve ark., 2010).

PDL-1 ayrıca yaygın olarak malign tümör hücreleri tarafından da aşırı ifade edilerek immün hücrelerde olduğu gibi kendi kendine tolerans yollarını aktive ederek tümöre özgü T hücrelerinin çoğalmasını önler ve anti-tümör bağışıklığının hasarına sebep olur (Giancchetti ve ark., 2013). PDL-1'in aşırı anlatımı kolorektal kanserin de içinde bulunduğu mide ve akciğer kanseri gibi bazı kanser hücrelerinde tespit edilmiştir (Jiang ve ark., 2014; Drieser ve ark., 2013; Katsuya ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar tümör agresifliğine bağlı olarak artan ölüm riskinin, PDL-1'in yüksek seviyeleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Ceeraz ve ark., 2013; Francisco ve ark., 2010). Tümör hücrelerinde veya tümör infiltre eden lenfositlerde karşılaşılan yüksek PDL-1 seviyeleri, T hücrelerinin yorulmasına; dolayısı ile de tümörün ilerlemesini hızlandıran zayıflatılmış anti-tümör cevabına sebep olmaktadır (Witt ve ark., 2018; Zheng ve ark., 2018).

PDL-1 gen anlatımı kanser hücrelerinde 2 farklı mekanizma ile meydana gelir. Birincisi, tümör hücrelerindeki temel PDL-1 anlatımına karşılık gelen doğuştan bağışıklık direncidir. İkincisi ise bir tümöre karşı immün yanıt sırasında tümör mikro

çevresine salgılanan inflamatuvar faktörlere yanıt olarak PDL-1 anlatımına karşılık gelen indüklenebilir adaptif immün dirençtir (Kythreotou ve ark., 2018).

PD-1'in bir diğer ligandı olan ve PDL-1 (CD274) ile %60 amino asit benzerliği taşıyan PDL-2'nin (CD273) ise anlatım şekilleri farklı olup fonksiyonları ve sebep oldukları bağışıklık cevapları benzerlik göstermektedir (Salmaninejad ve ark., 2018; Lin ve ark., 2008; Rozali ve ark., 2012). PD-1'in PDL-2'ye olan afinititesi PDL-1'den üç kat daha yüksektir ancak PDL-1 daha fazla hücre tipinde ifade edilir. PDL-2 makrofajlarda, bazı mast hücrelerinde, dendritik hücrelerde ve B hücrelerinin bazı alt kümelerinde ifade edilir (Momtaz & Postow, 2014).

1.10.2.1. PDL-1 Gen Polimorfizmleri

PDL-1 rs10815225 Polimorfizmi

rs10815225 (-62G>C) polimorfizmi *PDCDL1* geninin promotör bölgesinde, Sp1 transkripsiyon faktörünün bağlanma sekansı üzerinde yer almaktadır (Abelson ve ark., 2007; Tao ve ark., 2017). Yapılan bir çalışmada SP1 transkripsiyon faktörünün rs10815225 G alelline, C alellinden daha yüksek afinite ile bağlandığı; aynı zamanda PDL-1 mRNA ifadesinin rs10815225 G/G homozigot mide kanseri hastalarında G/C genotipine sahip hastalara kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Tao ve ark., 2017). Dolayısı ile SP1 transkripsiyon faktörünün artan afinitesi daha yüksek PDL-1 mRNA seviyeleri ile sonuçlandığından rs10815225 G alleli mide kanseri ve immün kaçış ile ilişkili bulunmuştur (Tao ve ark., 2017). Ancak bu veriler ile çelişen veriler de mevcut (Wang ve ark., 2017) olup rs10815225 polimorfizminin fonksiyonu, tümör gelişimi ve progresyonu üzerine olan etkisi tam olarak aydınlatılmamıştır.

PDL-1 rs2282055 Polimorfizmi

PDCDL1 geni üzerinde yer alan bir diğer varyasyon olan rs2282055 (-382T>G) polimorfizmi intron 1 içerisinde yer almaktadır (O'Doherty ve ark., 2009). Hakkında az çalışma bulunan bu gen bölgesinin PDL-1 gen anlatımı ve kanser prognozu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Refae ve ark., 2020; Nomizo ve ark., 2017).

PDL-1 rs2297136 Polimorfizmi

PDL-1 rs2297136 polimorfizmi 3' UTR bölgesinde spesifik miRNA bağlanma dizisi üzerinde yer almaktadır (Du ve ark., 2017; Machado-Rugolo, 2021). miRNA'ların bağlanma fonksiyonunu etkilediği varsayılan bu polimorfizmin bağlanma kinetikleri üzerinden *PDL-1* anlatım seviyelerini değiştirdiği bildirilmiştir (Wu ve ark., 2019; Xie ve ark., 2018; Lee ve ark., 2016b). Sınırlı sayıda çalışma rapor edilmiş olan rs2297136 polimorfizmi, iyi huylu varyant kategorisinde sınıflandırılmıştır (Machado-Rugolo, 2021).

PDL-1 rs822336 Polimorfizmi

PCDL1 geni rs822336 –1813G>C polimorfizmi promotör bölgesinde transkripsiyon faktörlerinin bağlanma dizileri üzerinde yer almaktadır (Wu ve ark., 2019). rs822336 C alleli G allele'ne kıyasla azalan promotör aktivitesine yol açmaktadır (Lee ve ark., 2017a). Ancak rs822336 genotiplerinin *PDL-1*'in gen anlatımına etkileri ile ilgili literatürde farklı sonuçlar bulunmakta olup, bu noktadaki varyasyonun fonksiyonu henüz tam anlamı ile aydınlatılamamıştır (Lee ve ark., 2017; Grenda ve ark., 2021a; Grenda ve ark., 2021b; Yeo ve ark., 2017; Wu ve ark., 2019).

1.11. Anjiyogenez ve Kanser Gelişimindeki Önemi

EMG süreci ile birlikte primer tümör bölesindeki kanser hücrelerinde delaminasyon ve çevre dokulara saldırı başlar. Kontrolsüz bir şekilde çoğalan kanser hücreleri artan sayılarından dolayı yeterli besin ve oksijen alamazlar ve bu olumsuz durumun üstesinden anjiyogenez ile gelirler.

Anjiyogenez, var olan damar sistemlerinden yeni kılcal kan damarlarının oluşmasını sağlayan, vücutta üretilen lokal veya sistemik kimyasal sinyaller tarafından kontrol edilen, çok adımlı biyolojik bir süreçtir (Hanahan ve Folkman, 1996; Carmeliet, 2000; Risau, 1997). Anjiyogeneze çeşitli hücre tipleri, çözünür anjiyojenik faktörler ve ekstrasellüler matriks bileşenleri gibi farklı biyolojik bileşenler dahil olmaktadır.

Tipik bir anjiyogenik süreçte, öncelikle endotel hücrelerinin anjiyogenik uyaranlar tarafından aktivasyonlarını takiben bazal membran glikoproteinlerinin ve kan

damarlarını çevreleyen ekstraselüler matriksin diğer bileşenlerinin bozulmasını sağlayan proteazların üretimi ve aktivasyonu gerçekleşir. Daha sonra matriks bileşenleri ve birbirleri ile bağlantıları kopan endotel hücreler, bulundukları ortamdan perivasküler alana göç ederek çoğalırlar. Bu noktada endotel hücreleri tüp benzeri yapılara dönüşerek vasküler tüp oluştururlar. Devamında ise yeni oluşan tüplerin anastomozu, yeni bir bazal membran sentezi, perisit ve düz kas hücrelerinin dahil olması sonrası anjiyogenik süreç tamamlanır (Fan, 1995; Koch ve Distler, 2007). Endotelial hücreler aynı zamanda kemik iliği kaynaklı dolaşımda var olan endotel progenitör hücrelerinden de kaynaklanabilir (Wang ve Hartnett, 2016).

Normal koşullarda, anjiyogeneze sadece embriyonik gelişim, dişi üreme döngüsü ve yara onarımı sırasında meydana gelir (Folkman ve Shing, 1992). Sağlıklı bir süreçte gelişim ve homeoastazın devamlılığı için gerekli olan anjiyogeneze aynı zamanda da tümör gelişiminde önemli ve temel bir süreçtir. Artan anjiyogeneze tümör büyümesi, istilası ve metastazı ile ilişkilidir (Mousa ve ark., 2014).

Tümör anjiyogenezi katı tümörlerin ilerlemesi ve metastaz için kritik olan, normal anjiyogeneze ile benzer şekilde, var olan damarlardan yeni damarların büyümesini düzenleyen süreçtir (Lugano ve ark., 2020). 1971'de Folkman, 1-2 mm³'ten büyük katı tümörlerin gelişimi ve büyümesi için anjiyogenezin gerekli olduğu hipotezini öne sürerek ilk defa anjiyogeneze sürecini ve tümör büyümesine olan katkısını açıklamıştır (Folkman, 1971). Daha sonraki yıllarda da katı tümörlerin sürekli büyüebilmelerinin neovaskülarizasyona bağlı olduğunu rapor eden çalışmalar yayınlanmıştır (Folkman, 1972; Dimova ve ark., 2014).

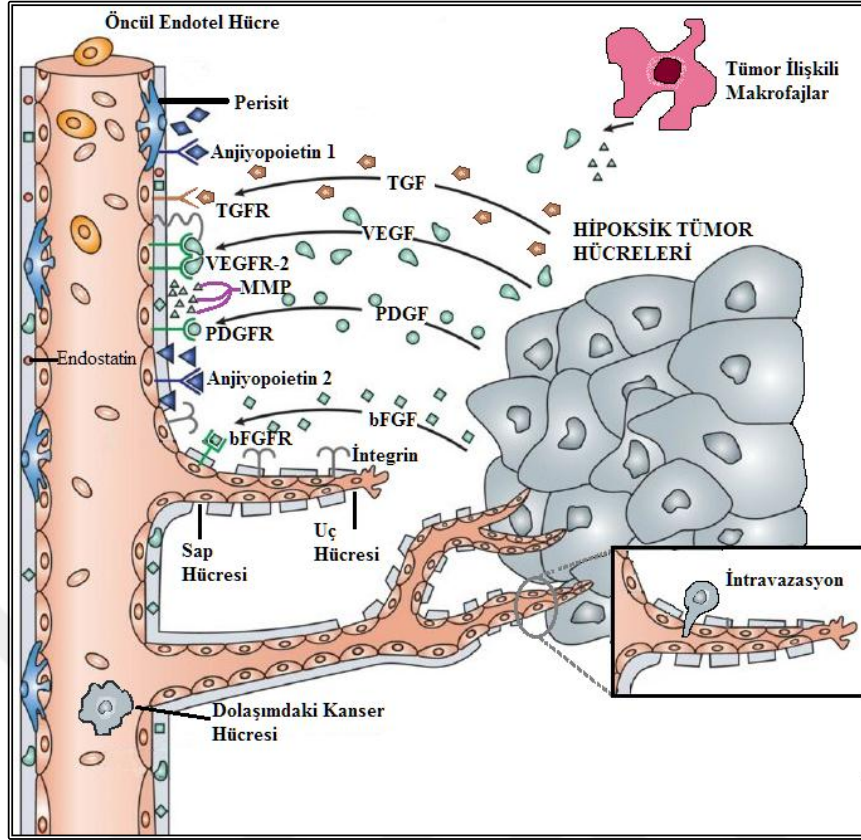
Normal anjiyogeneze süreci, pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik düzenleyicilerin etkin olduğu dinamik bir denge ile kontrol edilir. Denge bozulduğunda 'anjiyogenik anahtar' aktif hale gelerek anjiyogeneze başlatılır (Ribatti ve ark., 2007). Büyüyen kanserlerde, anti-anjiyogenik faktörlerin üretimi yetersiz kaldığında, endotel hücre büyümesini ve hareketliliğini aktive edebilen östrojen, interlökin (IL)-8, prostaglandin E1 ve E2, TNF- α ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) gibi bazı proteinlerin salınması nedeniyle endotel hücreleri kuvvetli bir şekilde aktif hale gelir (Rajabi ve Mousa, 2017; Pavlakovic ve ark., 2001) (**Şekil 1.7**). Tümör anjiyogenezi sonucu oluşan yeni damarlar, büyüyen tümörlere oksijen ve besin sağlar,

tümörün yakınındaki normal dokuya yayılmasını ve istilasını destekler ve uzak organ metastazını mümkün kılar (Folkman, 2007; Teleanu ve ark., 2020).

1.11.1. Anjiyogenezi Kontrol Eden Faktörler

Tümör anjiyogenezinde çok sayıda pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik düzenleyiciler rol almaktadır (Walti ve ark., 2013; Moschetta ve ark., 2014; Macarulla ve ark., 2020). Bu düzenleyiciler endotelial hücrelerden, tümör hücrelerinden, stromal hücrelerden, kandan veya hücre dışı matriksten salınabilirler (Eelen ve ark., 2015; Ferrara ve Adamis, 2016).

İyi bilinen pro-anjiyogenik düzenleyiciler arasında VEGF, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), dönüştürücü büyüme faktörü α ve β (TGF α ve β), epidermal büyüme faktörü (EGF), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), plasental kaynaklı büyüme faktörü (PlGF) ve anjiyopoietin 1 ve 2 yer almaktadır (**Şekil 1.7**). İyi bilinen anti-anjiyogenik düzenleyiciler ise anjiyostatin, endostatin, tumstatin, trombosit faktör-4, IL-12, trombospondin-1, metalloproteinazların doku inhibitörleri ve interferon- α , - β ve - γ 'dır (Li ve ark., 2018a). Çeşitli biyolojik aktiviteler pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengenin değişimine yol açarlar. Onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin kaybı gibi genetik mutasyonlar; hipoksi, düşük pH veya hipoglisemi gibi metabolik stres; çoğalan hücrelerin ürettiği basıncın yol açtığı mekanik stres ve immün/inflamatuvar yanıt anjiyogenezin önemli uyarıcılarıdır (Kerbel, 2000; Carmeliet, 1999).



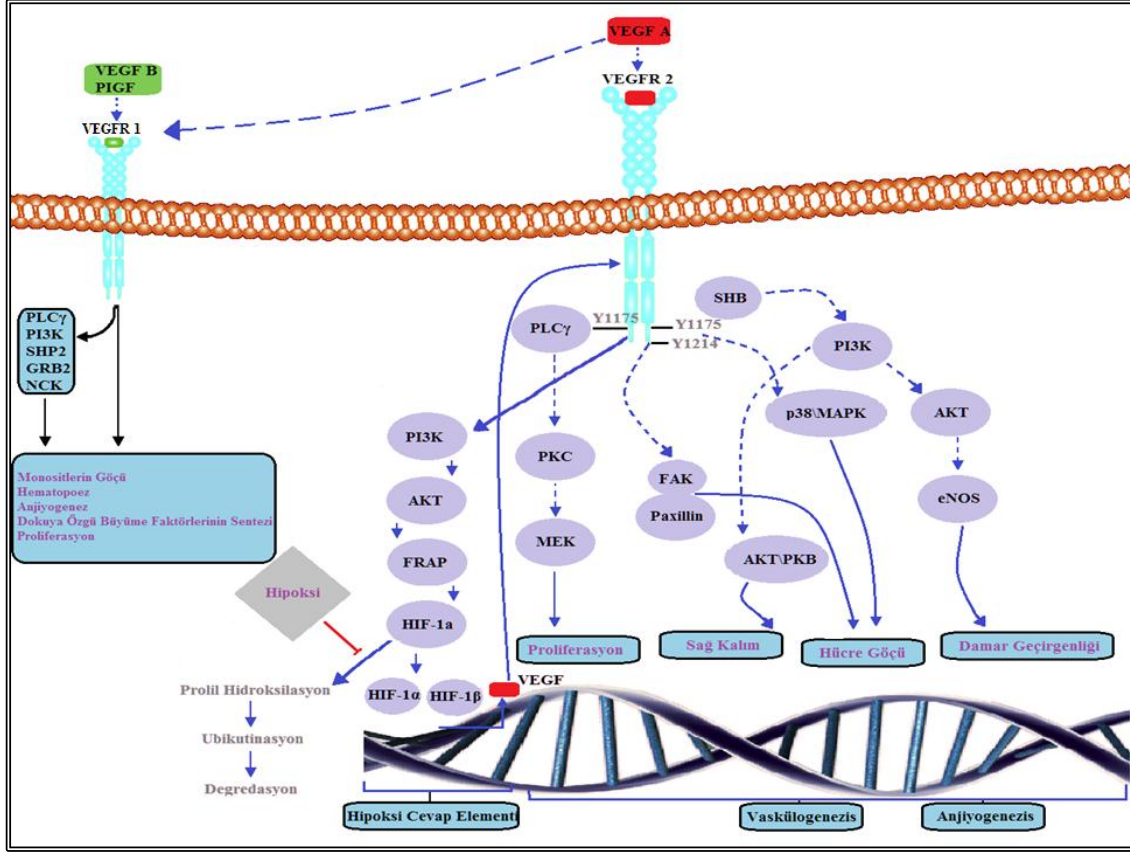
Şekil 1.7: Tümör anjiyogenezindeki temel yapılar (Folkman ve arkadaşlarının çalışması esas alınarak düzenlenmiştir (Folkman, 2007)

1.11.2. VEGF Sinyal Yolu ve VEGF-A

Anjiyogenik süreçlerde VEGF sinyalizasyon yolu kilit rol üstlenir. VEGF ailesi beş salgı proteini (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve PlGF) ve üç tirozin kinaz reseptöründen (VEGF reseptörü (VEGFR)-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3) oluşur (Macarulla ve ark., 2020; Ferrara ve ark., 2003). VEGFR-1 (Fms-benzeri tirozin kinaz-1 olarak da adlandırılır) ve VEGFR-3'ün (Fms ile ilişkili tirozin kinaz 4 olarak da adlandırılır.) KRK'da tümör progresyonu ve metastazda rol oynadığı; VEGFR-2'nin (aynı zamanda fetal karaciğer kinaz olarak da adlandırılır.) ise endotel hücrelerin hayatta kalması, çoğalması ve göçü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Khan ve ark., 2017).

VEGF sistemi içerisinde VEGF-A ligandı önemli rol oynar. Dolaşımdaki VEGF-A malign hücreler de dahil olmak üzere birçok hücre tipi tarafından salgılanır ve iki VEGF reseptörüne (VEGFR-1 ve VEGFR-2) bağlanarak endotel hücrelerin hayatta kalmasını,

çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını destekler (**Şekil 1.8**) (Hicklin ve Ellis, 2005; Dvorak, 2002). VEGFR-2, VEGF-A aracılı sinyali endotel hücrelere iletmekten birincil olarak sorumlu reseptör iken, VEGFR-1 ise daha çok düzenleyici ve engelleyici rol almaktadır (Shibuya, 2013).



Şekil 1.8: VEGF-VEGFR etkileşimlerinin moleküler yolağı (Fallah ve arkadaşlarının çalışması temel alınarak hazırlanmıştır (Fallah ve ark., 2019)

İn vitro ve in vivo çalışmalar VEGF'nin malignite ve prognozda kritik bir rol oynadığını ortaya koymuş ve yüksek VEGF seviyelerinin zayıf prognoz, kötü sağ kalım ve terapi duyarlılığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (van Cutsem ve ark., 2020; Lacin ve Yalcin 2020; Dinami ve ark., 2020; Mashima ve ark., 2021; Bendardaf ve ark., 2017; Matsumoto ve Ema, 2014; Rezzola ve ark., 2014). Farklı kanser türlerinde yapılan araştırmalarda, dokulardaki VEGF seviyelerinin sağlıklı bireylere kıyasla vakalarda yüksek olduğu bildirilmiştir (Benoit ve ark., 2015; Fu ve ark., 2015; Coskun ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda KRK, mide ve pankreas gibi farklı kanserlerde VEGF ve

VEGFR'nin prognozdaki önemi vurgulanmıştır (D'Haene ve ark., 2018; Komatsu ve ark., 2017; de GeusSWL ve ark., 2021; Li ve ark., 2018b). VEGF-A'nın KRK gelişiminde baskın bir pro-anjiyogenik faktör olduğu ve yüksek seviyelerinin metastaz oluşumu ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu da ortaya konmuştur (Ellis ve ark., 2000).

VEGF geni üzerinde yer alan birtakım varyasyonlar VEGF sinyalizasyonunu değiştirebilme potansiyeline sahip olup VEGF'nin doku ve plazmadaki seviyelerini doğrudan etkileyebilirler (O-Charoenrat 2014; Sa- Nguanraksa ve ark., 2013; Innocenti ve ark., 2018; Koukourakis ve ark., 2004). VEGF'nin aşırı ifadesinin tümör büyümesi, metastaz ve kötü prognoz ile sonuçlandığı bilindiğinden (Li ve ark., 2017a; Sopo ve ark., 2019; Frezzetti ve ark., 2017; Cheng ve ark., 2018), *VEGF* geni üzerinde yer alan varyasyonların kanser oluşumu, gelişimi, prognozu ve hatta tedavisi üzerine etkilerinin olması şaşırtıcı olmayacaktır. Nitekim farklı *VEGF* polimorfizmlerinin kolorektal, böbrek, akciğer, mide ve mesane gibi kanserlerin yatkınlığı, gelişimi ve radyoterapi hassasiyeti ile ilişkisini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Yin ve ark., 2012; Liu ve ark., 2018; Gong ve ark., 2017; Fan ve ark., 2015; Zhao ve ark., 2012).

14 kb uzunluğundaki insan *VEGF* geni, kromozom 6p21.3 üzerinde yer almakta olup yedi intron, ve alternatif uç birleştirme ile gen anlatımı yapan sekiz ekzondan oluşmaktadır (Roy ve ark., 2006; Jakubowska ve ark., 2008; Watson ve ark., 2000). Oldukça polimorfik olan *VEGF* geni üzerinde 100'den fazla tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır ve bunların çoğunluğu özellikle promotör ve 3'-UTR bölgesinde yer almaktadır (Jakubowska ve ark., 2008; Metzger ve ark., 2015).

1.11.2.1. VEGF-A Polimorfizmleri

VEGF-A rs1570360 Polimorfizmi

Promotör bölgesinde yer alan *VEGF-A* rs1570360 polimorfizmi 1154G>A değişimine sebep olmaktadır. *VEGF-A* 1154G>A polimorfizmi transkripsiyon faktörü olan aktivatör protein-1 (AP-1)'in bağlanma bölgesi üzerinde yer almakta olup promotördeki hipoksi cevabı elementlerinin etkileşimlerini değiştirir (Pagès ve Pouyssegur, 2005). 1154G>A polimorfizminin VEGF sentezini değiştirebildiğine dair sonuç rapor eden

alışmalar olsa da (Koukourakis ve ark., 2004; James ve ark., 2014), belirgin bir ilişki saptamamış çalışmalar da mevcuttur (Awata ve ark., 2001; Steffensen ve ark., 2010).

Önceki yıllarda *VEGF-A* 1154G>A polimorfizminin kanser riski, prognozu, anti-VEGF tedavisi cevabı gibi birçok süreçteki etkisi araştırılmıştır (Rahoui ve ark., 2014; Schneider ve ark., 2009; Smith ve ark., 2004; Howell ve ark., 2002; Koutras ve ark., 2015). Ancak bu araştırmaların sonuçları homojen olmayıp 1154G>A polimorfizminin farklı popölasyonlar ve kanser türlerindeki rolünün tamamen aydınlatılması gerekmektedir.

***VEGF-A* rs2010963 Polimorfizmi**

5' UTR bölgesi üzerinde yer alan rs2010963 polimorfizmi +405G>C (veya -634G>C) değişikliği ile sonuçlanır ve translasyon verimini etkiler (Watson ve ark., 2000). +405G>C varyasyonunun dahili ribozomal giriş bölgesi B'nin aktivitesini değiştirerek, VEGF sentezini transkripsiyon sonrası evrede etkilediği ve böylelikle translasyonun başlatılmasını güçlendirdiği düşünölmektedir (Huez ve ark., 2001). Yapılan alışmalar *VEGF-A* +405G>C polimorfizminin fenotipe olan etkisi hakkında çelişkili sonuçlar rapor etmektedir. Bazı alışmalar *VEGF-A* +405GG genotipinin tümör hücrelerinde daha düşük VEGF protein seviyelerine ve düşük anjiyogenesisiteye sebep olduğunu, C allelinin serumda artan VEGF seviyeleri ile sonuçlandığını rapor ederken (Koukourakis ve ark., 2004; Awata ve ark., 2002), GG genotipinin CC genotipine kıyasla daha yüksek VEGF protein seviyelerine yol açtığını bildiren araştırma da mevcuttur (Watson ve ark., 2000). Farklı kanser türlerinde yapılan araştırmalarda ise *VEGF-A* +405G>C polimorfizminin kanser gelişimdeki rolü incelenmiştir (Lu ve ark., 2005; Kim ve ark., 2008; Zhao ve ark., 2012; Dassoulas ve ark., 2009). Ancak mevcut araştırmalardan elde edilen sonuçlar kanserin yeri, seyri, farklı genetik etkileşimler, etnisite gibi çok sayıdaki değişkenden dolayı heterojenlik göstermektedir.

***VEGF-A* rs8333061 Polimorfizmi**

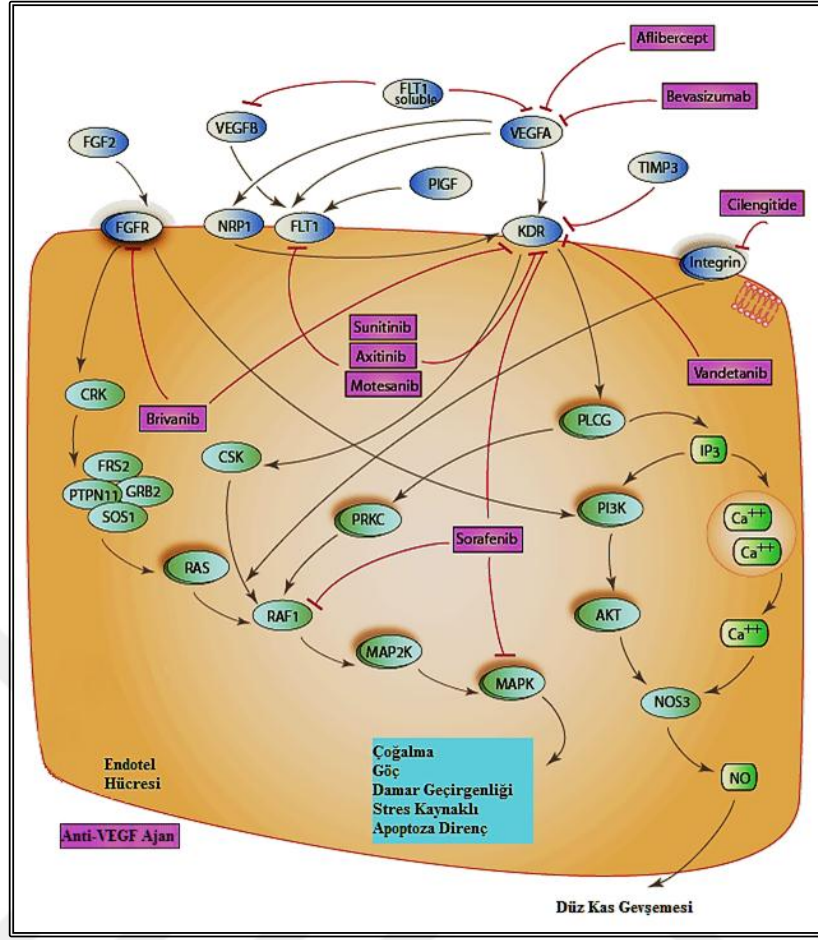
Promotör bölgesinde yer alan *VEGF-A* rs8333061 polimorfizmi -460C>T (-1498 C>T olarak da bilinir) değişimine yol açmaktadır (Watson ve ark., 2000). *VEGF-A* genine ait bu polimorfizmin serum VEGF seviyelerine olan etkisine dair farklı çalışma

gruplarında, birbiri ile örtüşmeyen farklı sonuçlar rapor edilmiştir (Al-Habboubi ve ark., 2011; Al-Habboubi ve ark., 2012; Bao ve ark., 2019; Steffensen, 2010). Benzer şekilde *VEGF-A* -460C>T polimorfizmi kanser riski ve prognozu ile ilişkili bulunsa da sonuçlar birbiri ile uyum göstermemektedir (Jannuzzi ve ark., 2015; Antonacopoulou ve ark., 2012; Maltese ve ark., 2009; Zhao ve ark., 2012; Dassoulas ve ark., 2009; Gaibar ve ark., 2021; Paré-Brunet ve ark., 2015; Cui ve ark., 2017). Bununla birlikte kolorektal tümörlerinde ise -460TT genotipinin mRNA sentezinde azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (Yamamori ve ark., 2004).

1.11.3. Anti-VEGF Terapi

Büyüyen katı tümörler yeterli kan tedariki olmadan 1-2 mm³'ten fazla büyüyemediklerinden dolayı tümör gelişiminde anjiyogenez oldukça önemlidir (Folkman, 1971). Tümör anjiyogenezinde, dolayısı ile kanser gelişimindeki kilit rolünden dolayı VEGF/VEGF-R sinyal yolağı katı tümörlerin tedavisinde yeni bir terapötik hedef olarak araştırmacıların odak noktası haline gelmiştir. VEGF sinyal yolunun hedefli baskılanmasının tümör anjiyogenezini ve büyümesini baskılama potansiyeli oldukça yüksektir.

Kanser tedavisinde son yıllarda giderek yaygınlaşan ve VEGF sinyal yolunu hedef alan anti-VEGF ajanların kullanımı, özellikle KRK'nın da içinde bulunduğu bazı kanser türlerinde olumlu sonuçlar sergilemektedir (Mountzios ve ark., 2014; Lauro ve ark., 2014; Lai ve ark., 2020; Kanat ve Ertas, 2019). Anti-anjiyogenik tedavi, endotelial ve tümör hücresi apoptozunu önemli ölçüde artırarak damarlanmayı, çoğalmayı ve büyümeyi engeller (**Şekil 1.9**) (Ellis ve ark., 2000).



Şekil 1.9: Kanser tedavisinde sıklıkla reçete edilen anti-VEGF ajanları ve temel etki mekanizmaları (PharmGKB, VEGF Sinyalizasyon Yolağı)

Rekombinant insanlaştırılmış bir IgG1 monoklonal antikoru olan bevasizumab, metastatik KRK tedavisi için onaylanan ilk anti-anjiyogenik ajandır (Hurwitz ve ark., 2004). Bevasizumab dolaşımdaki VEGF-A'ya bağlanır ve VEGF-A'nın endotel hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlerine (VEGFR-1 ve VEGFR-2) bağlanmasını bloke ederek tümör anjiyogenezi, büyümesi ve metastazın baskılanmasına yol açar (Gerber ve Ferrara, 2005). Bevasizumab metastatik KRK, metastatik meme kanseri, ileri yumurtalık kanseri gibi birçok agresif kanser türlerinin tedavisinde monoterapi veya kemoterapi ile kombinasyon halinde ve çeşitli dozaj rejimlerinde kullanılmaktadır (EMA; FDA; Catena ve ark., 2010). Yapılan araştırmalar monoterapi olarak 5-FU ile kombine edildiğinde (Baraniskin ve ark., 2019) veya birinci basamak tedaviden sonra kemoterapi ile kombine edildiğinde (bevasizumab hali hazırda birinci basamak

tedavinin bir parçası olsa bile) bevasizumabın metastatik kolon kanseri tedavisindeki etkinliğini ortaya koymuştur (Masi ve ark., 2015; Pfeiffer ve ark., 2020). Tek başına kemoterapiye kıyasla kemoterapi+bevasizumab ile tedavi edilen metastatik KRK hastalarında progresyonsuz sağ kalım, genel sağ kalım ve yanıt oranında olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Botrel ve ark., 2016; Ruan ve ark., 2018; Dirican ve ark., 2014; Hurwitz ve ark., 2004).

Her ne kadar klinik kullanımdaki yeri gittikçe artış gösterse de bevasizumabın etkinliği veya ilaç direnci hastalar arasında büyük ölçüde farklılık göstermektedir. Gözlenen farklı bevasizumab cevapları temelde, anjiyogeneze doğrudan veya dolaylı olarak yer alan proteinleri kodlayan genlerdeki varyasyonlardan kaynaklanmaktadır (Novillo ve ark., 2020). Bu varyasyonlar aynı zamanda metastatik KRK'nın etiyolojisi ve klinik sonuçları ile de ilişkilidir (Okazaki ve ark., 2016; Loupakis ve ark., 2013; Di ve ark., 2017).

Popülasyonun genetik özelliklerine göre bevasizumab cevabının verimliliği çoklu direnç mekanizmaları nedeniyle sınırlıdır. Bireylerde gözlenen farklı bevasizumab cevaplarının sebepleri altında yatan moleküler genetik mekanizmalar henüz yeterince aydınlatılamadığından dolayı, tedavinin bireyselleştirilmesine yönelik girişimler yetersiz kalmaktadır.

Metastatik KRK'nın anti-VEGF tedavisinde bevasizumab dışında farklı anti-anjiyogenik ajanlar da kullanılmaktadır. Bunlardan aflibersept, ramusirumab ve regorafenib gibi yeni ajanların metastatik KRK'nın ikinci ve üçüncü basamak tedavisinde kullanımına başlanmıştır (Kirstein ve ark., 2014). Çözünür bir tuzak reseptörü olan aflibercept (Zaltrap®) VEGF'ye (A veya B) veya PIGF'ye bağlanarak endojen reseptörlerinin aktivasyonunu önler (Ciombor ve ark., 2013). Ramusirumab (Cyramza®) ise VEGF ligandlarının bağlanmasını önlemek amacı ile VEGFR- 2'nin hücre dışı bölgesine yüksek afinite ile bağlanan bir monoklonal antikordur (Poole ve Vaidya, 2014). Diğer bir örnek Regorafenib (Stivarga®) ise, VEGFR (1, 2 ve 3), platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü b (PDGFR-b), BRAF ve p38 MAP kinaz gibi anjiyogeneze ile ilişkili birçok kinazın inhibisyonuna neden olan bir anti-anjiyogenik multikinaz inhibitörüdür (Wilhelm ve ark., 2011). Bevasizumab hem birinci hem de sonraki tedavi basamaklarında kemoterapi ile kombinasyon halinde; ramusirumab ve

aflibersept, kemoterapi ile birlikte ikinci basamakta; ve son olarak regorafenib kemo-refrakter hastalığı olan hastalarda monoterapi olarak uygulanır.

1.12. Amaçlar

Her yıl dünya çapında çok sayıda insan kolorektal kansere yakalanmaktadır ve bu sayı giderek artış göstermektedir. Günümüzde kanser tedavilerindeki düşük başarı oranının temel sebeplerinin başında neoplastisiteyi ve maligniteyi tetikleyen yolakların henüz tamamının ortaya çıkarılmamış olmasının temel nedenleri; bireyler arasında gözlenen ve kemoterapi cevabında etki gösteren genetik farklılıklardır. KRK tedavisinde başarı elde edebilmek için öncelikle KRK'nın meydana gelmesinde rol oynayan farklı moleküler ve genetik etkileşimlerin tamamının anlaşılması oldukça önemlidir. Nitekim birçok araştırmacı gerek KRK etiyojisinde rol alan farklı moleküler genetik mekanizmaların aydınlatılması, gerekse tedavide yeni seçeneklerin, yeni nesil ilaçların ve ilaç hedeflerinin keşfi ile KRK tedavi başarısını arttırmayı amaçlamaktadır.

KRK tedavisinde tek başına veya farklı ilaçlar ile kombinasyon halinde fluorourasil kullanılmaktadır. Ancak güçlü sitotoksik ajan olan fluorourasillerin kullanımı öncesi ilaç metabolizmasını etkileyen ve hastaların DPD aktivitesini ortadan kaldıran ya da azaltan gen varyantlarından bağımsız olarak ilaç kullanımı şiddetli yan etkilere ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Bu sebeple çalışmamızda öncelikle kemoterapi sonrası gözlenen yan etkilerin ve ilaç cevabının 5-FU metabolizmasında rol alan *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* genlerindeki bazı polimorfik bölgeler ile ilişkilerini belirlemeyi amaçladık. Ayrıca spesifik *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* varyantlarının allel sıklıklarının tespit edilmesi ile 5-FU kaynaklı ciddi yan etkilerin ortadan kaldırılması/azaltılması için Türk toplumuna ait genetik risk haritasının oluşturulmasına temel olabilecek veriler elde etmeyi de hedefledik. Farklı toplumlarda 5-FU kullanımından doğan yan etkiler ile kişilerdeki *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* varyantlarının korelasyonu değişkenlik gösterdiğinden ülkemizdeki bu konuya dair verilerin tespit edilmesi ile literatüre de katkı sağlanmış olacaktır. Çalışmamızda aynı zamanda kemoterapide fluoropirimidinlerin yanı sıra anti-VEGF ajan kullanımının, *VEGF* geni üzerinde yer alan spesifik polimorfizmler ile ilişkilerini KRK hastalarının sağ kalım süreleri üzerinden tespit etmeyi de amaçladık.

KRK'nın meydana gelmesinde rol oynayan genetik etkileşimleri ortaya çıkarmak amacı ile karsinogenezin önemli basamaklarında görev alan bazı molekülleri kodlayan DNA bölgelerindeki spesifik genetik varyasyonların etkilerini KRK teşhisi konulmuş bireyler ile kontrol grupları arasında karşılaştırmalı olarak analiz etmeyi hedefledik. Bu sebeple EMG sürecinde görevli *SNAI1* ve *LOXL2*; bağışıklık cevabında görevli *PD-1* ve *PDL-1*; anjiyogenezde görevli *VEGF* genlerinde yer alan bazı varyasyonların ayrı ayrı veya kombinasyon halinde KRK neoplastisitesi ile olan ilişkilerinin tespit edilmesi amaçlandı. KRK oluşumunu tetikleyen genetik faktörler geniş bir spektrumda inceleneceğinden elde edilecek bulgular literatüre büyük bir katkı sağlayacaktır düşüncesindeyiz.

Primer tümör yerinin KRK'nın seyri, prognozu ve ilaç cevabı ile ilişkili olabileceği bilinmektedir. Sağ ve sol kolon kanserlerinin etiyojilerindeki farklılıkların tamamının ortaya çıkarılmasının dolaylı olarak tedavideki başarıyı artırabilir. Günümüzde sağ ve sol kolon orijinli kanserler arasındaki moleküler ve genetik farklılıklar hakkında sınırlı sayıda veri bulunmaktadır. Bu sebeple primer tümörün yerini belirleyen yeni genetik farklılıkların belirlenmesi oldukça önemlidir. Çalışmamızda *DPYD*, *MTHFR*, *TYMS*, *SNAI1*, *LOXL2*, *PD-1*, *PDL-1* ve *VEGF* genlerine ait spesifik varyasyonların primer tümör lokalizasyonuna olan etkilerinin incelenmesi de amaçlanmıştır. Çalışmamız kolorektal kanserde kişiselleştirilmiş tedavi rejimlerinde primer tümör yerinin etkisinin farkındalığını artırması açısından önem taşımaktadır.

Metastaz, kanser hastalarında gözlenen mortalitenin yaklaşık %90'ından sorumludur. Bu sebeple metastazı tetikleyen ve seyrini etkileyen mekanizmaların anlaşılması KRK sağ kalımında oldukça önemlidir. Metastatik süreç, başlangıcından sonuna kadar tümör hücrelerinin tüm kontrol mekanizmalarını aşarak hayatta kalıp çoğalabilmelerini kapsar. Malign hücrelerin orijinlendikleri bölgeden ayrılarak kan damarları aracılığıyla yeni doku veya organlara ulaşabilmeleri ve bu süreçte hayatta kalabilmeleri için bazı yeni yetenekler kazanmaları gerekmektedir. Dolayısı ile ileride kanser hücresine dönüşecek hücrelerin sahip oldukları genetik altyapı metastaz sürecini de etkileyebilir düşüncesindeyiz. Bu sebeple metastatik süreçte kilit basamaklar olan EMG, immün baskılama ve anjiyogenezde etkili *SNAI1*, *LOXL2*, *PD-1*, *PDL-1* ve *VEGF* genlerine ait varyasyonların KRK metastazı ile olan ilişkilerinin açığa çıkarılmasını amaçladık. Aynı

zamanda hem ilaç cevabı üzerinden dolayı hem de DNA sentezi üzerinden doğrudan etkisi olabileceğini düşündüğümüz için *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* polimorfizmlerinin de metastaz üzerine etkilerini belirlemeyi hedefledik. Çalışmamızın bu kısmından elde edilecek verilerin özellikle metastazın baskılanmasını hedef alan yeni terapötik hedeflerinin tespit edilmesine katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

Kanser hastalarının sağ kalım süreleri hastalığın seyrinin ve terapi cevabının gözlenmesi, müdahale seçeneklerini etkilemesi ve iyileştirilmesi açısından oldukça önemlidir. Dolayısı ile hastaların sağ kalım sürelerini belirleyen faktörlerin tespit edilmesi hastalığın seyri ile ilgili başarılı bir prognoza yol açar. Doğru bir prognoz ise tedaviden elde edilecek başarıda oldukça önemlidir. Bu sebeple *DPYD*, *MTHFR*, *TYMS*, *SNAI1*, *LOXL2*, *PD-1*, *PDL-1* ve *VEGF* genlerine ait spesifik polimorfizmlerin KRK progresyonsuz ve genel sağ kalım sürelerine olan etkilerini tespit etmeyi amaçladık. Böylelikle gerek ilaç cevabı üzerinden gerekse tümör progresyonunda görev alan mekanizmalar üzerinden KRK sağ kalımını etkileyen genetik etkileşimleri geniş bir spektrumda incelemeyi hedefledik.

Son olarak araştırmamıza dahil ettiğimiz farklı polimorfik bölgelere ait genotiplerin Türk toplumundaki dağılımlarının, KRK hastalarında ve popülasyon bazında tespit edilmesi de çalışmamızın amaçları arasında yer almaktadır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

1. DNA Kurabo *QuickGene DNA whole blood kit s*
2. *Qiagene DNAamp Mini* (Qiagen)
3. *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche)
4. *NucleoSpin Blood for QIAcube* (Macherey Nagel)
5. Proteinaz
6. Amplifikasyon Karışımı
7. Titanium Taq Polimeraz (Takara)
8. DNase içermeyen solüsyon
9. Moleküler Safılıkta Su
10. Tris/Borate/EDTA Tamponu
11. *Coriell DNA*
12. Etanol
13. Yıkama Tamponu (Autogenomics)
14. *Agena iPLEX Gold* Genotipleme Kiti (Agena Bioscience)
15. *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Agena Bioscience)
16. HPLC-grade H₂O
17. *Clean Resin*
18. İleri, Geri ve Uzama Primerleri

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

1. Kurabo *QuickGene* - Mini80
2. *Biosafety Cabinet Class II*
3. Mini santrifüj (VWR Ministar)
4. Vorteks
5. İnkübatör (Nüve)
6. Nano-volüm spektrofotometre (Meastrogen)
7. Derin Dondurucu (-20 °C)
8. Derin Dondurucu (-80 °C)
9. Buzdolabı (+4°C)
10. Plate Döndütücü (VWR)
11. *Thermal Cycler* (Biorad T100)
12. *INFINITI Plus Microarray*
13. *BioFilmChip® Magazine*
14. *Intellipac® Reagent Module*
15. *Biorad Lid*
16. EDTA'lı kan tüpleri
17. UPS
18. Serolojik Pipet
19. Soğutmalı Santrifüj (Sigma 3-18K)
20. Distile su cihazı (Elga)
21. Otoklav (Alp)
22. Qiacube (Qiagene)
23. *MassARRAY Analyzer 4* (Agena Bioscience)
24. *MassARRAY Nanodispenser* (Agena Bioscience)
25. *SpectroCHIP* (Agena Bioscience)

2.2.Yöntem

2.2.1. Çalışma Grubunun Seçimi

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan 09.2018.174 protokol numaralı izin ile yapılmıştır. Vakalar İstanbul Bilim Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Bölümü; kontroller ise aynı hastanenin farklı bölümlerine başvuran gönüllü bireylerden seçilmiştir. Vakalar, inflamatuvar barsak hastalığı veya herhangi bir kalıtsal kanser öyküsü olmayan, histolojik olarak doğrulanmış kolorektal adenokarsinom hastalarından seçildi. Kontroller ise örnekleme periyodu sırasında hastaneyi ziyaret eden, KRK ya da herhangi bir kanser veya otoimmün bozukluk öyküsü olmayan gönüllülerden seçildi.

Hem vaka hem de kontrol grubundaki gönüllülere gerekli bilgilendirmeler sonrası Helsinki Deklarasyonu'ndaki etik kriterlere uygun olarak hazırlanmış bir “Gönüllü Olur Formu” imzalatıldı. Onay alım işlemleri sonrasında her gönüllüden 5 ml kan örneği alındı. Tüm hastalarımıza araştırma süresince 5-florourasil (5-FU) veya kapesitabin bazlı tedaviler uygulanmıştır.

Kan örnekleri ile birlikte çalışmaya katılan gönüllülerin demografik ve klinik verileri de kaydedildi. Tüm gönüllülere ait cinsiyet, sigara içme durumu, alkol kullanımı, yaş, ağırlık, uzunluk vb. veriler kaydedildi. Vücut kitle indeksi (VKİ) ağırlığın (kg) boyun (m^2) karesine bölünmesi ile hesaplandı. Araştırma grubunda yer alan klinisyenlerden hastalara ait KRAS ve BRAF mutasyon bilgileri, primer tümör lokalizasyonu, metastaz durumları, kullandıkları kemoterapötikler ve 5-FU ya da kapesitabin kullanımları sonrası gözlemlenen yan etki bilgileri temin edilerek kaydedildi. Klinisyen tarafından primer kolonun yeri çekum, yükselen kolon, hepatik fleksura ve transvers kolon ise sağ kolon kanseri; splenik fleksura, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumda ise sol kolon kanseri olarak değerlendirildi.

Hastaların genel sağ kalım süresi, tedavinin başlangıcından itibaren herhangi bir nedenden dolayı ölüme kadar geçen süre (ay) olarak tanımlandı. Progresyonsuz sağ kalım süresi tedaviye başlanan tarihten itibaren kanser gelişiminin gözlemlendiği veya ölümün gerçekleştiği süreyi tanımlamak için kullanıldı. Her iki sağ kalımda da takip süresince hayatta kalan hastalar son temas tarihine göre sansürlü olarak ele alındı.

2.2.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Araştırmaya katılmayı kabul eden gönüllülerden bilgi alım prosedürü sonrası 5 ml'lik, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüpte kan örnekleri alındı. Daha sonra kan örnekleri aynı gün içerisinde Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Metabolizma Araştırma Laboratuvarı'na getirildi ve DNA izolasyon işlemleri gerçekleştirildi.

2.2.3. DNA İzolasyonu



Şekil 2.1. DNA izolasyonu optimizasyon süreçleri

DNA'nın 260 nm'deki absorbans değeri ile 280 nm'deki absorbans değerinin oranı (260/280) 1,6'dan düşük olan DNA örnekleri hem *INFINITI Plus* mikrodizin analizatörü hem de *MassArray* sisteminde çalışmaya uygun olmayacağından dolayı en saf halde DNA eldesi için uzun bir optimizasyon süreci gerçekleştirildi ve 4 farklı DNA izolasyon kiti (*Qiagene DNAamp Mini* (Qiacube, Qiagen cihazı ile), Macherey Nagel (Qiacube, Qiagen cihazı ile), *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche) ve QuickGene (Kurabo, Mini80 cihazı ile) denendi. En kısa sürede, en verimli ve saf DNA eldesi sağlayan ve izolasyon sırasında oluşabilecek DNA kırıklarının en az izlendiği Kurabo QuickGene cihazı ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Kurabo QuickGene ile DNA izolasyonu santrifüj içermediğinden dolayı oldukça hassas bir yöntemdir. İzolasyonda Kurabo QuickGene-Mini80 cihazına uygun olarak Kurabo QuickGene DNA

whole blood kit s (DB-S) kullanıldı. İzolasyon işlemi aşağıdaki protokol izlenerek yapıldı. Tüm izolasyon işlemi yalnızca DNA izolasyonu için kullanılan II. seviye güvenlik kabini içerisinde steril ortamda gerçekleştirildi (**Şekil 2.1**).

İzolasyon Basamakları:

- Çalışmaya başlamadan önce kabin içi steril hale getirildi.
- EDTA'lı tüp içerisindeki kan işleme başlamadan önce aşağı yukarı olacak şekilde karıştırıldı.
- Her bir hastaya özel steril 1,5 ml'lik tüpler hazırlandı ve her birine ait olduğu hastanın kanından 200 µl eklendi.
- Daha sonra seri bir şekilde her tüpe 30 µl EDB (Proteaz) eklendi.
- Ardından 250 µl LDB solüsyonu (Lizis Tamponu) eklendi.
- Bu işlemleri takiben ilk önce karışımların pipetaj işlemi ile ön karıştırması yapıldı ve yaklaşık 15 saniye vortekslendi.
- Mini santrifüj kullanılarak hızlı ve kısa çöktürülerek tüp kapağındaki kenardaki karışımların da aşağıya toplanması sağlandı.
- Karışımı içeren tüpler 56 °C'de 2 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 250 µl >%99'luk saf etanol, karışıma eklendi.
- Karışım yaklaşık 15 saniye vortekslendi ve mini santrifüj kullanılarak hızlı ve kısa çöktürülerek tüp kapağındaki ve kenardaki sıvıların toplanması sağlanarak lizatlar hazırlandı.
- Hazırlanan lizatlar filtre içeren kartuşlara aktarıldı ve cihaza yüklendi ve ilk basınçlandırma yapıldı.
- Bu aşamada DNA dışındaki diğer tüm hücre muhteviyatı alttaki atık tüplerine aktarıldı.
- Her bir tüp için 750'şer µl WDB solüsyonu (yıkama solüsyonu) kartuşlara eklendi ve beklemeden basınçlandırma yapıldı.
- Bu işlem toplamda 3 kez tekrar edildi.
- Son aşamada filtreli kartuşların altından atık tüpleri alınarak steril 1,5 ml'lik tüpler yerleştirildi.
- 100'er µl CDB solüsyonu (Elüsyon Buffer) her bir kartuşa eklendi.

- 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası tekrar basınçlandırma yapıldı ve izolasyon işlemi tamamlandı.

2.2.4. DNA Miktarlarının Ölçümü



Şekil 2.2. İzole edilen DNA'ların miktarlarının ve saflıklarının ölçülmesi

DNA izolasyonu sonrası DNA miktar ve saflığının ölçümü nano-volüm spektrofotometre (Meastrogen) ile yapıldı (Şekil 2.2). 260/280 oranı 1.6'dan düşük ve 2.2'den yüksek olan örnekler çalışmaya dahil edilmedi. Bu işlemler sonrası DNA solüsyonu içeren steril tüpler uygun şekilde etiketlenerek -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2.5. Genotipleme

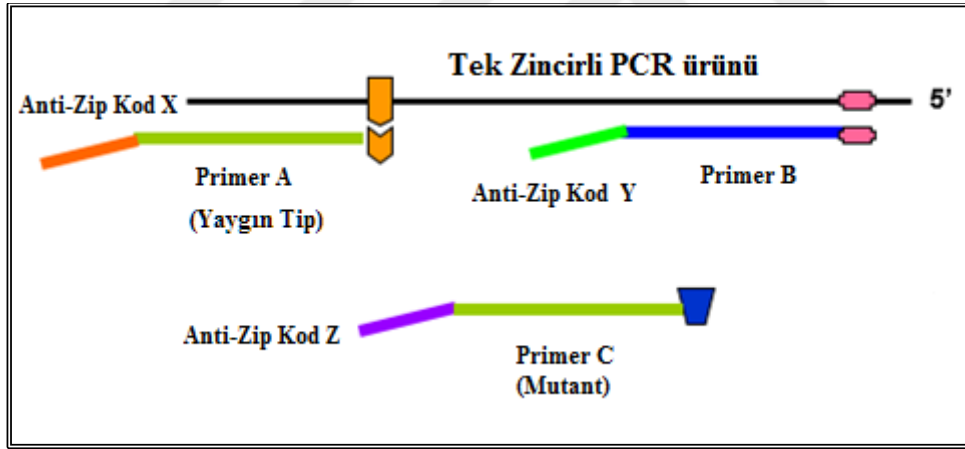
Araştırmamızda genotip analizi iki farklı yöntem ile yapılmıştır. 5-FU ilaç cevabında rol alan *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* genlerinde yer alan varyasyonların tespiti özellikle farmakogenetik testlerde kullanımı yaygın, otomize bir sistemde, mikroçipler aracılığı ile yapılmıştır. *PD-1*, *PDL-1*, *SNAI1*, *LOXL2* ve *VEGF* gen polimorfizmleri genotip analizleri ise kütle spektrometresi temeline dayanan *MassARRAY* platformu (Agena Bioscience, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

2.2.5.1. Mikrodizin Yöntemi ile Genotipleme

Mikroçipler (*Mikroarray*) kullanılarak gerçekleştirdiğimiz genotip analizleri, klinik kullanım için optimize edilmiş olan ve FDA (*Food and Drug Administration*) tarafından onaylanmış otomize mikroçip platformu (*Infiniti Plus*, Autogenomics) ile gerçekleştirildi. Bu yöntemin temeli, multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile

çoğaltma sonrası allele özgü primer uzaması (ASPE) reaksiyonu sırasında floresan boyalar ile işaretlenen polimorfik bölgelerin reaksiyon sonunda UV uyarımı ile tespitine dayanır.

Allele özgü primer uzaması, uzatma primerlerinin mikroçiplere hibridizasyonu, hibridizasyon sonrası çiplerin yıkanması, kuruması, çiplerin okunması ve genotip analizinin yapılması işlemlerinin tamamı *Infiniti Plus* platformunda gerçekleştirilmiştir. Bu platformda genotip analizi zip/anti-zip kod teknolojisi ile sağlanır. Zip ve anti-zip bölgelerinin her biri birbiri ile spesifik bağlanma gerçekleştirir. Mikroçip yüzeyine zip kodları spotlanmıştır. Anti-zip kodları ise allel spesifik primerlerin yapısında yer alır (**Şekil 2.3**). Eğer allel spesifik primere özgü DNA bölgesi ampliconların içinde yer alıyorsa anti-zip kod içeren primer DNA'ya bağlanır. Bu bağlanma işleminin devamında gerçekleşen hibridizasyon işlemi sırasında ampliconlara bağlı primerlerin yapısındaki anti-zip kodlar ile çipler üzerine spotlanmış zip kodlar birbirlerine spesifik olarak bağlanırlar. Bu eşsiz bağlanma genotiplemenin özgünlüğünden sorumludur.



Şekil 2.3. Allel spesifik primerler ve yapılarındaki anti-zip kodlar

Coriel DNA Seçimi

Infiniti Plus platformunda genotip analizi sırasında araştırılacak DNA örneklerine ek olarak plaka (*well plate*) içerisine 1 negatif kontrol (DNA yerine yalnızca moleküler grade su), 1'de analiz sonucu hangi genotipleri vereceği belli olan ticari bir DNA örneği kullanıldı. *Coriell* DNA örnekleri kullanılarak genotipleme sonucunda herhangi bir basamakta meydana gelebilecek kontaminasyon veya optik okumada oluşabilecek

öngörülemeyen hatalar kontrol edildi. Çalışmada insan B lenfositlerinden izole edilmiş NA17210 kodlu DNA örneği Coriell Enstitüsü'nden temin edildi ve analizler sırasında kullanıldı. Analiz sonucu NA17210 DNA'sından beklenen genotipler **Tablo 2.1**'de verilmiştir. Genotipleme sonrası pozitif kontrolde **Tablo 2.1**'de verilen genotiplerden birinin bile hatalı ya da okunmamış olduğu deneyler başarılı sayılmadı ve tekrar edildi.

Tablo 2.1. NA172 Coriell DNA beklenen genotip dağılımları

Çalışılan Bölge	Genotip
<i>DPYD</i> 85T>C	TT
<i>DPYD</i> 2622+23413T>G	TT
<i>DPYD</i> 299-302delTCAT	W
<i>DPYD</i> 496A>G	AA
<i>DPYD</i> 775A>G	AA
<i>DPYD</i> 1129-5923C>G	CC
<i>DPYD</i> 1590T>C	TT
<i>DPYD</i> 1601G>A	GG
<i>DPYD</i> 1679T>G/1679T>A	T/T
<i>DPYD</i> 1905+1G>A	GA
<i>DPYD</i> 2846A>T	AA
<i>MTHFR</i> 677C>T	CC
<i>MTHFR</i> 1298A>C	CC
<i>TYMS</i> 1494 6bp ins/del	-6bp/-6bp

Hot Start/Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) için DNA bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılacak olan primerleri, deoksinükleotitleri, MgCl₂ ve reaksiyon tamponu içeren amplifikasyon karışımı ticari olarak temin edildi (Autogenomics, Katalog No:02-3180-00). Polimeraz olarak Hot Start özelliği bulunan Titanium Taq Polimeraz (Takara) kullanıldı. PZR karışımı **Tablo 2.2**'de verilen miktarlar üzerinden hazırlanmıştır.

Titanium Taq polimeraz yapısında *TaqStat*® antikoru içerir. Termal döngü sırasında yüksek sıcaklıkta hızla inaktive olan bu antikor sayesinde PZR reaksiyonu hazırlık aşamasında polimeraz aktivitesini bloke ederek enzimin oda sıcaklığından etkilenmesi engeller ve termal döngü öncesinde primer-dimerlerin ve diğer artefaktların oluşumunu önler. Yüksek ısı sonrası başlayabilen PZR reaksiyonu sayesinde geleneksel Taq

polimerazlara kıyasla yüksek özgünlük ve verim sağlanmış olur (Kellogg ve ark., 1994). Özellikle birçok primeri yapısında bulunduran multipleks PZR reaksiyonları için Titanium Taq polimeraz kullanımı idealdir.

PZR reaksiyonu öncesi tüm hazırlıklar steril kabin içerisinde gerçekleştirildi. DNA örnekleri çözündükten sonra pipetaj yöntemi ile nazıkçe homojenize edildi. Amplifikasyon karışımı ve Titanium Taq Polimeraz çözündükten sonra vorteks yardımı ile karıştırıldı. Tüpler içindeki tüm bu örnekler deneye başlanmadan önce kabin içi mini-santrifüj yardımı ile hafifçe santrifüj edildi. Titanium Taq kullanılmaya kadar buz içinde muhafaza edilerek parçalanması önlendi.

İlk aşamada plaka içerisindeki kuyucukların her birine 30 ng/μl olacak şekilde 2 μl DNA örnekleri eklendi. Daha sonra vorteks ve mikro-santrifüj aşamalarından geçirilen amplifikasyon karışımı steril bir tüpe aktarıldı. Devamında Titanium Taq Polimeraz tüpe eklendi. Karışım önce vorteks yardımı ile homojen hale getirildi ve daha sonra hafifçe santrifüj edildi. Oluşturulan bu PZR karışımından hastalara ait DNA'ları içeren kuyucuklara 18 μl eklendi. Her bir kuyucuk için PZR karışımı eklendikten sonra DNA ve karışımın homojen hale gelmesi için ayrı ayrı pipetaj yapıldı. Her bir kuyucuk için toplam reaksiyon hacmi 20 μl olarak ayarlandı. Daha sonra PZR'ye özel yüksek sıcaklığa dayanıklı yapışkan özel bant (Biorad Lid) ile PZR plakasının üzeri örtüldü. Kabinden çıkarılan PZR karışımı ve DNA'ları içeren PZR plakası, plaka döndürücüyeye yerleştirildi. Böylelikle kuyucukların duvarlarındaki karışımın da dibe çökmesi sağlanarak 20 μl'lik reaksiyon hacmi korundu.

Tablo 2.2. Hot Start/Multipleks PZR karışımı içeriği

Reaktif	1 Kuyucuk (μl)
Amplifikasyon Karışımı	17.8
Titanium Taq Polimeraz	0.2
Toplam	18

Bu işlemler sonrası PZR plakası *Thermal Cycler* (T100, Biorad) içerisine yerleştirildi. Tüm bu süreç **Şekil 2.4**'de verilmiştir. Reaksiyon sıcaklıkları, süreleri ve her basamaktaki *ramp rate* oranları ayarlandı. PZR koşulları **Tablo 2.3**'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Multipleks PZR reaksiyonu hazırlık aşamaları

Tablo 2.3. Hot Start/Multipleks PZR koşulları

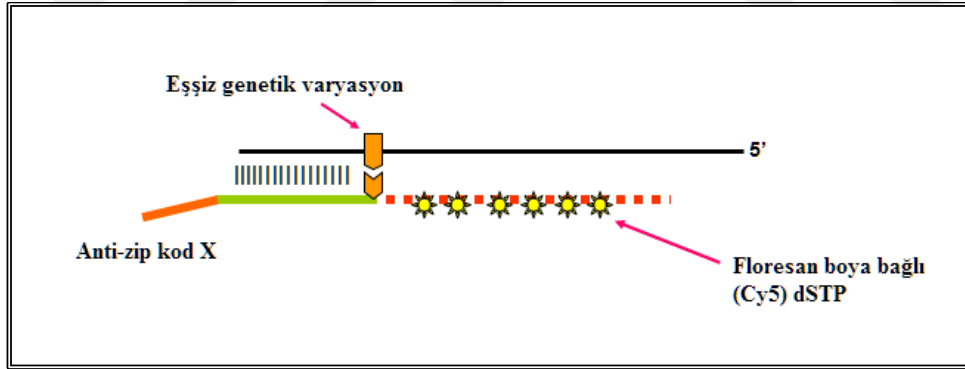
Basamaklar	Sıcaklık °C	Zaman	Siklus Sayısı
1	95	2 dk	1x
2	94	15 sn	10x
	70 - 60 (-1.0/siklus)	15 sn	
3	94	15 sn	30x
	60	15 sn	
5	94	15 sn	1x
6	4	∞	1x

2. basamakta her siklus sonrası sıcaklık derecesi 1.0°C azaltıldı. Uzun bir optimizasyon süreci sonunda *ramp rate* her basamak için 0.8 °C/sn olarak ayarlandı. Böylelikle her uygulama için reaksiyon süresi 1 saat 19 dakika olarak belirlendi.

Allel Spesifik Uzama

Allel spesifik uzama işlemi için *Intellipac® Reagent Module* (Autogenomics) kullanıldı. Intellipac içerisinde reaksiyona özgü Allel Spesifik Primer Uzatma Master miks, deoksिनुकлеотитler, Cy5-dSTP bağlı sitozin, allel spesifik primerler, uzatma reaksiyonu tamponu ve hibridizasyon tamponu bulunmaktadır. *Hot start/multipleks* PZR reaksiyonu sonunda ampliconları içeren reaksiyon plakası cihazdaki primer uzatma bölmesine yerleştirildi. Bu bölme ASPE primerlerin uzamasını gerçekleştirmek için spesifik bir ısı döngüsü uygular. Bu ısı döngüsü 4 °C’de 60 saniye, ve 53 °C’de 20 saniye (40 siklus)

ve son olarak 94 °C'de 20 saniyeden oluşur. Bu ısı döngüsü sırasında eğer ortamda aranılan ASPE primerlere spesifik DNA bölgesi varsa bu bölgeye bağlanmalarını sağlar ve DNA polimeraz aracılığıyla allel spesifik primerin uzaması gerçekleşir. ASPE primerinin bir kısmı, mikroçip üzerindeki oligonükleotidi bağlayan TAG sekansıdır (anti-zip kod) ve diğer kısmı ise DNA bölgesine spesifik sekanstır. Her iki kısımda 20-25 nükleotit uzunluğundadır. ASPE reaksiyonunun özgüllüğü, ASPE primerinin 3' ucundaki nükleotit tarafından sağlanır. ASPE primerinin 3' nükleotidi, hedef sekansla eşleşmez ise ASPE gerçekleşmez ve floresan nükleotitlerle etiketlenmez. Genotipleme öncesi yapılan PZR'nin amacı yalnızca ilgilenilen bölgeleri çoğaltarak hassasiyeti arttırmaktır. Primer uzamasının amacı ise analit tespitinin özgüllüğünü arttırmaktır. Uzatma işlemi 40 uzatma döngüsü içerir ve bu PZR'den farklı olarak tek yönlü bir işlemdir. Primerler yalnızca ilgilenilen DNA bölgesi üzerinde nükleotit değişimin olduğu 3' konumunda tam bir eşleşme olduğunda uzatılır. ASPE'da polimerizasyon sırasında DNA zincirine floresan boya bağlı (CY5) sitozin nükleotiti eklenir. Bu işlem spesifik DNA dizilerinin *BioFilmChip*'e bağlandıklarında saptanması için yeterli floresan sinyalin oluşmasını sağlar (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Allel spesifik primer uzama reaksiyonu

Hibridizasyon

BioFilmChip (Autogenomics), her bir zipkodun spotlandığı 240 bölgeye sahiptir (Şekil 2.6). Her primer için 3 nokta vardır. *Infiniti Plus* platformunda analiz edilen gen polimorfizmlerine ait bilgiler **Tablo 2.4**'de verilmiştir. DNA bağlanan bu bölgeler dışında iç kontrol spot bölgeleri yer alır. Örneğin çip üzerinde 5 adet arka plan kontrol spot bölgesi bulunur. Bu bölgeler DNA bağlanması için diziler içermez ve arka plan

floresansını kontrol etmek için kullanılır. 3 spot bölgesi (*registration spots* 1,15 ve 233) optik okuma sırasında görsel bağlantı noktası olarak kullanılır. Bu noktalardan faydalanılarak çipteki tüm noktaların koordinatları belirlenir. Anti-zip kodu ile zip kodu bağlanma koşulları her bir kod için ortaktır ve farklı termal koşullar gerektirmez. Bu spesifik hibridizasyon işleminden dolayı, tek bir *BioFilmChip*'te çoklu genetik varyantlar analiz edilebilir.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Reg														Reg
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
						Reg		B		B		B		Ref

Şekil 2.6. Bir *BioFilmChip*'in temsili iç tasarımı

Primer uzama reaksiyonu sonrası 80 µl hibridizasyon tamponu her bir kuyucuğa eklenir ve 120 µl'lik karışım her bir mikroçipe aktarılır. Çipler hibridizasyon sağlanması için 40 °C'de 90 inkübe edilir. Zip kod ile anti-zip kodlar spesifik olarak birbirlerine bağlanırlar. Sinyal algılamasının güvenilirliği, özgüllüğünü ve hassasiyetini sağlamak için çip üzerinde aynı bölgenin 3 kopyası bulunur.

Tablo 2.4. BioFilmChip üzerine spotlanmış polimorfik bölgeler

Gen	rs numarası	Polimorfik Nokta	Konum	Değişim	* Adlandırma
<i>MTHFR</i>	rs1801133	c.677C>T	Ekzon 4	p.Ala222Val	-
	rs1801131	c.1298A>C	Ekzon 7	p. Glu42Ala	-
<i>DPYD</i>	rs1801265	c.85T>C	Ekzon 2	p.Cys29Arg	*9A
	rs41309171	c.234-123G>C	İntron 3	Bilinmiyor	
	rs72549309	c.299_302delTCAT	Ekzon 4	p.(Phe100Serfs)	*7
	rs2297595	c.496A>G	Ekzon 6	p.Met166Val	-
	rs45589337	c.775A>G	Ekzon 8	p.Lys259Glu	-
	rs75017182	c.1129-5923C>G	İntron 10	mRNA işleme	-
	rs140125782	c.1587T>C	Ekzon 14	p.Asp529Asp	-
	rs1801158	c.1601G>A	Ekzon13	p.Ser534Asn	*4
	rs55886062	c.1679T>G/A	Ekzon 13	p.Ile560Ser	*13
	rs3918290	c.1905+1G>A (IVS14+1G>A)	İntron 14	mRNA işleme	*2A
<i>TYMS</i>	rs67376798	c.2846A>T	Ekzon 22	p.Asp949Val	-
	rs11280056	1494/delTTAAAG	3' UTR	İns/Del	-

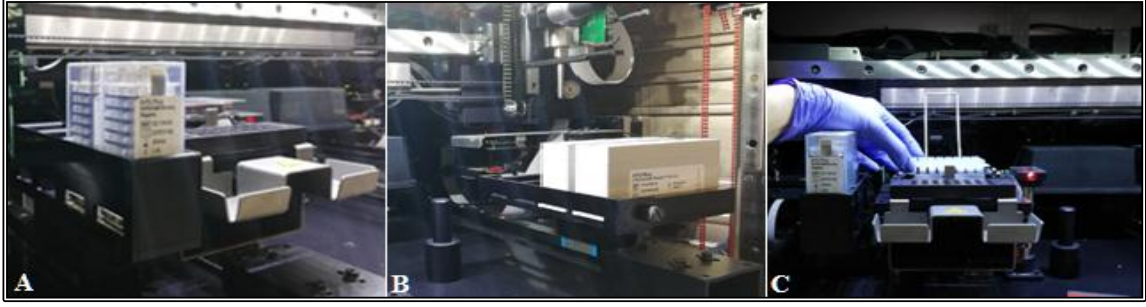
Yıkama ve Okuma

Hibridizasyon sonrası, bağlanma yapmayan bölgelerin uzaklaştırılması amacı ile 10 kez 100 µl 1 X SSC tamponu (0.15 M sodyum klorür ve 0.015 M trisodyum sitrat) ile yıkanarak, yıkama işlemi sonrası kuruyan çipler sinyal taraması için optik istasyona gönderilmektedir. Okuma işlemi konfokal mikroskop aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Optik modül 3 ekseninde hareket özelliği olan kameradan oluşur. 760 nm'lik uyarma dalga boylarını kullanarak, ilk önce çip içerisinde yer alan 3 adet kayıt bölgesini tarar ve görüntüleri kaydeder. Bu görüntüleri analiz ederek 3 adet kayıt noktasının konumu hesaplanır. 3 adet kayıt noktasının konumuna göre ise 240 biyo-noktanın koordinatları hesaplanır. Kamera çipi odaklamak için Z eksenini boyunca; çipteki spesifik noktaları bulmak için ise X ve Y eksenleri boyunca hareket eder.

Genotip Analizi

Konfokal mikroskopi, ip üzerindeki her hedef ve numune için bağıl floresan birimi (RFU) değerini tespit eder. Genotip analizi RFU sinyaline dayalı olarak yapılır. Genotipleme bir örneğe ait spot bölgesindeki floresan sinyalinin şiddetinin, spesifik olmayan oligonükleotid arka plan kontrol noktalarına ait sinyal şiddetine olan oranına göre yapılır. Deney ncesi her bir genotip için sistemde uzun bir optimizasyon süreci sonrası belirlenen eik (*cut off*) değerleri ile algoritma oluşturulmuştur. Bu değerler okumanın alt ve st limitlerini belirler. Bu alt ve st limitler baz alınarak örnekler homozigot yaygın, heterozigot ya da homozigot mutant olarak sınıflandırılır. Eğer yaygın tip/mutant tip sinyal oranı st limitten büyük ise örnek homozigot yaygın; mutant/yaygın tip sinyal oranı st limitten büyük ise örnek mutant; eğer oran 1'den büyük ancak alt limitten küçük ise heterozigot olarak sınıflandırılır. Oran alt sınır ile st sınır arasında tespit edildiğinde ise genotip sonucu 'Belirsiz (IND) veya ağrı Yok (*NoCall*)' olarak verilir. Genotipleme sonucu bu şekilde çıkan örnekler sonuç alınıncaya kadar tekrarlandı.

Mikrodizin sistemi ile genotipleme süreci özetle: Öncelikle reaksiyon plakasındaki pozisyonlarına karşılık gelecek şekilde hasta kodları sisteme girildi. rnek sayısına yetecek miktarda pipet ucu içeren pipet flatformu sisteme eklendi. 12 adet biofilmChip içeren magazinler *Infiniti Plus*'ta uygun bölgeye yerleştirildi. rnek sayına uygun şekilde cihazdaki ilgili yere Intellipaclar yerleştirildi. Hibridizasyon sonrası bağlanmayan DNA dizilerinin ortamdaki uzaklaştırılması için gerekli olan yıkama solüsyonu cihaza eklendi. *Hot Start*/Multipleks PZR işlemi sonrasında ampikonları içeren PZR plakası *Infiniti Plus*'a yüklendi (**ekil 2.7**). Son kontroller yapıldıktan sonra otomize genotipleme işlemi başlatıldı (**ekil 2.8**).



Şekil 2.7. Genotipleme öncesi magazinlerin (A), intellipaclarin (B), amplikonları içeren plakanın (C) cihaza yerleştirilmesi

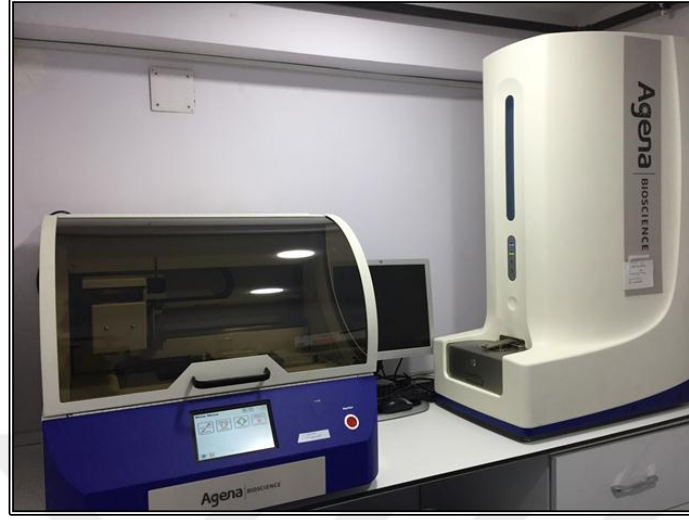


Şekil 2.8. *Infiniti Plus* genotipleme platformu

2.2.5.2. Kütle Spektrometresi ile Genotipleme

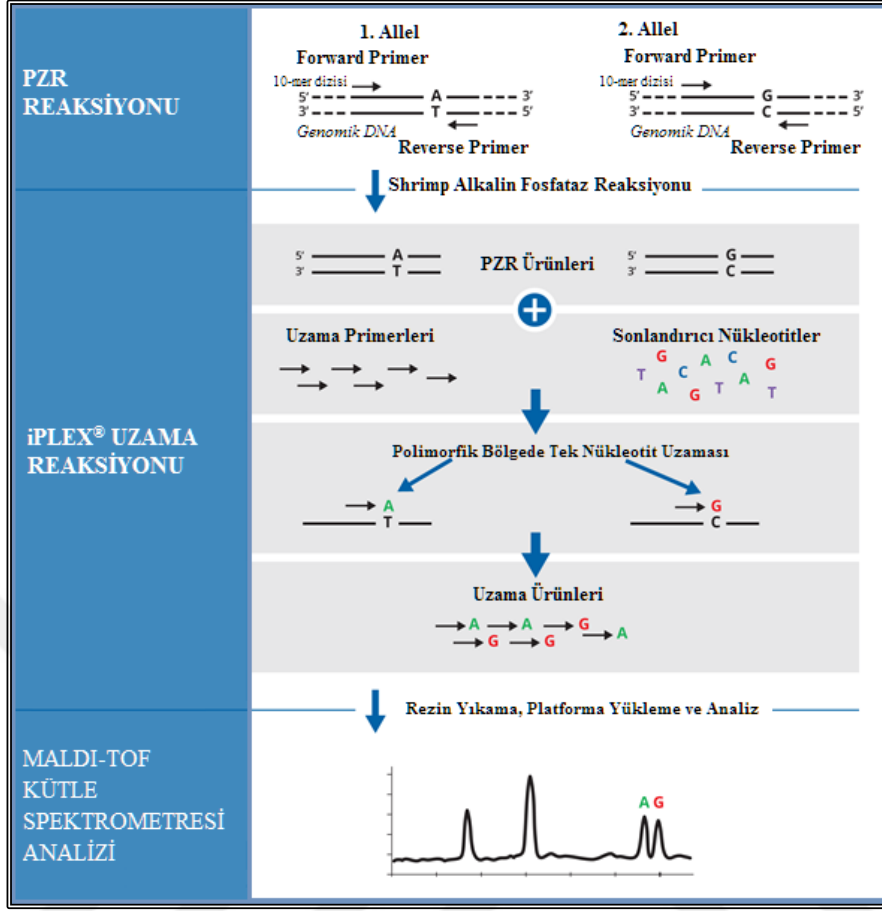
Araştırmamızın bu kısmında genotip analizleri *MassARRAY* platformunda iPLEX reaksiyonu (Agena Bioscience, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapılmıştır. *MassARRAY* platformu bir dağıtıcı sistemi (*Nanodispenser*) ve analizatörden (*MassARRAY Analyzer 4*) meydana gelmektedir (**Şekil 2.9**). *MassARRAY Analyzer 4*, genotip analizini MALDI-TOF (matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon-uçuş süresi) kütle spektrometresi prensibine dayanarak gerçekleştirir. *MassARRAY Analyzer 4*, 16 Da kütle ayırma çözünürlüğü ile yaklaşık 4500-9000 Da kütle aralığındaki DNA örneklerini saptamak için tasarlanmıştır. *MassARRAY Nanodispenser* (Agena Bioscience RS1000) bir dizi reaksiyonların gerçekleştirildiği PZR plakası içerisindeki örneklerin *SpectroCHIP* üzerine hassas ve spesifik olarak dağıtımından sorumludur.

SpectroCHIP ise kullanıcıya spesifik tasarlanmış analitlerin özel bir matris ile spotlandığı platforma özel çiptir.



Şekil 2.9. MassARRAY genotipleme platformu

MassARRAY platformunda genotiplemenin önemli bir basamağını iPLEX reaksiyonu oluşturur. Temelde multipleks uzama reaksiyonu olan iPLEX® reaksiyonu **Şekil 2.10**'da özetlenmiştir. iPLEX uzama reaksiyonu amplifiye olmuş DNA'daki insersiyon, delesyon nokta mutasyonları ve diğer polimorfizmleri tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir.



Şekil 2.10. iPLEX reaksiyonu ve MassArray genotip analizi temel basamakları

MassARRAY platformunda iPLEX reaksiyonu ile analiz eden varyasyonlar ve özellikleri

Tablo 2.5'de özetlenmiştir.

Tablo 2.5. *MassARRAY* platformunda iPLEX reaksiyonu ile analiz edilen polimorfik bölgeler ve DNA'daki konumları

Gen	rs numarası	Polimorfik Nokta	DNA'daki Konum
<i>PD-1</i>	rs2227981	+7785A>C	Ekzon 5
	rs2227982	+7625G>A	Ekzon 5
	rs36084323	-606C>T	Promotör
	rs7421861	+3315G>A	İntron 1
<i>PDL-1</i>	rs10815225	-62G>C	Promotör
	rs2282055	-382T>G	İntron 1
	rs2297136	93G>A	3' UTR
	rs822336	-1813G>C	Promotör
<i>SNAI</i>	rs6125849	-1098	5' UTR
<i>LOXL2</i>	rs6999447	+35617	İntron
<i>VEGF</i>	rs1570360	-1154G>A	Promotör
	rs2010963	+405G>C	5' UTR
	rs8333061	-460C>T	Promotör

Veri Tabanı Girişleri ve Yazılımlar

Çalışmanın farklı kısımları Agena Bioscience'a ait çeşitli yazılımlar ve programlar kullanılarak dizayn edilmiştir. İlk olarak *Assay Dizayn Suit* programı ile rs numaraları ve fasta verileri kullanılarak araştırılacak hedef bölgeler için PZR ve uzama primerleri (problar) tasarlandı, çalışmanın ileri aşamaları ile ilgili kontroller yapıldı ve bir çalışma dosyası hazırlandı. Multipleks reaksiyonların amplifikasyonuna yardımcı olması amacı ile ileri ve geri (amplifikasyon) primerler dizayn edilirken 5' uçlara evrensel 10-mer dizi etiketi (5'-ACGTTGGATG-3') eklendi. Genotipleme boyunca gerekli olan tüm deney dizaynlarını içeren çalışma dosyası *MassARRAY* veri tabanına *MassARRAY Typer Assay Editor* yazılımı aracılığıyla yüklendi. Çalışma dosyası *MassARRAY* veri tabanına yüklendikten sonra *MassARRAY Typer Plate Editor* programı kullanılarak çalışılacak PZR plakası tasarlandı. Bu süreçte veri tabanına çalışma gruplarına ve çalışılacak deneylere dair verilerin girişi yapıldı.

PZR Karışımının Hazırlanması ve Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu öncesi ilk olarak içerisinde steril bir kabin bulunan ve yalnızca bu işlem için ayrılan bir odada **Tablo 2.6**'da verilen reaktifler ve

miktarı esas alınarak buz üzerine yerleştirilmiş 1.5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpü içerisinde *MassArray* için gerekli PZR karışımı (Agena Bioscience) hazırlandı. Bu işlem sırasında PZR tamponu, MgCl₂, dNTP karışımı ve PZR primer karışımı (Agena iPLEX Gold Genotipleme Kiti) kabin içerisinde oda sıcaklığında çözündürüldü, hafifçe vortex ve santrifüjden geçirildi ve işlem süresince soğuk buz kutusunda bekletildi. Enzim ise hafifçe vortex ve santrifüjden geçirildikten sonra buz içerisinde bekletildi. Hazırlanan PZR karışımı sırası ile hafifçe vorteks ve santrifüj işlemlerine tabi tutuldu ve buzda bekletildi.

Tablo 2.6. PZR karışımı içeriği

Reaktif	Final Konsantrasyon	1 Kuyucuk (µl)
Moleküler Saflıkta H ₂ O		0.8
10X PZR Tamponu	1X	0.5
MgCl ₂	2 mM	0.4
dNTP Karışımı	500 µM	0.1
PZR Primer Karışımı	100 nM	1.0
PZR Enzimi	0.2 U/µl	0.2
Toplam		3.0

DNA örnekleri mikrolitrede 5 ng olacak şekilde sulandırıldı. Hazırlanan DNA örneklerinden 2 µl (kuyucuk başına 10 ng) alınarak PZR plakası kuyucuklarına aktarıldı. Daha sonra PZR plakasındaki her kuyucuğa 3 µl PZR karışımı hafifçe pipetaj yapılarak eklendi. Daha sonra PZR'ye özel yüksek sıcaklığa dayanıklı yapışkan özel bant ile PZR plakasının üzeri örtüldü. Kabinden çıkarılan PZR karışımı ve DNA içeren PZR plakası, plaka döndürücüye yerleştirildi. Böylelikle kuyucukların duvarlarındaki karışımın da dibe çökmesi sağlanarak 5 µl'lik reaksiyon hacmi korundu. Hazırlanan PZR reaksiyon plağı termal döngü cihazına yerleştirildi. PZR reaksiyon koşulları **Tablo 2.7'**da verilmiştir.

Tablo 2.7. Multipleks PZR reaksiyon koşulları

Basamaklar	Sıcaklık °C	Zaman	Siklus Sayısı
1	95	2 dk	1x
2	95	30 sn	45x
	56	30 sn	
	72	60 sn	
3	72	5 dk	1x
4	4	∞	1x

Shrimp Alkalın Fosfataz Reaksiyonu

Alkalın fosfataz, optimum katalitik aktivitesini alkali pH'da gösteren metal bağımlı bir enzimdir ve DNA, RNA ve nükleotidlerden 5' fosfat gruplarını uzaklaştırır. Shrimp alkalın fosfataz (SAP), PZR reaksiyonu sonucunda oluşan ampliconların yapısına katılmayan dNTP'leri nötralize etmek için kullanılır (Rani ve ark., 2012). SAP sayesinde 5' fosfat gruplarını kaybeden dolayısı ile DNA'nın 3' ucuna bağlanamayan nükleotitler iPLEX uzama reaksiyonunda işlevsiz hale gelirler ve yapıya katılamazlar (Gabriel ve ark., 2009).

PZR işlemi tamamlandıktan sonra SAP reaksiyonu için gerekli SAP karışımı (Agena Bioscience) steril kabin içerisinde hazırlandı. Bu işlem sırasında SAP tamponu ve enzimi oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra hafifçe vortex ve santrifüj işlemlerinden geçirildi. Daha sonra **Tablo 2.8**'de verildiği miktarlar üzerinden örnek başına 2 µl'lik karışım hazırlandı.

Tablo 2.8. SAP karışımı içeriği

Reaktif	Final Konsantrasyon	1 Kuyucuk (µl)
HPLC Grade H ₂ O		1.53
SAP Tamponu	1X	0.17
SAP Enzimi	0.073 U/µl	0.30
Toplam		2.00

Hazırlanan SAP karışımı hafifçe vortex ve santrifüj işlemlerinden geçirildikten sonra işlem boyunca soğuk buz kutusu üzerinde bekletildi. Termal döndürücüden çıkarılan

PZR ürünlerini içeren PZR plakasındaki her bir kuyucuğa 2 µl SAP karışımı pipetaj yapılarak eklendi. Yüksek sıcaklığa dayanıklı yapışkan özel bant ile PZR plakasının üzeri örtülerek hafifçe santrifüj edildi. SAP reaksiyon plağı termal döngü cihazına yerleştirilerek **Tablo 2.9** verilen reaksiyon koşullarına tabii tutuldu.

Tablo 2.9. SAP reaksiyon koşulları

Basamaklar	Sıcaklık °C	Zaman	Siklus Sayısı
1	37	40 dk	1x
2	85	5 dk	1x
3	4	∞	

iPLEX Uzama Reaksiyonu Karışımı Hazırlanması ve Uzama Reaksiyonu

Lokusa özgü uzama reaksiyonu (allel spesifik PZR) olan iPLEX, uzama primeri, çoğaltılmış hedef DNA ve modifiye edilmiş sonlandırıcı dideoksinükleotitlerin inkübasyonundan oluşur (**Şekil 2.10**). Sonlandırıcı bazlar, tek bazlık farklılık gösteren fragmanların kütle farklarının kütle spektrometresi ile saptanabilmesi için "kütle modifiyelidir". iPLEX reaksiyonu, uzama primerinin polimorfik bölgenin hemen yukarı kısmına bağlanması ile başlar ve polimorfik bölgeye modifiye edilmiş dideoksinükleotit bağlanması ile sona erer (Gabriel ve ark., 2009).

Uzama reaksiyonu öncesi ilk olarak, reaksiyon sonucunda elde edilen pik yoğunluğu ile örneğin analit kütesinin ters orantılı olması ve pik yüksekliklerinde öngörülemeyen farklılıklarla karşılaşılması nedeniyle uzama primerlerinin konsantrasyonları optimize edilir. Bu sebeple her bir uzama primeri *MassARRAY* sisteminde Agena Bioscience iPLEX® Pro kılavuzundaki direktifler izlenerek optimize edildi. Analiz sonunda *MassARRAY Typer Analyzer*'daki rapor incelendi ve elde edilen tüm pikler en yüksek pik yüksekliğinin en az %45'i ise primer miktarları kabul edilebilir olarak ele alındı. %45'den az olduğu durumlarda söz konusu primerin miktarı artırılarak devam edildi.

Optimizasyon işlemleri sonrası uzama reaksiyonuna geçildi. Deney öncesi reaktifler oda sıcaklığında çözdürüldü. Sırasıyla hafifçe vortex ve santrifüj işlemlerinden geçirilerek buz üzerinde bekletildi. Buz üzerine yerleştirilmiş 1,5 mL'lik steril tüpte iPLEX uzama karışımı **Tablo 2.10**'da verilen içerik ve miktarlarda steril bir kabin içerisinde

hazırlandı. Hazırlanan karışım sırası ile hafifçe vorteks ve santrifüjden geçirilerek buzda muhafaza edildi.

Tablo 2.10. iPLEX uzama karışımı içeriği

Reaktif	Final Konsantrasyon	1 Kuyucuk (μl)
HPLC Grade H ₂ O		0.62
iPLEX Buffer Plus	0.222X	0.20
iPLEX Sonladırma Karışımı	0.222X	0.20
Extend Primer Karışımı	0.52 - 1.57 μM	0.94
iPLEX Enzimi	0.142 U/μl	0.04
Toplam		2.00

SAP reaksiyonunun tamamlanması sonrası termal döngü cihazından çıkarılan reaksiyon plakası hafifçe santrifüj edildi ve steril kabine alındı. Reaksiyon plakasının her kuyusuna uzama reaksiyonu karışımından 2 μl pipetaj yapılarak eklendi. İşlem tamamlandıktan sonra yüksek sıcaklığa dayanıklı yapışkan bant ile PZR plakasının üzeri örtülerek hafifçe vorteks ve santrifüj edildi. Uzama reaksiyonu plakası termal döngü cihazına yerleştirilerek **Tablo 2.11**'de verilen reaksiyon koşullarına tabii tutuldu.

Tablo 2.11. iPLEX uzama reaksiyon koşulları

Basamaklar	Sıcaklık °C	Zaman	Siklus Sayısı
1	95	30 sn	1x
2	95	5 sn	40X 5X
3	52	5 sn	
4	80	5 sn	
5	72	3 dk	
6	4	∞	

iPLEX Uzama Reaksiyon Ürünlerinin Rezin ile Temizlenmesi

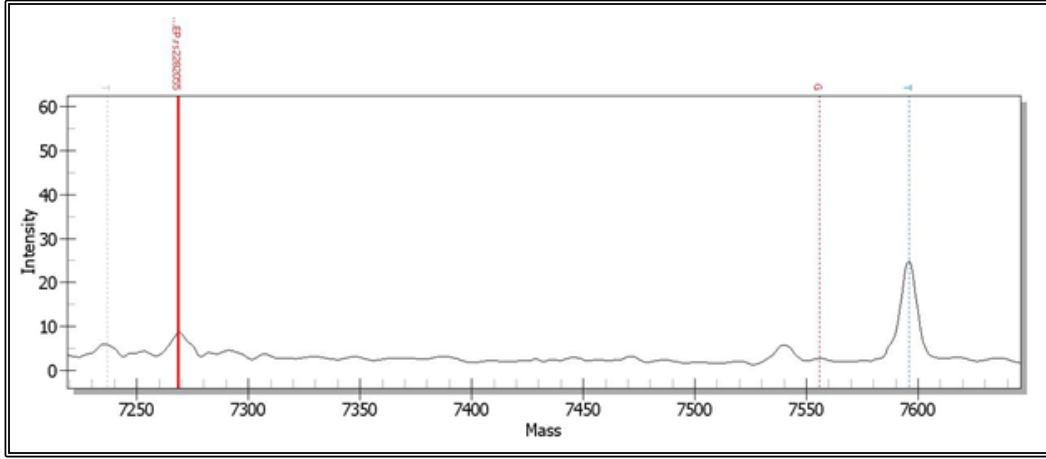
Kütle spektrometresi analizi sırasında arka plan kirliliğini önlemek amacı ile iPLEX uzama reaksiyonu ürünleri bir seri temizleme işlemine tabii tutulur. Bu temizleme işleminde asit reaktiflerle ön işleme tabii tutulmuş katyonik rezin kullanılır. Na⁺, K⁺, ve Mg⁺² gibi iyonlar rezin iyon değişimi ile uzama reaksiyonu ürünlerinden uzaklaştırılır (Gabriel ve ark., 2009).

Uzama reaksiyonu sonrası termal döngü cihazından örnekleri içeren reaksiyon plakası çıkartılarak hafifçe santrifüj edildi. Reaksiyon plakası içerisindeki uzama reaksiyonu ürünleri çukur plaka yardımıyla rezin ile muamele edilerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

Örneklerin Platforma Yüklenmesi ve Analiz

Örnekleri cihaza yüklemekten önce Agena Bioscience RS1000 Nanodispenser cihazının rutin kontrolleri ve temizliği yapıldı. Cihaz analize uygun hale geldikten sonra örnekleri içeren reaksiyon plakası ve *SpectroCHIP Array* (Agena Bioscience) uygun yerlere dikkatlice yerleştirildi ve analiz işlemi başlatıldı.

Çip kütle spektrometresine yerleştirildikten sonra desorpsiyon ve iyonizasyon kaynağı olarak kullanılan UV lazer ışığı, analit/matris içeren *SpectroCHIP* üzerindeki her bir spotu kısa darbelerle ateşlenerek desorpsiyon ve iyonizasyona neden olur ve matrisin bir kısmını buharlaştırır. Hızla genişleyen bir matris bulutu, analitin bir kısmını kendisiyle birlikte vakumlu bölgeye taşır. Matris molekülleri, gelen lazer enerjisinin çoğunu emerek DNA hasarını ve iyon parçalanmasını en aza indirir. Yüksek voltajlı bir elektrostatik alan iyonize DNA moleküllerini vakum tüpünün altından yukarıya doğru hızlanmaya zorlar ve DNA molekülleri matris iyonlarından ayrılıp kütle/yükleri ile orantılı olarak farklı sürelerde detektöre ulaşırlar. Daha hafif iyonlar daha hızlı hareket eder ve dedektöre daha ağır iyonlardan daha erken çarpar. Her lazer darbesinden sonra dedektör, DNA parçasının kütlelerinin hesaplanabileceği ve polimorfik bölgede bulunan nükleotid bazının belirlenebileceği her analitin nispi uçuş süresini kaydeder. MALDI-TOF kütle spektrometresinde temel olarak uzama reaksiyonu sonucu elde edilen ve polimorfik bölgedeki allele göre oluşan primerin kütlesi hesaplanır. Primerin kütlesi diziyi dolayısı ile hangi bazın bağlandığını gösterir. Daha sonra *MassArray* platformuna ait yazılım (*TyperAnalyzer v 4.0*) **Şekil 2.11**'de verildiği üzere her reaksiyon için gözlemlenen primerlerin kütlelerini otomatik olarak bir genotipe çevirerek bir rapor oluşturur (Gabriel ve ark., 2009; Ellis ve ark., 2016).



Şekil 2.11. MassArray platformunda analiz sonrası elde edilen örnek genotip sonucuna ait bir elektroferogram

2.2.6. Toksisite Değerlendirilmesi

5-FU kaynaklı toksisite değerlendirmesi, ortak toksisite kriterleri kılavuzlarına (NCI-CTC AE sürüm 5.0) göre yapılmıştır. Nötropeni toksisitesi seviyeleri belirlenirken Yoshida ve arkadaşlarının çalışmasındaki kriterler de dahil edildi (Yoshida ve ark., 2015).

2.2.7. DPYD Fenotiplerin Belirlenmesi

DPYD fenotiplerinin belirlenmesinde Lunenburg ve arkadaşları ile Amstutz ve arkadaşlarının belirlediği kriterler kullanıldı (Lunenburg ve ark., 2020; Amstutz ve ark., 2018). DPD fonksiyonuna olan etkisine göre alleller **Tablo 2.12**'te verilmiştir.

Tablo 2.12: DPYD fenotiplerinin belirlenmesinde kullanılan farklı DPD aktivitesine sebep olan alleller

DPD Fonksiyonel Alleller	DPD Fonksiyonunu Düşüren Alleller	DPD Fonksiyon Kaybı Allelleri
85T>C	2846A>T	1905 + 1G>A
1601G>A	1236G>A;1129–5923C>G) (hapB3)	1679T>G
496A>G		299_302del

2.2.7.1.5-FU Normal Metabolizörler

DPD fonksiyonunu düşüren allellerden veya DPD fonksiyon kaybı allellerinden birini taşımayan yalnızca DPD fonksiyonel allellerine sahip olan hastalar 5-FU normal metabolizör olarak belirlendi.

2.2.7.2.5-FU Orta Derece Metabolizörler

Taşıdığı allellerden 1 tanesi fonksiyonel allel olan ancak ikinci allelinde DPD fonksiyonunu düşüren allellerden veya DPD fonksiyon kaybı allellerinden birini taşıyan hastalar ile sahip olduğu her iki alleli de DPD fonksiyonunu düşüren allellerden olan hastalar 5-FU orta derece metabolizör olarak belirlendi.

2.2.7.3.5-FU Zayıf Metabolizörler

DPD fonksiyon kaybı allellerinin her ikisini de ya da 1 DPD fonksiyon kaybı alleli ve 1 DPD fonksiyonunu düşüren alleli taşıyan hastalar 5-FU zayıf metabolizör olarak belirlendi.

2.2.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizi SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) 26.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı değerler metastaz analizinde ortalama, standart sapma ve minimum maksimum; diğer tüm analizlerde ise ortalama, standart hata ve minimum maksimum olarak verildi. Kategorik değişkenler olgu sayıları ve yüzde değer olarak ifade edildi. Sürekli ölçümlü değişkenlerin dağılımlarının normale uygun olup olmadığı *Kolmogorov Smirnov* ve *Shapiro Wilk* testi ile belirlendi.

Genotip dağılımlarının *Hardy-Weinberg* dengesine uyumlarının tespitinde χ^2 testi kullanıldı. İkili gruplar (vaka/kontrol, metastatik/metastatik olmayan, karaciğer metastatik/metastatik olmayan, sol/sağ kolon, 5-FU yan etki grupları) arasındaki genotip dağılımları; vaka-kontrol gruplarında cinsiyet ve sigara kullanımı dağılımları; sağ-sol kolon kanseri ve metastaz gruplarında cinsiyet, sigara, metastaz, KRAS mutasyon, DPYD fenotip, 5-FU yan etki seviyesi, alkol kullanımı ve ölüm durumlarının dağılımları χ^2 testi ile karşılaştırıldı. Denek sayısı 5'ten az olduğu durumlarda ise *Fisher's Exact* testi sonuçları esas alındı.

İkili grup (vaka-kontrol, sağ-sol kolon, metastatik-metastatik olmayan) karşılaştırmalarında normal dağılım gösteren sürekli değişkenlerin karşılaştırması Student's t testi normal dağılım göstermeyen değişkenlerin karşılaştırması ise Mann-Whitney-U testi kullanılarak yapıldı.

Odds oranı (OR) ve %95 güven aralıklarını (CI) tahmin etmek için binary lojistik regresyon analizi kullanıldı. Binary lojistik regresyon analizi temelde genotiplerin 5-FU kaynaklı yan etkiler ile ilişkilerinin incelenmesinde düzenlenmemiş olarak; KRK riski ile polimorfizmlerin ilişkilerinin incelenmesinde ise cinsiyet, sigara kullanımı ve yaş değişkenlerine göre düzenlenmiş ve düzenlenmemiş olarak ifade edildi. χ^2 testi sonuçlarından elde edilen p değerleri dikkate alınarak bazı genotipler için ileri incelemelerde de ikili lojistik regresyon analizi kullanılmıştır. Binary lojistik regresyon analizi ayrıca KRK riski öngören genotiplerin ve hasta karakteristiklerinin ikili lojistik regresyon modelinin oluşturulmasında da kullanılmıştır.

Hastaların sağ kalım eğrilerinin elde edilmesinde *Kaplan-Meier*, karşılaştırmalarında ise *Log-Rank* testi kullanıldı. İstatistiksel önem ifade eden çoklu karşılaştırmalarda *Bonferroni* düzeltmesi uygulandı. Sağ kalım süreleri (ay), ortalama $\pm$ standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) olarak temsil edildi.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Çalışma Gruplarına Ait Genel Veriler

3.1.1. Vaka Karakteristikleri

Araştırmamıza dahil olan hastalara ve kontrol grubuna ait demografik, klinik ve patolojik veriler **Tablo 3.1**'de verilmiştir. Araştırma sırasında toplamda 116 KRK hastasına ait kan örnekleri ve klinik veri toplanmıştır. DNA izolasyonları sonrası yapılan spektrofotometrik ölçümlere göre 13 hastanın DNA kalitesi genotiplemeye uygun olmadığı için çalışmaya dahil edilmemiştir.

Araştırmaya dahil edilen ve yaşları 28 ile 84 arasında değişen 103 hastanın yaş ortalaması 59.67'dir. Hastaların 45'i (%43.7) kadın; 58'i (%56.3) erkek bireylerden oluşmaktadır. Hastalara ait VKİ en az 15.05 en fazla 41.02 olmak üzere ortalama VKİ 25.80 kg/m²'dir. Hastaların 44'ünün (%42.7) KRK teşhisi sonrası sigara kullanımına devam ettiği, 11'inin (%10,7) sigara kullanmadığı, 48'inin (%46.6) ise eski kullanıcı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 16 (%16.8) hasta alkol kullanmaktadır.

Çalışmaya dahil edilen 103 KRK hastasının 22'sinin (%21.4) primer tümör lokalizasyonu sağ kolon olup, 81'i (%78.6) sol kolondur. 84 (%81.6) hastada metastaz pozitif olup, tüm hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri en az 3, en fazla 49 ay olmak üzere ortalama 12.69 aydır. Genel sağ kalım ise ortalama 22.82 ay olup minimum 2 ile maksimum 91 ay arası değişmektedir.

Flourourasil tedavisi altında olan 103 KRK hastasının 73 tanesinin 5-FU, 30 tanesinin ise kapesitabin kullandığı tespit edilmiştir. Hastaların kombine tedavilerinde en sık kullanılan ilaçlar Leucovorin (103 kişi), Oxaliplatin (71 kişi), Irinotecan (30 kişi), Bevasizumab (32 kişi), Cetuximab'tır (20 kişi) .

Hastalara klinisyence tarafımıza iletilen verilere göre 35 (%33) hastada K-RAS mutasyonu; 1 (%1) hastada ise B-RAF mutasyonu mevcut ve 36'sının (%35.0) ise tedavi sürecini tamamlayamadan öldüğü bildirilmiştir.

Tablo 3.1: KRK hastalarına ve kontrollere ait demografik, klinik ve patolojik özelliklerinin dağılımı

Değişkenler	Vaka	Kontrol
Cinsiyet, n (%)		
Kadın	45 (43.7)	37 (45.1)
Erkek	58 (56.3)	49 (45.8)
VKİ	25.80 ± 0.5 (15.05-41.02)	27.26 ± 0.5 (18-47)
Sigara kullanımı, n (%)		
Evet	44 (42.7)	38 (46.3)
Hayır	11 (10.7)	29 (72.5)
Eski Kullanıcı	48 (46.6)	15 (23.8)
Alkol Kullanımı, n (%)	16 (16.8)	
Primer Tümörün Yeri, n (%)		
Sağ Kolon	22 (21.4)	
Sol Kolon	81 (78.6)	
Metastaz, n (%)		
Var	84 (81.6)	
Yok	19 (18.4)	
PSK (Ay)	12.69 ± 0.97 (3-49)	
GSK (Ay)	22.82 ± 1.72 (2-91)	
5-FU, n (%)	73 (70.87)	
Kapecitabin, n (%)	30 (29.13)	
K-RAS Mutant, n (%)	35 (33)	
B-RAF Mutant, n (%)	1 (1)	
Ölüm, n (%)	36 (35.0)	

Kategorik değişkenler için sonuçlar n (%) olarak ifade edildi. Kantitatif veriler için sonuçlar ortalama ± SE (min-mak) olarak ifade edildi. PSK: Progresyonsuz Sağ kalım, GSK: Genel Sağ Kalım, VKİ: Vücut Kitle İndeksi.

3.1.1.1.Primer Tümör Lokalizasyonuna Göre Hasta Karakteristikleri

Primer tümörün lokalizasyonuna (sağ kolon veya sol kolon) göre hasta karakteristikleri **Tablo 3.2** 'te verilmiştir. Çalışmamızda kadınlarda sol; erkeklerde ise sağ kolon kanseri daha yüksek oranda tespit edilmiştir.

Hastaların sigara kullanımlarının sağ ve sol kolon kanserindeki dağılımlarını etkileyip etkilemediğini belirlenmesi amacıyla, KKK teşhisi öncesi ve tedavi sürecinde sigara kullanan ve hiç sigara kullanmayan hastalar primer tümörün yerine göre birbiri ile karşılaştırılmıştır ve gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Metastatik kolon kanseri olan hastaların dağılımları sağ ve sol kolon kanseri olma durumuna göre birbirleri ile kıyaslandığında metastazın sağ kolon hastalarında daha fazla görülmekle birlikte sağ kolon ile aradaki farkın istatistiksel anlamlı olmadığını gözlenmiştir.

K-RAS mutasyonuna sahip hasta sıklığını sağ kolonda sol kolona kıyasla daha yüksek tespit ettik ($p=0.001$). Lojistik regresyon analizinde de KRAS pozitif olma durumu artan sağ kolon kanseri riski ile ilişkili bulunmuştur (OR:5.34, %95 CI:1.95- 14.58, $p=0.001$, veriler tabloda yer almamaktadır). Sadece 1 hastada mutant olduğu tespit edilen B-RAF geni gruplar arasında istatistiksel analiz için karşılaştırılamadı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların alkol kullanımları sağ ve sol kolon kanserli vakalarda kıyaslandığında, alkol kullanmayanların sıklığının sol kolon kanserli grupta sağ kolon kanserli gruba kıyasla yüksek olduğu belirlendi ($p=0.003$). Hasta ölümlerinin sol kolonda daha yüksek olduğu belirlendi.

DPYD gen polimorfizmlerine dayanarak oluşturduğumuz *DPYD* fenotiplerinin görülme sıklıkları sağ kolon kanserli hastalarda normal, orta düzey ve zayıf metabolizörler için sırası ile %72.7, %22.7 ve %4.5 iken; sol kolon kanserli hastalar için %66.7, %28.4 ve %4.9 şeklinde gözlemlendi. *DPYD* fenotip dağılımlarının sağ veya sol kolon kanserlerinde istatistiksel anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı ($p=0.86$).

5-FU yan etki seviyesi 0-2 aralığında olan hastaların sağ ve sol kolondaki dağılımları sırası ile %72.7 ve %75.3; 3-4 aralığında olan hastaların ise %27.3 ve %24.7 olarak tespit edilmiş olup primer tümör lokalizasyonu ile 5-FU kaynaklı yan etkiler arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p=0.79$).

Tablo 3.2: Primer tümörün lokasyonuna (sağ kolon, sol kolon) dayalı hasta özellikleri

Parametre	Primer Tümör Lokasyonu		
	Sağ Kolon, n (%)	Sol Kolon, n (%)	p
Cinsiyet			
Kadın	7 (31.8)	38 (46.9)	0.21
Erkek	15 (68.2)	43 (53.1)	
Yaş (yıl)	63.91 ± 2.3 (42-79)	58.52 ± 1.3 (28-84)	0.06
VKİ	25.4 ± 6.2 (15.1-40.57)	25.9 ± 0.5 (17.8-41.0)	0.49
Sigara Kullanımı, n (%)			
Hayır	11(50.0)	33 (40.7)	0.55
Evet	3 (13.6)	8 (9.9)	
Eski Kullanıcı	8 (36.4)	40 (49.4)	
PSK (Ay)	12.86 ± 2.4(3-44)	12.64 ± 9.5(3-49)	0.89
GSK (Ay)	22.05 ± 3.4(4-57)	23.04 ± 2(2-91)	0.99
Metastaz, n (%)			
Yok	2 (9.10)	17 (21.0)	0.35
Var	20 (90.9)	64 (79.0)	
K-RAS Mutant, n (%)	14 (63.6)	20 (24.7)	0.001
DPYD Fenotip			
Normal Metabolizör	16 (72.7)	54 (66.7)	0.86
Orta-düzey Metabolizör	5 (22.7)	23 (28.4)	
Zayıf Metabolizör	1 (4.5)	4 (4.9)	
5-FU Yan Etki Seviyesi			
0-2	16 (72.7)	61 (75.3)	0.79
3-4	6 (27.3)	20 (24.7)	
Alkol, n (%)			
Hayır	13 (61.9)	66 (89.2)	0.003
Evet	8 (38.1)	8 (10.8)	
Ölüm, n (%)	7 (33.3)	29 (39.2)	0.62

Kategorik değişkenler için sonuçlar n (%) olarak ifade edildi. Kantitatif veriler için sonuçlar ortalama ± SE (min-maks) olarak ifade edildi. Değişkenler gruplar arasında χ^2 testi ile karşılaştırıldı. PSK: Progresyonsuz Sağ Kalım, GSK: Genel Sağ Kalım, VKİ: Vücut Kitle İndeksi.

Kaplan Meier-Log rank analizi ile sağ ve sol kolon kanseri olan hastalarda sağ kalım süreleri oranlarının farkına bakıldı. Çalışma grubumuzdaki sağ ve sol kolon kanseri

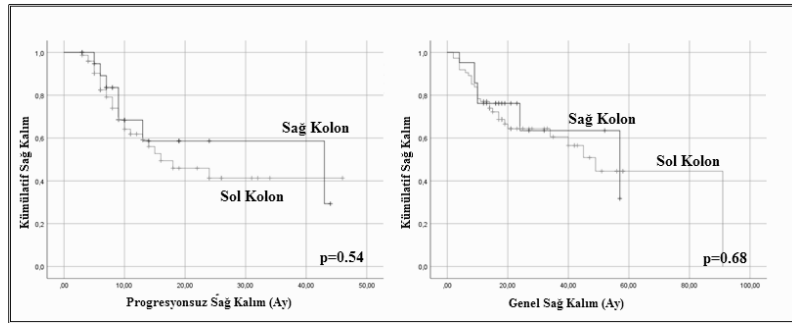
hastaların progresyonsuz ve genel sağ kalım süreleri **Tablo 3.3**'de verilmiştir. Analizler sonucunda ortalama progresyonsuz sağ kalım süresi sağ kolon için 29.13 ± 4.70 (%95 CI:19.94-38.32); sol kolon için 25.28 ± 2.7 (%95 CI:19.89-30.67) olarak belirlendi. Sağ ve sol kanseri hasta gruplarında sağ kalım eğrilerinin istatistiksel karşılaştırılması sonucu anlamlı bir fark saptanmadı (Log rank=0.38, p=0.54) (**Şekil 3.1**).

Tablo 3.3: KRK hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalım sürelerinin sağ ve sol kolon kanseri olma durumlarına göre dağılımları

Primer Tümörün Yeri	Progresyonsuz Sağ Kalım	Log rank	p	Genel Sağ Kalım	Log rank	p
Sağ Kolon	29.13 ± 4.70 (19.94-38.32)	0.38	0.54	41.24 ± 5.98 (29.50-52.97)	0.17	0.68
Sol Kolon	25.28 ± 2.75 (19.90-30.67)			52.78 ± 5.74 (41.53-64.04)		

Değerler, ortalama $\pm$ standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

Çalışma grubumuzda ye alan KRK hastalarının ortalama sağ kalım süreleri sağ kolon için 41.24 ± 5.98 (%95 CI: 29.50-52.97); sol kolon için 52.78 ± 5.74 (%95 CI: 41.53-64.04) olarak belirlendi. Sağ ve sol kanseri hasta gruplarında sağ kalım eğrilerinin istatistiksel karşılaştırılması sonucu anlamlı bir fark saptanmadı (Log rank=0.17, p=0.68) (**Şekil 3.1**).



Şekil 3.1: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalım sürelerinin primer tümörün yerine göre dağılımları

3.1.1.2. Metastaz Durumuna Göre Hasta Karakteristikleri

Hasta karakteristiklerinin metastaz durumuna göre dağılımı **Tablo 3.4**'te verilmiştir. Çalışma grubumuzdaki kadın hastaların %57.9'unda metastaz olmadığı %40.5'inde

metastaz olduğu tespit edildi. Erkek hastalarda ise %42.1'inde metastazın olmadığı; %59.5'inde metastaz olduğu tespit edildi. Metastatik hastalarda erkek bireylerin sıklığı kadın bireylere göre yüksek olsa da cinsiyetin metastaz durumuna göre olan dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.16$).

Metastatik olmayan 36 ile 76 yaşları arasındaki hastaların yaş ortalaması 56.42 iken metastatik olan 28 ile 84 yaşları arasındaki hastaların yaş ortalaması 60.4'tür. Metastatik ve metastatik olmayan bireylerin yaş dağılımları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.18$).

Metastatik olmayan VKİ ortalaması 27.53 iken metastatik hastaların VKİ ortalaması 25.41'dir. VKİ'nin metastaz varlığına göre olan dağılımı istatistiksel anlam sınırına yakın olarak tespit edilmiştir ($p=0.08$).

Hastaların sigara kullanım durumlarının metastazı etkileyip etkilemediğini ortaya çıkarmak için, KRK teşhisi öncesi ve tedavi sürecinde sigara kullanan ve hiç sigara kullanmayan hastaların sigara kullanım durumları kendi içerisinde karşılaştırıldı. KRK teşhisi öncesi sigara kullanmayan hastaların dağılımı metastatik olmayanlarda %57.9 iken metastatik olanlarda %39.3'tür. Sigara kullanan hastaların dağılımı metastatik olmayanlarda %10.5 iken metastatik olmayanlarda %10.7'dir. KRK teşhisi öncesi sigara kullanan hastaların dağılımı metastatik olmayanlarda %31.6 iken metastatik olanlarda %50.0'dır. Tedavi sürecinde sigara kullanan hastalar ile daha önceden sigara kullanmış olan hastalarda metastaz oranının sigara kullanmamış hastalara göre daha yüksek olduğu görülse de gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p=0.30$).

Hastalardaki K-RAS mutasyon varlığının metastaz durumu ile kıyaslanması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir değer elde edilmedi ($p=0.49$). Ancak K-RAS mutasyonu taşıyan metastatik hastaların frekansının (%34.5) metastatik olmayanlara göre (%26.3) çok daha yüksek olduğu tespit edildi.

DPYD fenotip dağılımları metastaz durumlarına göre kendi içlerinde karşılaştırıldı. Metastatik olmayan hastalarda normal metabolizörler %57.9, orta düzey metabolizörler %31.6 ve zayıf metabolizörler %10.5 olarak bulundu. Metastatik olan hastalarda ise normal metabolizörler %70.2, orta düzey metabolizörler %26.2 ve zayıf metabolizörler

%3.6 olarak tespit edildi. DPYD fenotip dağılımlarının metastaz gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmadı.

5-FU yan etki seviyesi 0-2 aralığında olan hastaların %73.8'i, 3-4 aralığında olan hastaların ise %26.2'si metastatik olup, hastaların metastaz durumları ile 5-FU yan etki seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki tespit etmedik ($p=0.78$).

Alkol kullanan 16 hastanın 14'ünde metastaz tespit edilirken genel anlamda alkol kullanımı ile metastaz arasında istatistiksel anlamda bir fark görülmedi. Metastaz durumu ile hastaların ölümleri karşılaştırıldığında beklenildiği gibi metastaz olan hastalarda ölüm oranının daha yüksek olduğu saptandı ($p=0.04$).



Tablo 3.4: Hasta karakteristiklerinin metastaz durumuna göre dağılımları

	Metastaz		p
	Yok	Var	
Cinsiyet, n (%)			
Kadın	11 (57.9)	34 (40.5)	0.16
Erkek	8 (42.1)	50 (59.5)	
Yaş	56.42 ± 11.15(36-76)	60.4 ± 11.74 (28-84)	0.18
VKİ	27.53 ± 4.6 (22.31-40.35)	25.41 ± 5.06 (15.05-41.01)	0.08
Sigara Kullanımı, n (%)			
Hayır	11 (57.9)	33 (39.3)	0.30
Evet	2 (10.5)	9 (10.7)	
Eski Kullanıcı	6 (31.6)	42 (50.0)	
Primer Tümörün Yeri, n (%)			
Sağ Kolon	2 (10.5)	20 (23.8)	0.35
Sol Kolon	17 (89.5)	64 (76.2)	
K-RAS Mutant, n (%)			
0	14 (73.7)	55 (65.5)	0.49
1	5 (26.3)	29 (34.5)	
DPYD Fenotip, n (%)			
Normal Metabolizör	11 (57.9)	59 (70.2)	0.39
Orta-düzey Metabolizör	6 (31.6)	22 (26.2)	
Zayıf Metabolizör	2 (10.5)	3 (3.6)	
5-FU Yan Etki Seviyesi			
0-2	15 (78.9)	62 (73.8)	0.78
3-4	4 (21.1)	22 (26.2)	
Alkol Kullanımı n (%)			
0	14 (87.5)	65 (82.3)	0.60
1	2 (12.5)	14 (17.7)	
Ölüm n (%)	1 (6.3)	35 (44.3)	0.004

Kategorik değişkenler için sonuçlar n (%) olarak ifade edildi. Kantitatif veriler için sonuçlar ortalama ± SD (min-maks) olarak ifade edildi. PSK: Progresyonsuz Sağ Kalım, GSK: Genel Sağ Kalım, VKİ: Beden Kitle İndeksi.

3.1.2. Kontrol Grubu Karakteristikleri

Araştırmamıza dahil olan gönüllü KRK hastası olmayan bireylerin demografik dağılımları **Tablo 3.1**'de verilmiştir. Kontrol grubu 37'si kadın (%45.1) ve 49'u

(%45.8) erkek bireyler olmak üzere toplamda 86 gönüllüden oluşmaktadır. Kontrol grubu bireylerinin VKİ değerleri 18 ile 47 arasında değişmekte olup ortalama 27.26 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubundaki gönüllülerin 38 (%43.3)'i çalışma sırasında; 15'i (%23.8) ise çalışma öncesinde eski sigara kullanıcısı olduğunu bildirmiş olup 29 (%72.5) gönüllü ise hiç sigara içmediklerini beyan etmişlerdir.

3.2. *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* Genlerine Ait Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi

3.2.1. *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* Polimorfizmlerinin Genel Dağılımları

Çalışmada flouro-pirimidin metabolizmasında rol oynayan 11 *DPYD* (85T>C, 1601G>A, 496A>G, 234-123 G>C, 299-302delTCAT, 775A>G, 1129-5923C>G, 1587 T>C, 1679 T>G/1679 T>A, 1905+1G>A, 2846 A>T), 2 *MTHFR* (677C>T ve 1298A>C) ve 1 *TYMS* (14946bp ins/del) genlerine ait 14 farklı gen polimorfizmi analiz edilmiştir. *DPYD* gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıkları **Tablo 3.5**'de verilmiştir. Araştırmamız dahilinde olan *DPYD* ve *MTHFR* gen polimorfizmlerine ait allel sıklıklarının *Hardy Weinberg* dengesine uyum gösterdiğini, yalnızca *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmine ait allel dağılımlarının ise sınır değerinde olduğunu tespit ettik.

Genotip analizleri sonucunda *DPYD* 299-302delTCAT, *DPYD* 1587 T>C, *DPYD* 1679 T>G/ 1679 T>A ve *DPYD* 2846 A>T polimorfizimleri için 103 hastanın tamamı homozigot yaygın tip olup heterozigot ya da mutant bireyler tespit edilmemiştir. *DPYD* 234-123 G>C ve *DPYD* 775A>G polimorfizimleri için homozigot mutant genotipe bir hastaya rastlanmamış olup, sadece 1 hastada heterozigot genotipe tespit edilmiştir. *DPYD* 1129-5923C>G polimorfizminde ise homozigot mutant genotipli birey saptanmazken heterozigot genotipli 3 hasta belirlenmiştir. *DPYD* 1905+1G>A gen bölgesinde de yalnızca 2 hastada heterozigot formda varyant allel tespit edilirken mutant bireylere rastlanmamış olup 101 hasta homozigot yabanıl genotipe sahiptir.

Yukarıda adı geçen *DPYD* 299-302delTCAT, *DPYD* 1587 T>C, *DPYD* 1679 T>G/ 1679 T>A, *DPYD* 2846 A>T, 234-123 G>C, *DPYD* 775A>G, *DPYD* 1129-5923C>G ve *DPYD* 1905+1G>A varyant allellerin sıklığı çok düşük olduğundan progresyonsuz

sağ kalım, genel sağ kalım, primer tümörün yeri, metastaz varlığı gibi değişkenler üzerindeki mevcut etkilerini araştırmak amacı ile istatistiksel analiz yapılamamıştır.

Çalışmada yer alan diğer *DPYD* polimorfik bölgelerinden olan 85T>C polimorfizmi için hastaların 56'sı (%54.4) homozigot yabanıl (TT), 40'ı (%38.8) 1 heterozigot (TC) ve 7'si (%6,8) homozigot mutant (CC) genotipte tespit edilmiştir. 85T>C polimorfizmine ait mutant allel frekansı 0.26 olarak tespit edilmiştir.

DPYD 496A>G bölgesinde hastaların 78'i (%75.7) homozigot yabanıl (AA) 21'i (%20.4) heterozigot (AG) ve 4'ü (%3.9) ise homozigot mutant (GG) olarak saptanmıştır. Mutant allel frekansı ise 0.141 olarak tespit edilmiştir.

DPYD 1601G>A bölgesinde ise 97 kişide (%94.2) varyant allel (GG) bulunmazken, 6 kişide (%5.8) ise heterozigot formda (GA) varyant allel tespit edilmiştir. Çalışma grubumuzda homozigot mutant (AA) bireyler tespit etmedik. *DPYD* 1601G>A varyant allel frekansı ise 0.029 olarak tespit edilmiştir.

DPYD 1129-5923C>G polimorfizmi genotip dağılımları homozigot yaygın (CC) ve heterozigot (CG) için sırası ile %97.1 ve %2.9 olarak tespit edilmiştir. Çalışma grubumuzda homozigot mutant (GG) bireyler tespit etmedik. 1129-5923C>G varyant allel frekansı ise 0.015 olarak tespit edilmiştir.

DPYD 1905+1G>A polimorfizmine ait homozigot yaygın (GG) ve heterozigot (GA) genotiplerinin sıklıkları sırası ile %98.1 ve %1.9 olarak tespit edilmiştir. Çalışma grubumuzda homozigot mutant (AA) bireylere rastlanmadı ve 1905+1G>A varyant allel frekansı 0.010 olarak belirlendi.

Tablo 3.5: *DPYD* polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıklarının dağılımları

Gen Varyasyonu	Genotip Frekansı (%)	MAF	χ^2	p
<i>DPYD</i> 85T>C				
TT	56 (54.4)	0.26	0.002	0.97
TC	40 (38.8)			
CC	7 (6.8)			
<i>DPYD</i> 496A>G				
AA	78 (75.7)	0.141	2.546	0.11
AG	21 (20.4)			
GG	4 (3.9)			
<i>DPYD</i> 1601G>A				
GG	97 (94.2)	0.029	0.093	0.76
GA	6 (5.8)			
	0 (0.0)			
<i>DPYD</i> 234-123G>C				
GG	102 (99.0)	0.005	0.002	0.96
GC	1 (1.0)			
<i>DPYD</i> 775A>G				
AA	102 (99.0)	0.005	0.002	0.96
AG	1 (1.0)			
<i>DPYD</i> 1129-5923C>G				
CC	100 (97.1)	0.015	0.022	0.88
CG	3 (2.9)			
<i>DPYD</i> 1905+1G>A				
GG	101 (98.1)	0.010	0.010	0.92
GA	2 (1.9)			

MAF: Minor allel frekansı, p ve χ^2 *Hardy-Weinberg* dengesine uygunluk analizi sonuçlarını gösterir. Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

MTHFR ve *TYMS* polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıkları ise **Tablo 3.6'**da verilmiştir. Çalışma grubumuzda *MTHFR* 677C>T polimorfizmine ait homozigot yaygın (CC), heterozigot (CT) ve homozigot mutant (TT) genotip sıklıkları sırası ile %45.6, %44.7 ve %9.7 olarak tespit edilmiştir. *MTHFR* 677C>T polimorfizmi varyant allel frekansı ise 0.320 olarak belirlendi.

MTHFR 1298A>C polimorfizmine ait genotip dağılımları homozigot yabanıl (AA) heterozigot (AC) ve homozigot mutant (CC) için sırası ile %44.7, %44.7 ve %10.7 olarak tespit edilmiştir. *MTHFR* 1298A>C polimorfizmi varyant allel frekansı ise 0.330 olarak belirlendi.

Çalışma gruplarımız içerisinde en heterojen genotip dağılımına sahip olan *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmi olmuştur. Hastaların %16.5'si homozigot yabanıl (-6bp/-6bp), %59.2'si heterozigot (-6bp/+6bp) ve %24.3'ü homozigot mutant (+6bp/+6bp) genotipte saptanmış olup varyant allel frekansı ise 0.539 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.6: *MTHFR* ve *TYMS* polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıklarının dağılımları

Gen Varyasyonu	Genotip Frekansı (%)	MAF	χ^2	p
<i>MTHFR</i> 677C>T				
CC	47 (45.6)	0.320	0.067	0.79
CT	46 (44.7)			
TT	10 (9.7)			
<i>MTHFR</i> 1298A>C				
AA	46 (44.7)	0.330	0.010	0.92
AC	46 (44.7)			
CC	11 (10.7)			
<i>TYMS</i> 14946bp ins/del				
-6bp/-6bp	17 (16.5)	0.539	3.783	0.05
-6bp/+6bp	61 (59.2)			
+6bp/+6bp	25 (24.3)			

MAF: Minor allel frekansı, p ve χ^2 Hardy-Weinberg dengesine uygunluk analizi sonuçlarını gösterir. Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.2. *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* Polimorfizmlerinin Hastalarda Gözlenen 5-FU-Kapesitabin Kaynaklı Yan Etkiler ile İlişkileri

Tablo 3.7'de 5-FU veya Kapesitabin tedavisi sırasında hekim tarafından hastalarda gözlenen yan etkiler ve bu yan etkilere bağlı olarak tedavide yapılan değişimler

verilmiştir. Çalışma grubuna dahil edilen 10 (%9.7) hastada bulantı-kusma, 20 (%19.4) hastada halsizlik, 2 hastada (%1.9) mukozit, 6 (%5.8) hastada ishal, 5 (%4.9) hastada el-ayak sendromu, 10 (%9.7) hastada nötropeni ve 1 hastada (%1) vasküler olay tespit edilmiştir.

Tablo 3.7: 5-FU veya kapesitabin tedavisi kaynaklı yan etkiler ve tedaviye etkileri

Gözlenen Yan Etki	Gözlenen Hasta Sayısı, (%)		
	Total	Doz Azaltımı	Doz Gecikmesi
Halsizlik	20 (19.4)	16 (15.5)	4 (3.9)
Nötropeni	10 (9.7)	4 (3.9)	6 (5.8)
Bulantı-Kusma	10 (9.7)	7 (6.8)	3 (2.9)
Diyare	6 (5.8)	3 (2.9)	3 (2.9)
Mukozit	2 (1.9)	2 (1.9)	-
El Ayak Sendromu	5 (4.9)	5 (4.9)	-
Vasküler Olay	1 (1)	1 (1)	-
Toplam	54 (52.4)	38 (36.9)	16 (15.5)

Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi.

Yaygın toksisite kriterleri yönergelerine (NCI-CTC AE sürüm 5.0) dayanarak hastalarda tespit edilen 5-FU ve kapesitabin tedavisi sonrası tespit edilen yan etkileri şiddetlerine göre derecelendirdik. Derecelendirdiğimiz yan etkileri seviye 0-2 ve seviye 3-4 olarak ikiye ayırdık ve analizlerimize bu şekilde devam ettik.

DPYD 85T>C, *DPYD* 496A>G, *DPYD* 1601G>A, 1129-5923C>G ve 1905+1G>A polimorfizmlerine ait genotiplerin 5-FU kaynaklı seviye 0-2 ve seviye 3-4 yan etkiler arasındaki dağılımları **Tablo 3.8**'de verilmiştir.

DPYD 85T>C genotiplerinin 5-FU kullanımından kaynaklanan seviye 0-2 ve seviye 3-4 yan etkilerin dağılımları TT için %80.4 ve %19.6; TC için %67.5 ve %32.5; CC için %71.4 ve %28.6 olarak tespit edildi (p=0.35). CC genotipe kıyasla TT+TC genotiplerine sahip hastaların sıklıkları ile, TT genotipe kıyasla TC+CC genotiplerinin sıklıkları seviye 0-2 ve seviye 3-4 yan etki grupları arasında önemli bir fark göstermemiştir (p=0.83 ve p=0.15, sırası ile).

496A>G polimorfizmine ait genotiplerin 5-FU kullanımından kaynaklanan seviye 0-2 ve seviye 3-4 yan etkiler arasındaki dağılımları kodominant modelde AA genotipi için sırası ile %79.5 ve %20.5; AG için sırası ile %52.4 ve %47.6 ve GG genotipi için %100.0 ve %0.0 olarak tespit edildi. Kodominant modelde 496A>G polimorfizmi genotiplerinin seviye 0-2 ve seviye 3-4 yan etki grupları arasındaki dağılımları istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur (**p=0.02**). Kodominant modelde gözlemlediğimiz bu ilişki resesif modelde tespit edilmemiştir (p=0.57). Dominant modelde ise AG+GG genotiplerinin sıklığı seviye 0-2 grubunda daha yüksek bulunmuştur (p=0.05).

1601 G>A genotiplerinin seviye 0-2 ve 3-4 yan etkileri arasındaki dağılımları, sırası ile GG için %73.2 ve %26.8; GA için %100.0 ve %0.0 olarak tespit edildi (p=0.33). Bu polimorfizm için homozigot mutant bireylerin tamamı seviye 0-2 grubunda olduklarından dolayı istatistiksel analiz yeterince verimli olmamıştır.

DPYD 1905+1G>A polimorfizmine ait genotiplerin seviye 0-2 ve 3-4 yan etkileri arasındaki dağılımları GG genotipleri için sırası ile %76.2 ve %23.8; GA genotipler için sırası ile %0.0 ve %100.0 olarak tespit ettik. Her ne kadar çalışma grubumuzda varyant allel taşıyan tüm hastalarda seviye 3-4 yan etki gözlenmiş olsa da hasta sayısının düşük olmasından dolayı *DPYD* 1905+1G>A polimorfizmlerine ait genotip dağılımları ile sınıflandırılmış yan etki grupları arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptayamadık (p=0.06).

DPYD 1129-5923C>G polimorfizmine ait genotiplerin seviye 0-2 ve seviye 3-4 yan etki gruplarındaki dağılımları CC için sırası ile %76.0 ve %24.0; GC için ise %33.3 ve %66.7 olarak tespit edilmiştir. *DPYD* 1129-5923C>G polimorfizmi ile 5-FU kaynaklı yan etkiler arasında dikkate değer bir ilişki saptanmamıştır (p=0.16).

Tablo 3.8: *DPYD* polimorfizmlerine ait genotiplerin 5-FU kaynaklı seviye 0-2 ve seviye 3-4 yan etkilere göre dağılımları

	n (%)	Seviye 0-2	Seviye 3-4	p
DPYD 85T>C				
TT	56 (54.37)	45 (80.4)	11 (19.6)	0.35
TC	40 (38.83)	27 (67.5)	13 (32.5)	
CC	7 (6.80)	5 (71.4)	2 (28.6)	
TT+TC/ CC		72 (75.0)	24 (25.0)	0.83
TC+CC/ TT		32 (68.1)	15 (31.9)	0.15
DPYD 496A>G				
AA	78 (75.73)	62 (79.5)	16 (20.5)	0.02
AG	21 (20.39)	11 (52.4)	10 (47.6)	
GG	4 (3.88)	4 (100.0)	0 (0.0)	
AA+AG/GG		73 (73.7)	26 (26.3)	0.57
AG+GG/AA		15 (60.0)	10 (40.0)	0.05
DPYD 1601G>A				
GG	97 (97.17)	71 (73.2)	26 (26.8)	0.33
GA	6 (5.83)	6 (100.0)	0 (0.0)	
DPYD 1905+1G>A				
GG	101 (98.06)	77 (76.2)	24 (23.8)	0.06
GA	2 (1.94)	0 (0.0)	2 (100.0)	
DPYD 1129-5923C>G				
CC	100 (97.09)	76 (76.0)	24 (24.0)	0.16
CG	3 (2.91)	1 (33.3)	2 (66.7)	

Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

MTHFR 677C>T, *MTHFR* 1298A>C ve *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmlerine ait genotiplerin 5-FU kaynaklı seviye 0-2 ve seviye 3-4 yan etkiler arasındaki dağılımları **Tablo 3.9**'da verilmiştir.

MTHFR 677C>T genotiplerinin seviye 0-2 ve 3-4 yan etkiler arasındaki dağılımları, sırası ile CC için %72.3 ve %27.7; CT için %78.3 ve %21.7; TT için %70.0 ve %30.0 olarak tespit edildi. Sonuçlarımıza göre *MTHFR* 677C>T polimorfizmi genotipleri kodominant, resesif ve dominant modellerde seviye 0-2 ve seviye 3-4 toksisiteler ile ilişkili bulunmamıştır ($p=0.75$, $p=0.71$ ve $p=0.60$, sırası ile).

MTHFR 1298A>C genotiplerinin seviye 0-2 ve 3-4 yan etkiler arasındaki dağılımları, sırası ile AA için %78.3 ve %21.7; AC için %71.7 ve %28.3; CC için %72.7 ve %27.3 olarak tespit edildi. Sonuçlarımıza göre *MTHFR* 1298A>C polimorfizmi genotipleri kodominant, resesif ve dominant modellerde seviye 0-2 ve seviye 3-4 toksisiteler ile ilişkili bulunmamıştır (p=0.76, p=0.87 ve p=0.46, sırası ile).

TYMS 14946bp ins/del genotiplerinin seviye 0-2 ve 3-4 yan etkiler arasındaki dağılımları -6bp/-6bp için sırası ile %70.6 ve %29.4; -6bp/+6bp için sırası ile %78.7 ve %21.3 ve +6bp/+6bp için sırası ile %68.0 ve %32.0 olarak tespit edildi. *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmi genotipleri kodominant, resesif ve dominant modellerde seviye 0-2 ve seviye 3-4 toksisiteler ile ilişkili bulunmamıştır (p=0.53, p=0.37, p=0.76, sırası ile).

Tablo 3.9: *MTHFR* ve *TYMS* polimorfizmlerine ait genotiplerin 5-FU kaynaklı seviye 0-2 ve seviye 3-4 yan etkilere göre dağılımları

	n (%)	Seviye 0-2	Seviye 3-4	p
<i>MTHFR</i> 677C>T				
CC	47 (45.63)	34 (72.3)	13 (27.7)	0.75
CT	46 (44.66)	36 (78.3)	10 (21.7)	
TT	10 (9.71)	7 (70.0)	3 (30.0)	
CC+CT/ TT		70 (75.3)	23 (24.7)	0.71
CT+TT/ CC		43 (76.8)	13 (23.2)	0.60
<i>MTHFR</i> 1298A>C				
AA	46 (44.66)	36 (78.3)	10 (21.7)	0.76
AC	46 (44.66)	33 (71.7)	13 (28.3)	
CC	11 (10.68)	8 (72.7)	3 (27.3)	
AA+AC/ CC		69 (75.0)	23 (25.0)	0.87
AC+CC/ AA		41 (71.9)	16 (28.1)	0.46
<i>TMYS</i> 1494 6bp ins/del				
-6bp/-6bp	17 (16.50)	12 (70.6)	5 (29.4)	0.53
-6bp/+6bp	61 (59.22)	48 (78.7)	13 (21.3)	
+6bp/+6bp	25 (24.27)	17 (68.0)	8 (32.0)	
(-6bp/-6bp)+(-6bp/+6bp) /(+6bp/+6bp)		60 (76.9)	18 (23.1)	0.37
(-6bp/+6bp)+(+6bp/+6bp)/ (-6bp/-6bp)		65 (75.6)	21 (24.4)	0.76

Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Uygulanan kemoterapinin kapeasitabin ya da 5-FU şeklinde olması gözlenen yan etkilerin şiddeti ile ilişkili bulunmamıştır ($\chi^2=0.508$, $p=0.467$).

3.2.2.1. DPD Fonksiyon Kaybı ya da Azalmasına Yol Açan Nadir Varyantları Taşıyan Hastalar

DPYD polimorfizmleri ve floropirimidinlerin gen-ilaç etkileşimini ortaya koymak için 2019 yılında yayınlanan Hollanda Farmakogenetik Çalışma Grubu Kılavuzu'na (DPWG) (Lunenburg ve ark., 2020) göre c.1905+1G>A ve c.1679T>G polimorfizmleri DPD enziminin fonksiyonunun tamamen ortadan kalkmasına, c.2846A>T ve c.[1236G>A;1129–5923C>G] (hapB3) polimorfizmlerinin ise DPD enzimin fonksiyonunda azalmaya yol açmaktadır.

Çalışmamızda *DPYD* 1905 +1G>A (*2A) heterozigot formda varyant allel taşıyan 2 hasta tespit ettik. Bu hastalardan ilkinin (Vaka 1) metastatik ve sol kolon kanseri olup 5-FU tedavisi görmekteydi. PSK ve GSK süreleri sırası ile 13 ve 25 ay olarak tespit ettik. Bu hastada 5-FU kullanımından kaynaklanan vasküler olay gelişmiş ve tedavi sürecinde 5-FU doz azaltılmasına gidilmiştir. Heterozigot formda varyant taşıyan diğer hasta (Vaka 2) ise metastatik sol kolon kanseri olup 5-FU tedavisi almıştır. PSK ve GSK süreleri sırası ile 5 ve 6 olarak tespit ettik. Hastada nötropeni gözlenmiş olup tedavi sürecinde 5-FU doz azaltılmasına gidilmiştir ve tedavisi tamamlanmadan hayatını kaybetmiştir. DPD'de fonksiyon kaybına yol açabilecek varyanta sahip bu hastanın diğer *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* genotip bilgileri **Tablo 3.10**'da verilmiştir.

DPD fonksiyon kaybına yol açabilecek diğer bölge olan c.1679T>G (*13) ve 2846A>T varyantları çalışma grubumuz içinde tespit edilmedi.

DPYD 1129–5923C>G için ise 3 hastada heterozigot formda varyant tespit edilmiştir. Bu hastalardan ilki (Vaka 3), metastatik sağ kolon kanseri olup PSK ve GSK süreleri sırası ile 7 ve 10 aydır. 5-FU tedavisi altında olan bu hastada ilaç kaynaklı nötropeni geliştiği ve ilaç tedavisine bir süre ara verildiği tespit edildi. Tedavi süreci tamamlanmadan hasta hayatını kaybetmiştir. İkinci hasta (Vaka 4) metastatik sol kolon

kanseri olup PSK ve GSK süreleri sırası ile 8 ve 11 aydır. Kapesitabin tedavisi almış olan bu hastada ilaç kaynaklı nötropeni görülmüş ve ilaç tedavine bir süre ara verilmiştir. Tedavi süreci tamamlanmadan hayatını kaybetmiştir. Üçüncü hasta (Vaka 5) ise metastatik sağ kolon kanseri olup PSK ve GSK süreleri sırası ile 24 ve 32 aydır. 5-FU tedavisi aldığı belirlenen bu hastada ilaç kullanımı sonrası bulantı ve kusma gözlenmiş ve 5-FU doz azaltılmasına gidildiği tespit edilmiştir. 5 hastaya ait diğer *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* genotip bilgileri **Tablo 3.10**'da verilmiştir. Tabloya tüm hastalarda görülen yaygın tip genotipler eklenmemiştir.

Tablo 3.10: DPD enziminin yapısında fonksiyon kaybı ya da azalmasına yol açan varyantlara sahip 5 hastaya ait genotip verileri

	<i>DPYD</i>			<i>MTHFR</i>		<i>TYMS</i>
	85T>C	1129-5923C>G	1905+1G>A	677C>T	1298A>C	14946 ins/del
Vaka 1	1	0	1	0	1	1
Vaka 2	0	0	1	0	2	1
Vaka 3	1	1	0	1	0	2
Vaka 4	1	1	0	0	0	1
Vaka 5	1	1	0	1	0	1

0: Varyant allel yok. 1: 1 varyant allel. 2: 2 varyant allel

3.2.2.2. 5-FU Tedavisi Sonrası Nötropeni Görülen Hastaların Genotipleri

Çalışmamızda 5-FU tedavisi sonrası 10 hastada nötropeni tespit edildi. **Tablo 3.11**'de bu hastaların taşıdıkları varyantlar verilmiştir.

Tablo 3.11: 5-FU tedavisi sonrası nötropeni tespit edilen hastalar ve taşıdıkları varyantlar

	<i>DPYD</i>				<i>MTHFR</i>		<i>TYMS</i>
	85T>C	496A>G	1129-5923C>G	1905+1G>A	677C>T	1298A>C	1494ins/del
N1	1	1	0	0	1	1	1
N2	1	0	1	0	1	0	2
N3	0	0	0	0	0	1	1
N4	1	0	1	0	0	0	1
N5	1	1	0	0	1	0	1
N6	0	0	0	1	0	2	1
N7	1	0	0	0	1	1	0
N8	0	1	0	0	2	0	2
N9	0	0	0	0	0	0	2
N10	0	0	0	0	1	0	2

0: Varyant allel yok. 1: 1 varyant allel. 2: 2 varyant allel. N:Nötropeni.

3.2.2.3. 5-FU Tedavisi Sonrası El Ayak Sendromu Görülen Hastaların Genotipleri

Çalışmamızda 5-FU tedavisi sonrası 5 hastada el ayak sendromu tespit edildi. **Tablo 3.12'**de bu hastaların taşıdıkları varyantlar verilmiştir.

Tablo 3.12: 5-FU tedavisi sonrası el ayak sendromu tespit edilen hastalar ve sahip oldukları varyantlar

	<i>DPYD</i>		<i>MTHFR</i>		<i>TYMS</i>
	85T>C	496A>G	677C>T	1298A>C	T1494del
EAS 1	0	0	1	0	2
EAS 2	0	0	0	0	0
EAS 3	0	0	0	2	1
EAS 4	1	0	1	0	1
EAS 5	1	1	0	1	1

0: Varyant allel yok. 1: 1 varyant allel. 2: 2 varyant allel. EAS: El Ayak Sendromu

3.2.2.4. 5-FU Tedavisi Sonrası Mukozit Görülen Hastaların Genotipleri

Çalışmamızda 5-FU tedavisi sonrası 2 hastada mukozit tespit edildi. **Tablo 3.13**'da bu hastaların taşıdıkları varyantlar verilmiştir.

Tablo 3.13: 5-FU tedavisi sonrası mukozit tespit edilen hastalar ve sahip oldukları varyantlar

	<i>DPYD</i> 496A>G	<i>MTHFR</i> 677C>T	<i>MTHFR</i> 1298A>C	<i>TYMS</i> 1494ins/del
M1	0	2	0	2
M2	1	0	1	1

0: Varyant allel yok. 1: 1 varyant allel. 2: 2 varyant allel. M: Mukozit.

3.2.2.5. 5-FU Tedavisi Sonrası Diyare Görülen Hastaların Genotipleri

Çalışma grubumuzda 6 hasta diyare tespit edilmiştir. **Tablo 3.14**'de bu hastaların taşıdıkları varyantlar verilmiştir.

Tablo 3.14: 5-FU tedavisi sonrası diyare tespit edilen hastalar ve sahip oldukları varyantlar

	<i>DPYD</i>		<i>MTHFR</i>		<i>TYMS</i>
	85T>C	496A>G	677C>T	1298A>C	1494ins/del
D1	1	1	0	1	0
D2	0	0	0	1	2
D3	1	1	0	1	0
D4	1	0	1	1	1
D5	0	1	0	0	0
D6	1	0	1	1	1

0: Varyant allel yok. 1: 1 varyant allel. 2: 2 varyant allel. D: Diyare.

3.2.3. *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* Polimorfizmlerinin Primer Tümör Lokalizasyonu ile İlişkileri

DPYD 85T>C, *DPYD* 496A>G, *DPYD* 1601G>A polimorfizmlerine ait kodominant, resesif ve dominant modellerde genotiplerin sağ ve sol kolon kanserli vakalardaki dağılımları **Tablo 3.15**'de verilmiştir.

DPYD 85T>C'nin genotiplerinin sağ ve sol kolondaki dağılımları sırası ile TT için %21.4 ve %78.6; TC için %20 ve %80; CC için %28.6 ve %71.4 olarak belirlendi. 85T>C bölgesindeki genotiplerin primer tümör lokasyonuna göre dağılımları arasındaki fark kodominat ($p=0.88$), resesif ($p=0.64$) ve dominant ($p=0.98$) modellerde anlamlı bulunmadı.

DPYD 496A>G polimorfik bölgesine ait genotiplerin sağ ve sol kolon kanserlerindeki dağılımları sırası ile AA için %25.6 ve %74.4; AG için %4.8 ve %95.2; GG için ise %25 ve %75 şeklinde bulundu. *DPYD* 496A>G polimorfik bölgesine ait genotiplerin primer tümör lokasyonuna göre dağılımları arasındaki fark kodominat ($p=0.12$), resesif ($p=0.86$) modellerde anlamlı bulunmadı. Ancak AG+GG ve AA genotipleri kıyaslandığında dikkate değer bir ilişki tespit ettik ($p=0.09$). Buradan elde ettiğimiz sonuca dayanarak oluşturduğumuz ve cinsiyete göre düzenlenmiş lojistik regresyon modelinde 496 AG+GG genotipi sol kolon kanseri riski ile ilişkili bulundu (Düzenlenmiş OR:4.777 (%95 CI:1.007-22.661), $p=0.05$) (Veriler tablo olarak verilmedi).

DPYD 1601G>A genotiplerinin sağ ve sol kolondaki dağılımları; GG genotipi için sırası ile %21.6 ve %78.4; GA için %16.7 ve %83.3 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada 1601G>A için homozigot mutant genotipli hasta tespit edilmemiş olup, heterozigotların sayısı homozigot yabancıl genotipe göre oldukça düşük olduğu izlenmiştir. 1601G>A genotiplerinin sağ ve sol kolon kanserli hastalardaki dağılımları istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak 1 varyant allel taşıyan hasta sayısının sol kolonda sağ kolona göre daha fazla olduğu dikkat çekicidir.

Tablo 3.15: Primer tümörün konumuna (sağ kolon, sol kolon) dayalı kodominant, dominant ve resesif modelde *DPYD* polimorfizmlerinin genotip frekansları

	Sağ Kolon, n (%)	Sol Kolon, n (%)	p
<i>DPYD</i> 85T>C	12 (21.4)	44 (78.6)	
TT	8 (20.0)	32 (80.0)	0.88
TC	2 (28.6)	5 (71.4)	
CC			
TT+TC/CC	20 (20.8)	76 (79.2)	0.64
TC+CC/TT	10 (21.3)	37 (78.7)	0.98
<i>DPYD</i> 496A>G			
AA	20 (25.6)	58 (74.4)	0.12
AG	1 (4.8)	20 (95.2)	
GG	1 (25.0)	3 (75.0)	
AA+AG/GG	21 (21.2)	78 (78.8)	0.86
AG+GG/AA	2 (8.0)	23 (92.0)	0.09
<i>DPYD</i> 1601G>A			
GG	21 (21.6)	76 (78.4)	0.77
GA	1 (16.7)	5 (83.3)	

Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

MTHFR 677C>T ve *MTHFR* 1298A>C polimorfizmlerine ait kodominant, resesif ve dominant modellerde genotiplerin sağ ve sol kolon kanserli vakalardaki dağılımları **Tablo 3.16'**da verilmiştir.

MTHFR 677C>T genotiplerinin sağ ve sol kolon kanserlerindeki dağılımları CC genotipi için sırası ile %19.91 ve %80.9; CT için %26.1 ve %73.9; TT için %10 ve %90 olarak belirlenmiştir. 677C>T genotiplerinin sağ ve sol kolon kanserleri arasındaki dağılımları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak heterozigot veya homozigot mutant genotipte varyant allel taşıma oranının, özellikle homozigot mutantların tamamına yakının sol kolon kanserinde çok daha yüksek olduğunu tespit etsek de, dominant ve resesif modellere göre yapılan analizde istatistiksel anlamlı bir fark tespit etmedik.

MTHFR 1298A>C genotiplerinin sağ ve sol kolon kanserlerindeki dağılımı AA genotipi için sırası ile %21.7 ve %78.3; AC için %21.7 ve %78.3; CC için ise %18.2 ve 81.8 olarak bulduk. 1298A>C homozigot yaygın genotipler ile heterozigot genotiplerin sayısı sağ ve sol kolon kanserlerinde %100 benzer çıkmıştır. 1298A>C genotiplerinin kodominant (p=0.96), resesif (p=0.78) ve dominant (p=0.63) modellere göre sağ ve sol kolondaki dağılımlarını istatistiksel olarak anlamlı bulmadık.

Tablo 3.16: Primer tümörün konumuna (sağ kolon, sol kolon) dayalı kodominant, dominant ve resesif modelde *MTHFR* polimorfizmlerinin frekansları

	Sağ Kolon, n (%)	Sol Kolon, n (%)	p
<i>MTHFR</i> 677C>T			
CC	9 (19.1)	38 (80.9)	0.47
CT	12 (26.1)	34 (73.9)	
TT	1 (10.0)	9 (90.0)	0.69
CC+CT/TT	21 (22.6)	72 (77.4)	
CT+TT/CC	13 (23.2)	43 (76.8)	0.63
<i>MTHFR</i> 1298A>C			
AA	10 (21.7)	36 (78.3)	0.96
AC	10 (21.7)	36 (78.3)	
CC	2 (18.2)	9 (81.8)	
AA+AC/CC	20 (21.7)	72 (78.3)	0.78
AC+CC/AA	12 (21.1)	45 (78.9)	0.93

Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

TYMS 14946bp ins/del polimorfizmine ait kodominant, resesif ve dominant modellerde genotiplerin sağ ve sol kolon kanserli vakalardaki dağılımları **Tablo 3.17**'de verilmiştir.

Kodominant modelde *TYMS* 14946bp ins/del genotiplerini sağ ve sol kolondaki oranlarının kıyasladığımızda sırası ile -6bp/-6bp için %17.6 ve %82.4; -6bp/+6bp için %23 ve %77; +6bp/+6bp için %20 ve %80 olarak tespit ettik. 14946bp ins/del genotipleri ile tümör lokalizasyonu arasında kodominant, ve dominant modelde anlamlı bir ilişki olmadığını tespit ettik.

Tablo 3.17: Primer tümörün konumuna (sağ kolon, sol kolon) dayalı kodominant, dominant ve resesif modelde *TYMS* 14946bp ins/del genotip frekansları

	Sağ Kolon, n (%)	Sol Kolon, n (%)	p
<i>TYMS</i> 14946bp ins/del			
-6bp/-6bp	3 (17.6)	14 (82.4)	0.88
-6bp/+6bp	14 (23.0)	47 (77.0)	
+6bp/+6bp	5 (20.0)	20 (80.0)	
(-6bp/-6bp)+(-6bp/+6bp)/ (+6bp/+6bp)	17 (21.8)	61 (78.2)	0.85
(-6bp/+6bp)+(6bp/+6bp)/ (-6bp/-6bp)	19 (22.1)	67 (77.9)	0.68

Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.4. *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* Polimorfizmleri ve Metastaz İlişkisi

Analizlerimiz sonucunda genotipleri heterojenlik gösteren *DPYD* 85T>C, *DPYD* 496A>G, *DPYD* 1601G>A, *MTHFR* 677C>T, *MTHFR* 1298A>C ve *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmlerine ait genotiplerin metastaz varlığına göre dağılımları incelendi. *DPYD* polimorfik bölgelerinin metastatik ve metastatik olmayan hastalardaki dağılımları **Tablo 3.18**'de verilmiştir. **Tablo 3.18**'e dahil edilmese de *DPYD* 85T>C, *DPYD* 496A>G, *DPYD* 1601G>A, *MTHFR* 677C>T, *MTHFR* 1298A>C ve *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmleri ile metastaz yeri (karaciğer, akciğer, periton) arasında bir ilişki tespit edilmedi.

DPYD 85T>C polimorfizmine ait kodominant modelde genotip dağılımları metastatik olmayan hastalarda homozigot yaygın tip (AA), heterozigot (AG) ve homozigot mutant (GG) tiplerin dağılımları sırası ile %36.8, %47.4, %15.8; metastatik olan hastalarda homozigot yaygın tip (AA), heterozigot (AG) ve homozigot mutant (GG) tiplerin dağılımları sırası ile %58.3, %36.9, %4.8 olarak tespit edildi. *DPYD* 85T>C polimorfizmine ait kodominant, resesif ve dominant modellerde genotipler ile metastatik ve metastatik olmayan hasta grupları arasında anlamlı ilişki saptamadık.

DPYD 496A>G polimorfizmine ait kodominant modelde genotip dağılımları metastatik olmayan hastalarda homozigot yaygın tip (AA), heterozigot (AG) ve homozigot mutant

(GG) tip dağılımları sırası ile %57.9, %36.8 ve %5.3 olarak; metastatik olan hastalarda ise homozigot yaygın tip (AA), heterozigot (AG) ve homozigot mutant (GG) tip dağılımları sırası ile %79.8, %16.7 ve %3.6 olarak bulundu. 496A>G polimorfizminde kodominant ve resesif modellerde genotipler ile metastatik olup olmama durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı değer elde edilememiştir. Ancak dominant modelde da AG+GG geotip sıklıkları AA genotipine kıyasla metastatik olmayan grupta daha yüksek bulunmuştur ($p=0.05$). Cinsiyet, yaş ve sigara içme durumuna göre düzenlenmiş lojistik regresyon analizinde ise 496 AG+GG genotipi azalan KRK metastazı riski ile ilişkili bulundu (Düzenlenmiş OR:0.300 (%95 CI: 0.095-0.943), $p=0.04$) (Veriler tablo olarak verilmedi).

DPYD 1601G>A polimorfizmine ait kodominant modelde genotip dağılımları metastatik olmayan hastalarda homozigot yaygın tip (AA) ve heterozigot (AG) tip dağılımları sırası ile %94.7 ve %5.3; metastatik olan hastalarda homozigot yaygın tip (AA) ve heterozigot (AG) tip dağılımları sırası ile %94.0 ve %6.0 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki hasta popülasyonu içerisinde *DPYD* 1601G>A polimorfizmine ait homozigot mutant genotip bulunmamaktadır. Çok az sayıda olan heterozigot olarak varyant allel taşıyan hastaların sıklığı metastatik olanlarda olmayanlara göre daha yüksek olsa da istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir.

Tablo 3.18: Metastatik ve metastatik olmayan kolorektal kanserler ile *DPYD* 85T>C, 496A>G, 1601G>A polimorfizmlerinin ilişkisi

	Metastatik Olmayan, (%)	Metastatik, (%)	p
<i>DPYD</i> 85T>C			
TT	7 (36.8)	49 (58.3)	0.10
TC	9 (47.4)	31 (36.9)	
CC	3 (15.8)	4 (4.8)	
TT+TC/CC	16 (84.2)	80 (95.2)	0.12
TC+CC/TT	12 (63.2)	35 (41.7)	0.13
<i>DPYD</i> 496A>G			
AA	11 (57.9)	67 (79.8)	0.12
AG	7 (36.8)	14 (16.7)	
GG	1 (5.3)	3 (3.6)	
AA+AG/GG	18 (94.7)	81 (69.4)	0.56
AG+GG/AA	8 (42.1)	17 (20.2)	0.05
<i>DPYD</i> 1601G>A			
GG	18 (94.7)	79 (94.0)	0.91
GA	1 (5.3)	5 (6.0)	

Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

MTHFR 677C>T ve 1298A>C polimorfizmlerine ait genotiplerin metastatik ve metastatik olmayan hastalardaki dağılımları **Tablo 3.19'**da verilmiştir. *MTHFR* 677C>T polimorfizmine ait kodominant modelde genotip dağılımları metastatik olmayan hastalarda homozigot yaygın tip (CC), heterozigot (CT) ve homozigot mutant (TT) tip dağılımları sırası ile %52.6, %36.8 ve %10.5; metastatik hastalarda CC, CT ve TT genotip dağılımları sırası ile %44.0, %46.4 ve %9.5 olarak tespit edildi. *MTHFR* 677C>T polimorfizminde varyant allel taşıyan (heterozigot veya homozigot mutant) hasta sayısı varyant allel taşımayan yaygın genotipe oranla metastatik hastalarda kısmen yüksek bulunmuştur. Ancak genotip dağılımları ile metastaz durumu arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır.

MTHFR 1298A>C polimorfizmine ait kodominant modelde genotip dağılımları metastatik olmayan hastalarda homozigot yaygın tip (AA), heterozigot (AC) ve homozigot mutant (CC) tip dağılımları sırası ile %36.8, %52.6 ve %10.6; metastatik

hastalarda AA, AC ve CC genotip dağılımları sırası ile %46.4, %42.8 ve %10.8 olarak tespit edildi (p=0.72). *MTHFR* 1298A>C polimorfizmine ait kodominant, resesif ve dominant modeldeki genotiplerin dağılımı ile metastaz durumu arasında anlamlı ilişki tespit edilmemiştir.

Tablo 3.19: Metastatik ve metastatik olmayan kolorektal kanserler ile *MTHFR* 677C>T ve 1298A>C polimorfizmlerinin ilişkisi

	Metastatik Olmayan, (%)	Metastatik, (%)	p
<i>MTHFR</i> 677C>T	10 (52.6)	37 (44.0)	
CC	7 (36.8)	39 (46.4)	0.75
CT	2 (10.5)	8 (9.5)	
TT			
CC+CT/TT	17 (89.5)	76 (90.5)	0.90
CT+TT/CC	9 (47.4)	47 (56.0)	0.61
<i>MTHFR</i> 1298A>C			
AA	7 (36.8)	39 (46.4)	
AC	10 (52.6)	36 (42.8)	0.72
CC	2 (10.6)	9 (10.8)	
AA+AC/CC	17 (89.5)	75 (89.3)	0.98
AC+CC/AA	12 (63.2)	45 (53.6)	0.61

Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

TYMS 14946bpins/del polimorfizmine ait kodominant modelde genotip dağılımları metastatik olmayan hastalarda homozigot yaygın tip (-6bp/-6bp), heterozigot (-6bp/+6bp) ve homozigot mutant (+6bp/+6bp) tip dağılımları sırası ile %21.1, %63.2 ve %15.8; metastatik hastalarda -6bp/-6bp, (-6bp/+6bp) ve +6bp/+6bp genotip dağılımları sırası ile %15.5, %58.3 ve %26.2 olarak tespit edilmiştir (**Tablo 3.20**). Kodominant, resesif ve dominant modelde genotip dağılımları ile metastaz durumu arasında anlamlı bir ilişki tespit etmesek de metastatik olan hastalarda metastatik olmayanlara göre varyant allel taşıma sıklığını daha yüksek olarak bulduk.

Tablo 3.20: Metastatik ve metastatik olmayan kolorektal kanserler ile *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizminin ilişkisi

	Metastatik Olmayan, (%)	Metastatik, (%)	p
<i>TYMS</i> 14946bp ins/del			
-6bp/-6bp	4 (21.1)	13 (15.5)	0.59
-6bp/+6bp	12 (63.2)	49 (58.3)	
+6bp/+6bp	3 (15.8)	22 (26.2)	
(-6bp/-6bp)+(-6bp/+6bp)/			0.55
+6bp/+6bp	16 (84.2)	62 (73.8)	
(+6bp/+6bp)+ (-6bp/+6bp)	15 (79.0)	71 (84.5)	0.51
-6bp/-6bp/			

Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

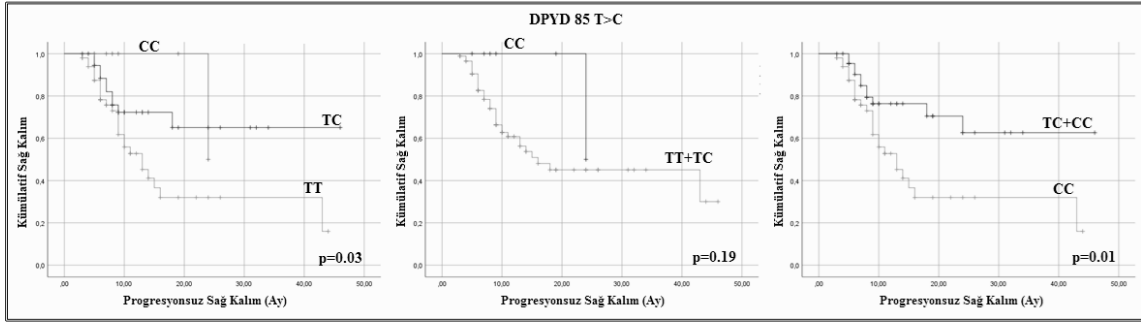
3.2.5. *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* Polimorfizmlerinin Kolorektal Kanser Hastalarının Sağ Kalım Süreleri ile İlişkisi

DPYD 85T>C ve 496A>G polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri **Tablo 3.21**'de, genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri ise **Tablo 3.22**'de verilmiştir. *DPYD* 1601G>A polimorfizmine ait sağ kalım analizleri varyant allel taşıyan bireylerin hepsi sansürlü olduğundan hesaplanamamıştır.

DPYD 85T>C polimorfizmine genotipler ile KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında kodominant ve dominant modelde istatistiksel anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. TT genotipine sahip bireylerin TC ve CC genotiplere kıyasla daha kısa progresyonsuz sağ kalım sürelerine sahip olduğunu bulduk (Log rank=6.93, $p=0.03$). Ancak *Bonferroni* düzeltmesindeki TT ile TC, TT ile CC, TC ile CC ikili genotip karşılaştırmalarında genotipler arasındaki progresyonsuz sağ kalım süreleri farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Log rank $p=0.03$, Log rank $p=0.09$ ve Log rank $p=0.44$, sırası ile. *Bonferroni* yöntemine göre düzenlenen anlamlılık değeri, $\alpha=0.017$, Veriler tabloda verilmedi.)

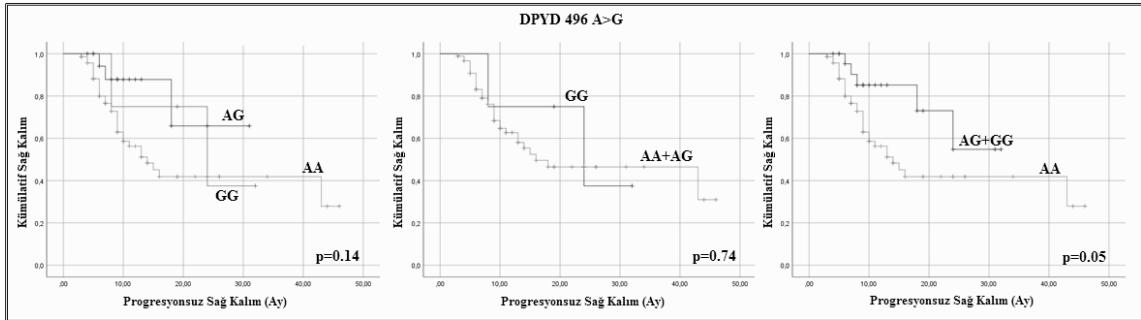
Dominant modelde yaptığımız karşılaştırmada ise TC+CC genotipleri TT genotiplere kıyasla daha uzun progresyonsuz sağ kalım ile ilişkili bulunmuştur (Log rank=6.60,

p=0.01). *DPYD* 85T>C genotiplerine ait progresyonsuz sağ kalım eğrileri Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *DPYD* 85T>C polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

DPYD 496A>G polimorfizmine ait AA, AG ve GG genotiplerini taşıyan hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri istatistiksel olarak farklı bulunmadı (Log rank=3.95 p=0.14). AG+GG genotiplerine sahip hastaların ortalama progresyonsuz kalım süreleri ise AA genotipi taşıyan hastalara kıyasla sınır değerinde önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Log rank=3.64, p=0.05). *DPYD* 496A>G genotiplerine ait progresyonsuz sağ kalım eğrileri Şekil 3.3’de verilmiştir.



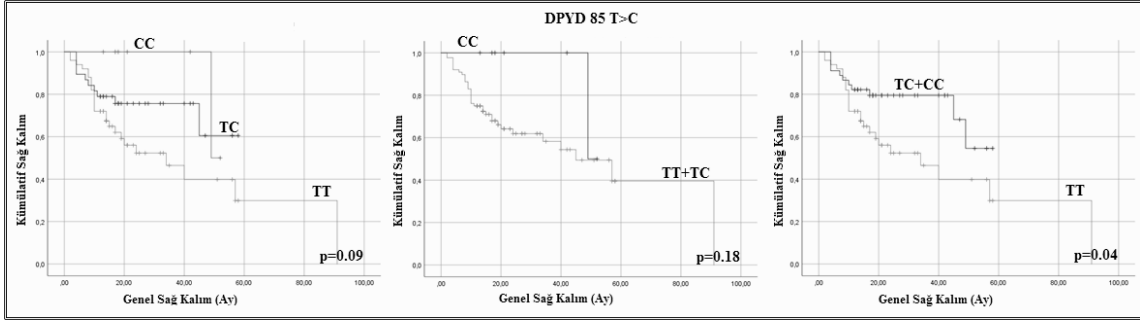
Şekil 3.3: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *DPYD* 496A>G polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

Tablo 3.21: *DPYD* 85T>C ve 496A>G polimorfizmlerine ait genotiplerin KKK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Progresyonsuz Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>DPYD</i> 85T>C			
TT	20.32 ± 2.9 (14.58-26.06)		
TC	33.13 ± 3.45 (26.34-39.90)	6.93	0.03
CC	24.00 ± 0.00 (24.00-24.00)		
TT+TC/CC	25.45 ± 2.47 (20.63-30.30)	1.71	0.19
TC+CC/TT	33.38 ± 3.24 (27.03-39.77)	6.60	0.01
<i>DPYD</i> 496A>G			
AA	24.05 ± 2.68 (18.81-29.29)		
AG	25.17 ± 3.00 (19.27-31.06)	3.95	0.14
GG	23.00 ± 4.82 (13.55-32.45)		
AA+AG/GG	26.03 ± 2.49 (21.15-30.91)	0.11	0.74
AG+GG/AA	25.14 ± 2.45(20.24- 30.04)	3.64	0.05

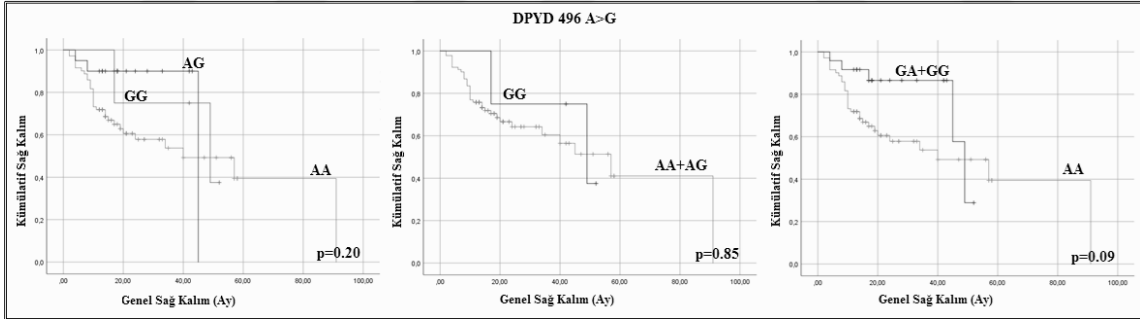
Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

DPYD 85T>C polimorfizmi genotipleri ile KKK hastalarının genel sağ kalım süreleri arasında kodominant ve resesif modellerde istatistiksel anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Ancak TC+CC genotiplerine sahip hastaların genel sağ kalım süreleri TT genotipteki hastalara kıyasla istatistiksel anlamlı derecede yüksek olarak tespit edilmiştir (Log rank=4.40, p=0.04). *DPYD* 85T>C genotiplerine ait genel sağ kalım eğrileri **Şekil 3.4**'de verilmiştir.



Şekil 3.4: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *DPYD* 85T>C polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

DPYD 496A>G polimorfizmine ait AA, AG ve GG genotiplerini taşıyan hastaların genel sağ kalım süreleri istatistiksel olarak farklı bulunmadı (Log rank=3.20 p=0.20). Benzer şekilde GG genotipli hastalara kıyasla AA+AG genotiplerine sahip hastalar (Log rank=0.04 p=0.85) ile AA genotiplere kıyasla AG+GG genotiplere sahip hastaların genel sağ kalım süreleri arasında da istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Log rank=2.82 p=0.09). *DPYD* 496A>G genotiplerine ait genel sağ kalım eğrileri **Şekil 3.5**'de verilmiştir.



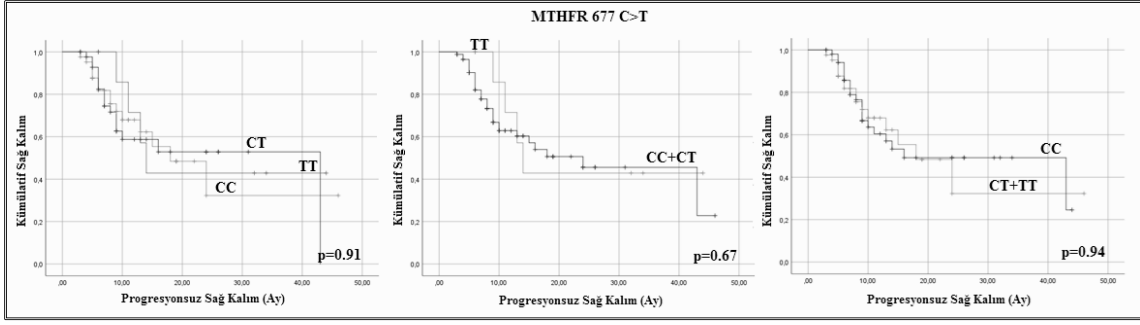
Şekil 3.5: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *DPYD* 496A>G polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

Tablo 3.22: *DPYD* 85T>C ve 496A>G polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Genel Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>DPYD</i> 85T>C			
TT	43.21 ± 6.67 (30.13-56.29)		
TC	43.84 ± 3.80 (36.39-51.29)	4.89	0.09
CC	50.50 ± 1.06 (48.42-52.58)		
TT+TC/CC	50.82 ± 5.60 (39.85-61.79)	1.80	0.18
TC+CC/TT	45.02 ± 3.28 (38.59-51.45)	4.40	0.04
<i>DPYD</i> 496A>G			
AA	49.29 ± 5.91 (37.70-60.90)		
AG	41.10 ± 3.21 (34.81-47.40)	3.20	0.20
GG	42.13 ± 7.30 (27.82-56.43)		
AA+AG/GG	52.28 ± 5.67 (41.18-63.39)	0.04	0.85
AG+GG/AA	43.50 ± 3.14 (37.35-49.65)	2.82	0.09

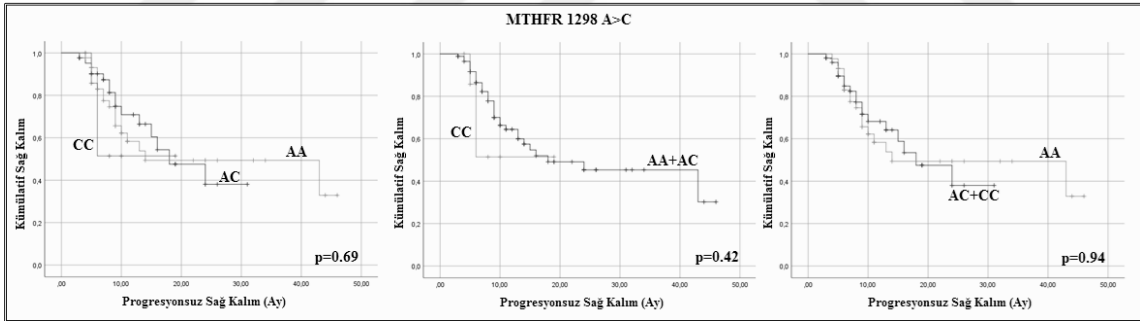
Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

MTHFR 677C>T ve 1298A>C polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri sırası ile **Tablo 3.23** ve **Tablo 3.24**'de verilmiştir. *MTHFR* 677C>T polimorfizmine ait CC, CT ve TT genotipler ile hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Log rank=0.19, p=0.91). Benzer şekilde TT genotipi taşıyan hastalara kıyasla CC+CT (Log rank=0.18, p=0.67); CC genotipi taşıyan hastalara kıyasla da CT+TT genotiplerine sahip hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında dikkate değer bir fark tespit edilmemiştir (Log rank=0.005, p=0.94). *MTHFR* 677C>T polimorfizmi genotiplerine ait progresyonsuz sağ kalım eğrileri **Şekil 3.6**'da verilmiştir.



Şekil 3.6: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *MTHFR* 677C>T polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

MTHFR 1298A>C polimorfizmine ait AA, AC ve CC genotiplerini taşıyan hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri istatistiksel olarak farklı bulunmadı (Log rank=0.74 p=0.69). Benzer şekilde CC genotipli hastalara kıyasla AA+AC genotiplerine sahip hastalar (Log rank=0.66 p=0.42) ile AA genotiplere kıyasla AC+CC genotiplere sahip hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında da istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Log rank=0.005 p=0.94). *MTHFR* 1298A>C genotiplerine ait progresyonsuz sağ kalım eğrileri **Şekil 3.7**'de verilmiştir.



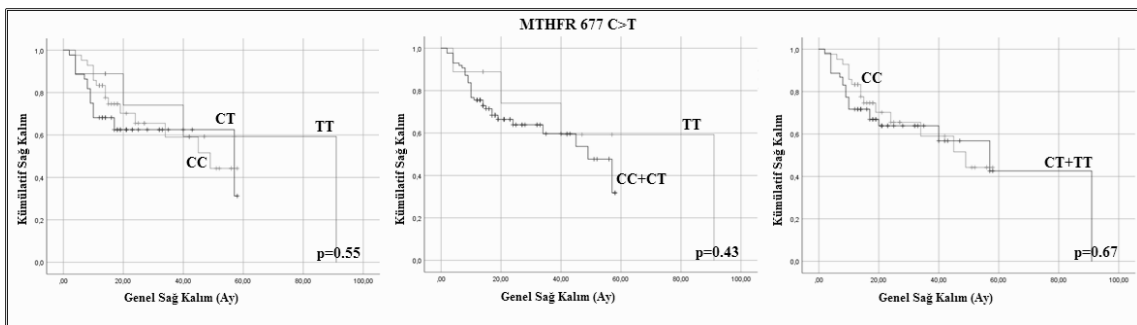
Şekil 3.7: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *MTHFR* 1298A>C polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

Tablo 3.23: *MTHFR* 677C>T ve 1298A>C polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Progresyonsuz Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>MTHFR</i> 677C>T			
CC	23.87 ± 4.20 (15.64-32.10)		
CT	26.61 ± 3.25 (20.24-32.98)	0.19	0.91
TT	25.57 ± 6.06 (13.70-37.44)		
CC+CT/TT	25.98 ± 2.57 (20.94-31.01)	0.18	0.67
CT+TT/CC	26.00 ± 2.90 (20.33-31.68)	0.005	0.94
<i>MTHFR</i> 1298A>C			
AA	26.54 ± 3.34 (19.99-33.08)		
AC	19.83 ± 2.04 (15.84-23.83)	0.74	0.69
CC	12.54 ± 2.71 (7.24-17.84)		
AA+AC/CC	26.21 ± 2.47 (21.38-31.04)	0.66	0.42
AC+CC/AA	19.49 ± 1.93 (15.71-23.27)	0.005	0.94

Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

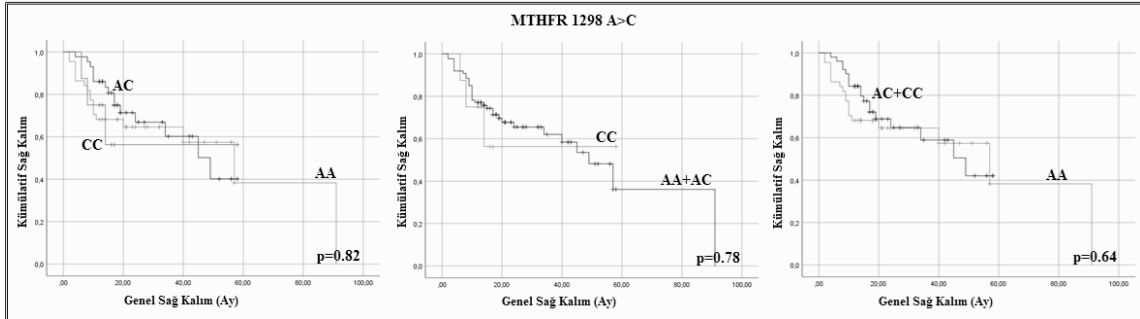
MTHFR 677C>T polimorfizmine ait genotipler ile hastaların genel sağ kalım süreleri arasında kodominant (Log rank=1.21, p=0.55), resesif (Log rank=0.62, p=0.43) ve dominant (Log rank=0.18, p=0.67) genetik modellerde istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. *MTHFR* 677C>T polimorfizmi genotiplerine ait genel sağ kalım eğrileri **Şekil 3.8**'de verilmiştir.



Şekil 3.8: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *MTHFR* 677C>T polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

MTHFR 1298A>C polimorfizmine ait genotipler ile hastaların genel sağ kalım süreleri arasında kodominant (Log rank=0.40, p=0.82), resesif (Log rank=0.08, p=0.78) ve

dominant (Log rank=0.22, p=0.64) genetik modellerde istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. *MTHFR* 1298A>C polimorfizmi genotiplerine ait genel sağ kalım eğrileri **Şekil 3.9**'da verilmiştir.



Şekil 3.9: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *MTHFR* 1298A>C polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

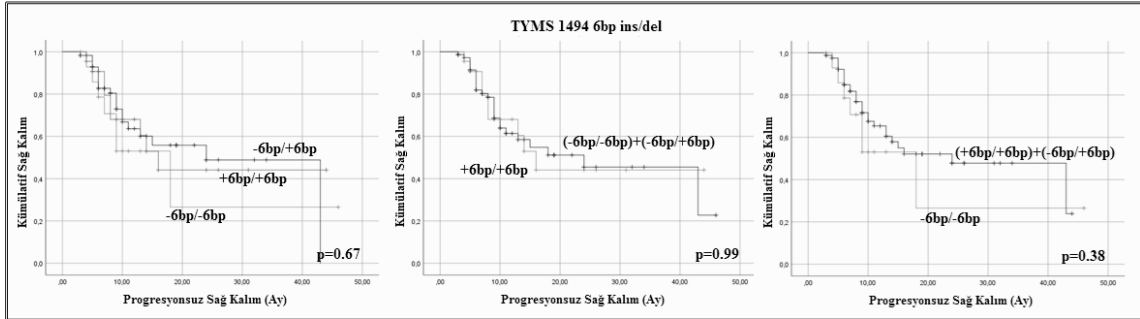
Tablo 3.24: *MTHFR* 677C>T ve 1298A>C polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Genel Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>MTHFR</i> 677C>T			
CC	39.38 ± 3.72 (32.09-46.68)		
CT	39.13 ± 3.67 (31.94-46.33)	1.21	0.55
TT	63.26 ± 14.70 (34.45-2.07)		
CC+CT/TT	38.47 ± 2.72 (33.14-43.79)	0.62	0.43
CT+TT/CC	53.03 ± 7.10 (39.10-66.95)	0.18	0.67
<i>MTHFR</i> 1298A>C			
AA	51.47 ± 8.00 (35.78-67.15)		
AC	39.67 ± 3.57 (32.68-46.67)	0.40	0.82
CC	37.00 ± 9.41 (18.55-55.45)		
AA+AC/CC	50.99 ± 5.82 (39.59-62.39)	0.08	0.78
AC+CC/AA	39.07 ± 3.39 (32.42-45.73)	0.22	0.64

Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

TYMS 14946bpins/del polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri sırası ile **Tablo 3.25** ve **Tablo 3.26**'da verilmiştir. *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmine ait genotipler ile hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında kodominant (Log rank=0.81, p=0.67), resesif

(Log rank=0.00, p=0.99) ve dominant (Log rank=0.76, p=0.38) modellerde istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmi genotiplerine ait progresyonsuz sağ kalım eğrileri **Şekil 3.10**'de verilmiştir.



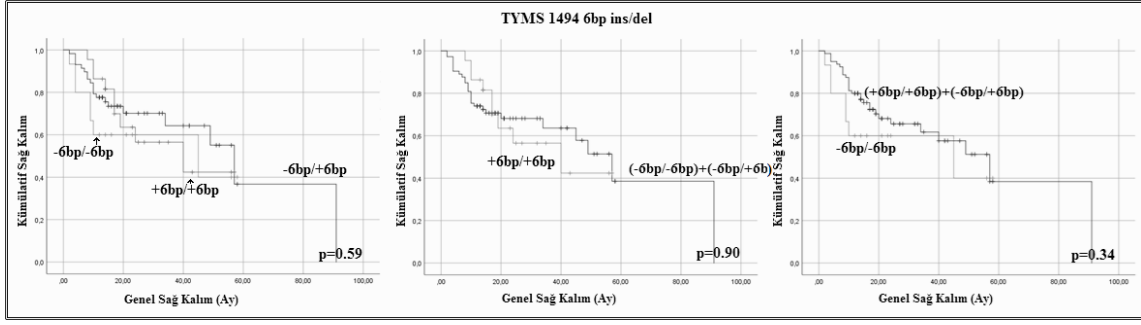
Şekil 3.10: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

Tablo 3.25: *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmine ait genotiplerin KKK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Progresyonsuz Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>TYMS</i> 1494			
-6bp/-6bp	20.18 ± 6.35 (7.74-32.63)		
-6bp/+6bp	26.52 ± 2.98 (20.69-32.36)	0.81	0.67
+6bp/+6bp	24.97 ± 4.43 (16.30-33.64)		
(-6bp/-6bp)+(-6bp/+6bp)/	26.04 ± 2.76 (20.62-31.45)	0.00	0.99
+6bp/+6bp			
(+6bp/+6bp)+(-6bp/+6bp)/	26.24 ± 2.44 (21.45-31.03)	0.76	0.38
-6bp/-6bp			

Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

Progresyonsuz sağ kalım sürelerine benzer şekilde, *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmine ait genotipler ile hastalarının genel sağ kalım süreleri arasında kodominant (Log rank=1.06, p=0.59), resesif (Log rank=0.17, p=0.90) ve dominant (Log rank=0.93, p=0.34) modellerde istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmi genotiplerine ait genel sağ kalım eğrileri **Şekil 3.11**'de verilmiştir.



Şekil 3.11: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

Tablo 3.26: *TYMS* 14946bp ins/del polimorfizmine ait genotiplerin KKK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Genel Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>TYMS</i> 1494			
-6bp/-6bp	34.73 ± 6.37 (22.24-47.22)		
-6bp/+6bp	53.24 ± 7.54 (38.46-68.02)	1.06	0.59
+6bp/+6bp	36.63 ± 4.87 (27.09-46.17)		
(-6bp/-6bp)+(-6bp/+6bp)/ +6bp/+6bp	52.48 ± 6.34 (40.06-64.90)	0.17	0.90
(+6bp/+6bp)+(-6bp/+6bp)/ - 6bp/-6bp	52.48 ± 6.14 (40.45-64.51)	0.93	0.34

Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

3.3. *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T Polimorfizmlerinin İncelenmesi

3.3.1. *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T Polimorfizmlerinin Genel Dağılımları

SNAI1 rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmlerinin incelendiği çalışma grubuna ait klinopatolojik veriler **Tablo 3.27**'de verilmiştir. Kontrol grubumuzun vücut kütle indeksi ortalaması daha yüksektir. Çalışma sırasında sigara

içme durumunun kontrollerde; daha önceki dönemlerde sigara içme durumunun ise vakalarda daha yüksek olduğu tespit edildi. Çalışmamızda yer alan vakaların ortalama progresyonsuz sağ kalım süresi 12.8 ay; genel sağ kalım süresi ise 23.1 aydır. Vakaların %15.0'ında primer tümörün yeri sağ kolon olarak belirlenmiştir. Hastalarımızın %80.0'i metastatiktir. Metastatik olmayan hastalarımızda ise tanı konulduktan itibaren çalışma süresi boyunca ortalama yaklaşık 21 ay boyunca metastaz gözlenmemiştir. En yaygın metastaz tipi karaciğer olup; bunu akciğer ve periton metastazı izlemektedir. Hastalarımızın tamamı floro-urasil tabanlı ilaç tedavisi görmekte olup oxaliplatin, bevasizumab gibi yan ilaçlarda kullanmaktadır.

Tablo 3.27: *SNAIL* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmlerinin incelediği çalışma grubuna ait demografik, klinik ve patolojik özelliklerinin dağılımı

	Vakalar	Kontroller
Cinsiyet, n (%)		
Kadın	38 (44.7)	31 (39.7)
Erkek	47 (55.3)	47 (60.3)
VKİ	25.6 ± 0.6 (15.1-41.0)	27.5 ± 0.6 (18.8-46.9)
Sigara, n (%)		
Hayır	35 (41.2)	35 (47.3)
Evet	8 (9.4)	26 (35.1)
Eski Kullanıcı	42 (49.4)	13 (17.6)
PSK	12.8 ± 1.1 (3.0-49.0)	
GSK	23.1 ± 2.0 (2.0-91.0)	
Primer Tümör		
Lokalizasyonu, n (%)		
Sağ	69 (81.2)	
Sol	16 (18.8)	
Metastaz, n (%)		
Yok	17 (20.0)	
Karaciğer	63	
Akciğer+Karaciğer	20	
Periton	5	
KRAS Mutant, n (%)	27 (31.8)	
Ölüm	28 (35.9)	

VKİ: Vücut Kitle İndeksi. PSK: Progresyonsuz Sağ Kalım. GSK: Genel Sağ Kalım. Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. Yaş, ağırlık, VKİ, PSK, GSK değerleri ortalama ± standart hata (min-maks) olarak ifade edildi.

SNAI1 rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin genel dağılımları ile vaka ve kontrollerdeki dağılımları **Tablo 3.28**'de verilmiştir. Çalışma grubumuzda *SNAI1* rs6125849 ve *LOXL2* rs6999447 C>T genotip dağılımları vaka ve kontrollerde *Hardy Weinberg* dengesine uyum göstermektedir.

SNAI1 rs6125849 G>A polimorfizmine ait homozigot yaygın (GG), heterozigot (GA) ve homozigot mutant (AA) genotip dağılımları vakalarda sırası ile %44.44, %45.83 ve %9.72; kontrollerde ise sırası ile %57.97, %37.68 ve %4.35 olarak tespit edildi. Kodominant modelde rs6125849 genotip dağılımları vaka ve kontrollerde önemli derecede fark göstermemiştir ($p=0.20$). GG+GA genotipli bireylerin AA genotipli bireyler ile kıyaslandığı resesif modelde ve GA+AA genotiplerinin GG genotipi ile kıyaslandığı dominant modelde de dağılımlar istatistiksel olarak fark göstermemiştir ($p=0.33$, $p=0.13$, sırası ile).

LOXL2 rs6999447 C>T polimorfizmine ait genotip dağılımları KKK hastalarında ve kontrollerde sırası ile homozigot yaygın (CC) için %45.2 ve %48.7; heterozigot için (CT) %45.2 ve %35.9; ve homozigot mutant (TT) için %9.5 ve %15.4 olarak tespit edilmiştir. rs6999447 C>T polimorfizmine ait genotip sıklıkları vaka ve kontroller arasında önemli ölçüde fark göstermemiştir ($p=0.35$). Benzer şekilde resesif ve dominant modellerdeki incelemeler sonucunda da vaka ve kontroller arasında önemli bir fark tespit etmedik ($p=0.34$ ve $p=0.75$) (**Tablo 3.28**).

Tablo 3.28: SNAI1 rs6125849 G>A ve LOXL2 rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıklarının vaka ve kontrollerdeki dağılımları

	Vaka				Kontrol				p ^b
SNAI1 rs6125849	n:72 (%)	MAF	χ²	p^a	n:69 (%)	MAF	χ²	p^a	
GG	32 (44.44)	0.33	0.129	0.72	40 (57.97)	0.23	0.230	0.63	0.20
GA	33 (45.83)				26 (37.68)				
AA	7 (9.72)				3 (4.35)				
GG+GA/AA	65 (90.28)				66 (95.65)				0.33
GA+AA/GG	40 (55.56)				29 (42.03)				0.13
LOXL2 rs6999447	n: 84 (%)	MAF	χ²	p^a	n:78 (%)	MAF	χ²	p^a	
CC	38 (45.2)				38 (48.7)				
CT	38 (45.2)	0.32	0.115	0.73	28 (35.9)	0.33	2.885	0.09	0.35
TT	8 (9.5)				12 (15.4)				
CC+CT/TT	76 (90.5)				66 (84.6)				0.34
CT+TT/CC	46 (54.8)				40 (51.3)				0.75

MAF: Minor Allel Frekansı. p^a ve χ² Hardy-Weinberg dengesine uygunluk analizi sonuçlarını gösterir. p^b, vakalar ve kontrol grupları arasında yapılan genotip dağılım karşılaştırmaların ki-kare analiz sonuçlarını gösterir. Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.3.2. SNAI1 rs6125849 G>A ve LOXL2 rs6999447 C>T Polimorfizmlerinin Kolorektal Kanser Riski ile İlişkisi

SNAI1 rs6125849 G>A polimorfizmine ait genotiplerin KRK riski ile ilişkileri sırası ile **Tablo 3.29**'da verilmiştir. Bu tablolarda risk oranları (OR) ve %95 güven aralığı (CI) değerleri yaş, cinsiyet ve sigara içme ortak değişkenlerine göre düzenlenmiş ve düzenlenmemiş olarak 2 farklı şekilde verilmiştir. Hem düzenlenmiş hem de düzenlenmemiş veriler dikkate alındığında, GG genotipi ile kıyaslandığında rs6125849 GA ve AA genotipe sahip olma durumu ile KRK riski arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi. Resesif ve kodominant karşılaştırmalarda da benzer şekilde dikkate değer bir ilişki tespit edilmedi.

LOXL2 rs6999447 C>T polimorfizmine ait genotiplerin KRK riski ile ilişkileri **Tablo 3.29**'da verilmiştir. rs6999447 CC genotipi ile kıyaslandığında CT (Düzenlenmiş

OR:1.129 %95 CI:0.550-2.318, p=0.742) ve TT (Düzenlenmiş OR:0.503 %95 CI:0.169-1.500, p=0.218) genotipleri ile KKK riski arasında anlamlı bir ilişki tespit etmedik. Benzer sonuçlar hem düzenlenmiş hem de düzenlenmemiş modellerde resesif ve dominant modeller için de tespit edildi.

Tablo 3.29: *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmleri ile kolorektal kanser riski arasındaki olasılık oranları

	Düzenlenmemiş OR (%95 CI)	P	Düzenlenmiş OR (%95 CI)	P
<i>SNAI1</i>				
rs6125849				
GG	Referans		Referans	
GA	1.59 (0.793-3.173)	0.192	1.24 (0.575-2.676)	0.583
AA	2.92 (0.698-12.190)	0.142	2.65 (0.607-11.608)	0.195
GG+GA/AA	2.37 (0.587-9.562)	0.226	2.44 (0.574-10.329)	0.227
AA+AG/GG	1.72 (0.885-3.359)	0.109	1.41 (0.680-2.914)	0.357
<i>LOXL2</i>				
rs6999447				
CC	Referans		Referans	
CT	1.357 (0.699-2.635)	0.367	1.129 (0.550-2.318)	0.742
TT	0.667 (0.245-1.814)	0.427	0.503 (0.169-1.500)	0.218
CC+CT/TT	1.727 (0.666-4.482)	0.261	2.107 (0.749-5.931)	0.158
CT+TT/CC	1.150 (0.620-2.133)	0.658	0.942 (0.481-1.847)	0.863

OR:Odds Ratio (Göreceli olasılıklar oranı), CI: Confidence interval (Güven Aralığı).

3.3.3. *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T Polimorfizmlerinin Primer Tümör Lokalizasyonu ile İlişkisi

Çalışma grubumuzdaki vakaları kendi içerisinde primer tümörün yerine göre sağ ve sol kolon olmak üzere iki gruba ayırdık ve *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının primer tümör lokalizasyonuna göre dağılımları **Tablo 3.30**'da verilmiştir. *SNAI1* rs6125849 G>A polimorfizmine ait genotipler ile primer tümör lokalizasyonu arasında kodominant, resesif ve dominant modellerde belirgin bir ilişki tespit edemedik (p=0.36, p=0.94 ve p=0.20 sırası ile). Benzer şekilde *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmine ait genotip sıklıklarının primer

tümör lokalizasyonuna göre kodominant, resesif ve dominant modellerdeki dağılımları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.76$, $p=0.64$ ve $p=0.58$, sırası ile).

Tablo 3.30: *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının primer tümör lokalizasyonuna göre dağılımları

	Sol Kolon, (%)	Sağ Kolon, (%)	p
<i>SNAI1</i> rs6125849			
GG	25 (40.98)	7 (63.64)	0.36
GA	30 (49.18)	3 (27.27)	
AA	6 (9.84)	1 (9.09)	
GG+GA/AA	55 (90.16)	10 (90.91)	0.94
GA+AA/GG	36 (59.02)	4 (36.36)	0.20
<i>LOXL2</i> rs6999447			
CC	32 (47.1)	6 (37.5)	0.76
CT	30 (44.1)	8 (50.0)	
TT	6 (8.8)	2 (12.5)	
CC+CT/TT	62 (91.2)	14 (87.5)	0.64
CT+TT/CC	36 (52.9)	10 (62.5)	0.58

Değişkenler n (%) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.3.4. *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T Polimorfizmlerinin Metastaz ile İlişkisi

SNAI1 rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının metastaz varlığına göre dağılımları **Tablo 3.31**'de verilmiştir. Yaptığımız temel karşılaştırmalı analizlerde her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı veri elde edememiş olsak da bir nokta oldukça ilgi çekiciydi. *SNAI1* rs6125849 polimorfizminin her iki varyant allelini taşıyan homozigot mutant (AA) hastaların tamamının metastatik hastalar olduğunu tespit ettik. Dominant modelde yaptığımız analizde ise heterozigot ve homozigot mutant genotiplerin (GA+AA) homozigot yaygın (GG) genotipe kıyasla metastatik kolorektal kanserde daha yaygın olduğunu gözlemledik ($p=0.07$). Dominant genetik modelde, istatistiksel anlamlılık sınırına yakın bulduğumuz p değerinin homozigot yaygın (GG) genotipin etkisini gösteren resesif genetik modelde anlamlılık değerinden oldukça uzaklaştığını bulduk. Bu durum *SNAI1* rs6125849 varyant allelinin

(A) metastatik süreçte oldukça önemli olduğunu gösteriyor olabilir. Lojistik regresyon ile yaptığımız incelemelerde ise GA+AA genotipleri artan metastaz riski ile yakından ilişkili bulunmuştur (OR:3.52 (%95: 0.971-12.778) p=0.05) (**Tablo 3.32**).

LOXL2 rs6999447 C>T polimorfizmine ait CC, CT ve TT genotip sıklıkları sırası ile metastatik olmayan hastalarda %58.8, %35.3 ve %5.9; metastatik olan hastalarda ise %41.8, %47.8 ve %10.4 olarak tespit edilmiştir. rs6999447 C>T polimorfizmine ait genotip sıklıkları kodominant, resesif ve dominant modellerde metastatik ve metastatik olmayan gruplarda dikkate değer derecede önemli bulunmamıştır (p=0.44, p=0.55, p=0.28, sırası ile).

Tablo 3.31'e dahil edilmese de *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmleri ile metastaz yeri (karaciğer, akciğer, periton) arasında da bir ilişki tespit etmedik.

Tablo 3.31: *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının metastaz varlığına göre dağılımları

	Metastatik Olmayan, (%)	Metastatik, (%)	p
<i>SNAI1</i> rs6125849			
GG	9 (69.23)	23 (38.98)	0.10
GA	4 (30.77)	29 (49.15)	
AA	0 (0.0)	7 (11.86)	
GG+GA/AA	13 (100.0)	52 (88.14)	0.34
GA+AA/GG	4 (30.77)	36 (61.02)	0.07
<i>LOXL2</i> rs6999447			
CC	10 (58.8)	28 (41.8)	0.44
CT	6 (35.3)	32 (47.8)	
TT	1 (5.9)	7 (10.4)	
CC+CT/TT	16 (94.1)	60 (89.6)	0.55
CT+TT/CC	7 (41.2)	39 (58.2)	0.28

Değişkenler n (%) olarak ifade edildi. p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 3.32: *SNAI1* rs6125849 G>A polimorfizminin KRK metastazı ile ilişkisi

rs6125849 G>A	OR (%95 CI)	p
GG	Referans	
GA+AA	3.522 (0.971-12.778)	0.06

OR:Odds Ratio (Göreceli olasılıklar oranı), CI: Confidence interval (Güven Aralığı).

3.3.5. *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T Polimorfizmlerinin Kolorektal Kanser Hastalarının Sağ Kalım Süreleri ile İlişkisi

SNAI1 rs6125849 ve *LOXL2* rs6999447 polimorfizmlerine ait genotiplerin çalışma grubumuzda yer alan KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerine etkileri **Tablo 3.33**'de verilmiştir.

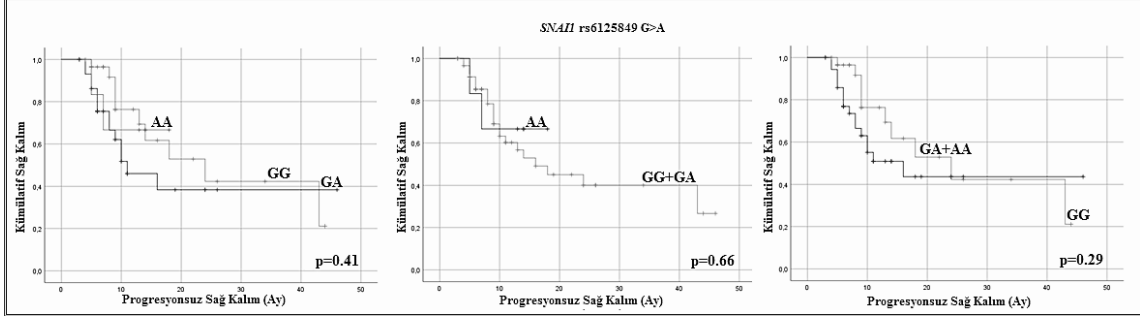
Tablo 3.33: *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Progresyonsuz Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>SNAI1</i> rs6125849			
GG	26.44 ± 4.01 (18.578-34.313)		
GA	22.90 ± 4.1 (14.814-31.007)	1.782	0.41
AA	14.00 ± 2.3 (9.45-18.55)		
GG+GA/AA	24.62 ± 3.0 (18.819-30.423)	0.189	0.66
GA+AA/GG	24.78 ± 3.8 (17.351-32.209)	1.108	0.29
<i>LOXL2</i> rs6999447			
CC	28.45 ± 3.85 (20.91-35.99)	0.04	0.98
CT	25.52 ± 3.87 (17.93-33.10)		
TT	15.25 ± 3.38 (8.63-21.87)		
CC+CT/TT	27.01 ± 2.81 (21.50-32.52)	0.003	0.95
CT+TT/CC	25.89 ± 3.55 (18.94-32.85)	0.04	0.84

Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

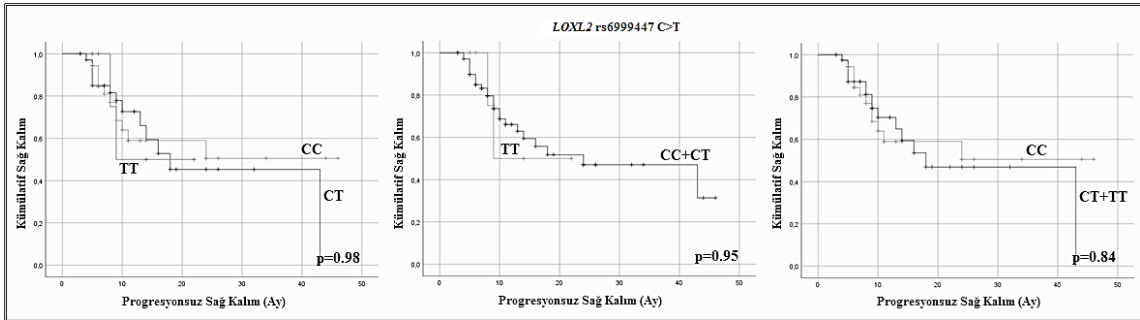
Çalışma grubumuzdaki KRK hastalarının ortalama progresyonsuz sağ kalım süreleri *SNAI1* rs6125849 GG, GA ve AA genotiplerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir (Log Rank=1.782, p=0.41). Benzer şekilde GG+GA genotiplerinin AA

ile (Log Rank=0.189, $p=0.66$); GA+AA genotiplerinin GG ile (Log Rank=1.108, $p=0.29$) karşılaştırması sonucunda da anlamlı bir sonuç elde etmedik (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *SNAI1* rs6125849 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

LOXL2 rs6999447 C>T polimorfizmine ait CC, CT ve TT genotiplerini taşıyan hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri istatistiksel olarak farklı bulunmadı (Log rank=0.04 $p=0.98$). Benzer şekilde TT genotipli hastalara kıyasla CC+CT genotiplerine sahip hastalar (Log rank=0.003 $p=0.95$); ve CC genotiplere kıyasla CT+TT genotiplerine sahip hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında da istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Log rank=0.04 $p=0.84$). *LOXL2* rs6999447 genotiplerine ait progresyonsuz sağ kalım eğrileri Şekil 3.13'te verilmiştir.



Şekil 3.13: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

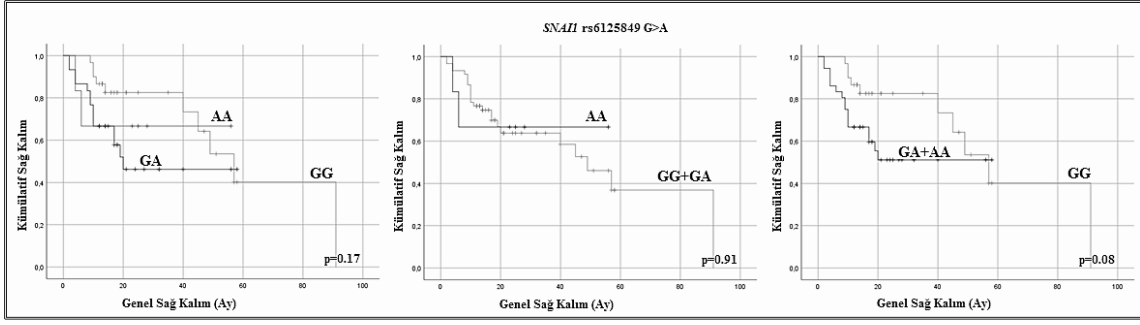
SNAI1 rs6125849 ve *LOXL2* rs6999447 polimorfizmlerine ait genotiplerin çalışma grubumuzda yer alan KRK hastalarının genel sağ kalım sürelerine etkileri **Tablo 3.34**'de özetlenmiştir.

Tablo 3.34: *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Genel Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>SNAI1</i> rs6125849			
GG	59.09 ± 8.11 (43.198-74.972)		
GA	32.84 ± 4.8 (23.413-42.267)	3.550	0.17
AA	39.00 ± 9.8 (19.757-58.243)		
GG+GA/AA	50.84 ± 6.3 (38.514-63.174)	0.012	0.91
GA+AA/GG	34.68 ± 4.3 (26.245-43.106)	3.04	0.08
<i>LOXL2</i> rs6999447			
CC	40.48 ± 4.06 (32.52-48.44)	0.05	0.98
CT	52.01 ± 8.56 (35.23-68.80)		
TT	37.50 ± 10.17 (17.57-57.44)		
CC+CT/TT	53.96 ± 6.19 (41.83-66.09)	0.04	0.85
CT+TT/CC	53.21 ± 8.08 (37.37-69.04)	0.02	0.89

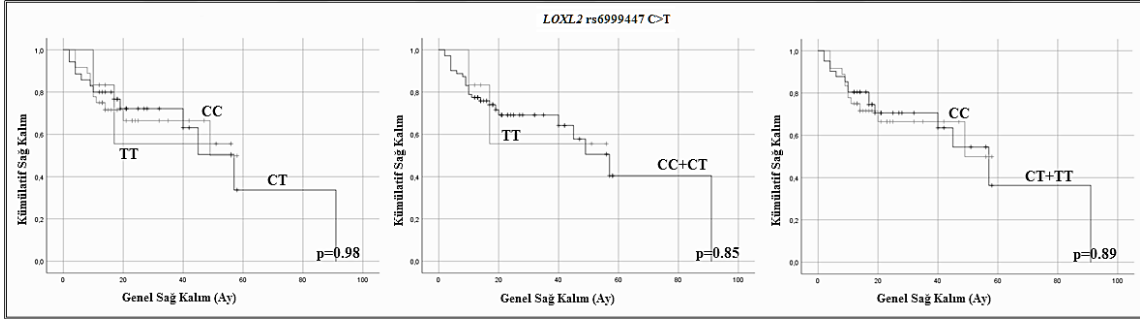
Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

Çalışma grubumuzdaki KRK hastalarının sahip olduğu *SNAI1* rs6125849 G>A genotipleri ile genel sağ kalım süreleri arasında ise kodominant, resesif ve dominant genetik modellerde istatistiksel anlam ifade eden bir bağlantı tespit etmedik. Ancak *SNAI1* rs6125849 varyant allel (A) taşıyan hastaların yaygın tip allel (G) taşıyan hastalara kıyasla genel sağ kalım süreleri ortalamasında oldukça belirgin bir farklılık olduğunu tespit ettik. GG genotipe sahip hastaların ortalama sağ kalım süresini GA+AA genotiplerine kıyasla oldukça yüksek olarak tespit ettik (Log rank=3.04, p=0.08) (**Şekil 3.14**).



Şekil 3.14: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *SNAI1* rs6125849 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

LOXL2 rs6999447 C>T polimorfizmine ait CC, CT ve TT genotiplerini taşıyan hastaların genel sağ kalım süreleri istatistiksel olarak farklı bulunmadı (Log rank=0.05 p=0.98). Benzer şekilde TT genotipli hastalara kıyasla CC+CT genotiplerine sahip hastaların (Log rank=0.04 p=0.85); CC genotiplere kıyasla CT+TT genotiplerine sahip hastaların genel sağ kalım süreleri arasında da istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Log rank=0.02 p=0.89). rs6999447 genotiplerine ait genel sağ kalım eğrileri **Şekil 3.15**'de verilmiştir.



Şekil 3.15: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *LOXL2* rs6999447 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

3.3.6. *SNAI1* rs6125849 G>A ve *LOXL2* rs6999447 C>T Polimorfizmlerinin KRK Metastazı Üzerine Kombine Etkileri

Birlikte fonksiyonel olan iki proteinin kodlanmasından sorumlu olan *LOXL2* ve *SNAI1* genlerinde yer alan sırası ile rs6999447 ve rs6125849 polimorfizmlerinin KRK metastaz riskini öngören lojistik regresyon modeli **Tablo 3.35**'de verilmiştir. *LOXL2* rs6999447

CT+TT (OR:5.739 %95 CI:1.333-24.717), $p=0.019$) ve *SNAI1* rs6125849 GA+AA genotipleri artan metastaz riski ile ilişkili bulunmuştur (OR:4.562, %95 CI: 1.155-18.011), $p=0.03$).

Tablo 3.35: Kolorektal kanser metastazı riski öngören *LOXL2* rs6999447 ve *SNAI1* rs6125849 polimorfizmlerine ait genotiplerin ikili lojistik regresyon modeli

	B	S.H.	Wald	sd	OR (%95 CI)	p
rs6999447 CT+TT	1.747	0.745	5.501	1	5.739 (1.333-24.717)	0.019
rs6125849 GA+AA	1.518	0.701	4.692	1	4.562 (1.155-18.011)	0.030
Sabit	0.094	0.506	0.034	1		0.853

B, regresyon katsayısı; SH, Standart Hata; sd, serbestlik derecesi; OR, olasılık oranı; CI, güven aralığı; p, anlamlılık düzeyi; $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.4. *PD-1* ve *PDL-1* Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi

3.4.1. *PD-1* ve *PDL-1* Polimorfizmlerinin Genel Dağılımları

PD-1 ve *PDL-1* gen polimorfizmlerinin incelendiği vaka ve kontrol grubuna ait demografik ve vakalara ait klinik veriler **Tablo 3.36**'da verilmiştir. Hem kadın hem de erkek bireylerin sayısı vaka grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek tespit edilmiştir. VKİ değerleri kontrol grubunda görece daha yüksek tespit edilmiştir. Çalışma süresince ya da daha öncesinde sigara içme durumunun ise vakalarda kontrollere göre daha yüksek olduğunu belirledik.

Tablo 3.36: *PD-1* ve *PDL-1* polimorfizmlerinin incelendiği vaka ve kontrolleri içeren çalışma grubuna ait karşılaştırmalı klinik, demografik ve patolojik veriler

	Vaka	Kontrol
Cinsiyet, n (%)		
Kadın	45 (54.9)	37 (45.1)
Erkek	58 (54.2)	49 (45.8)
VKI	25.80 ± 0.5 (15-41)	27.26 ± 0.5 (18-47)
Sigara, n (%)		
Hayır	44 (53.7)	38 (46.3)
Evet	11 (27.5)	29 (72.5)
Eski Kullanıcı	48 (76.2)	15 (23.8)
PSK	12.69 ± 0.97 (3-49)	
GSK	22.82 ± 1.7 (2-91)	
Primer Tümörün Yeri, n (%)		
Sağ	22 (21.4)	
Sol	81 (78.6)	
Metastaz, n (%)		
Yok	19 (18.4)	
Karaciğer	54 (52.4)	
Akciğer+Karaciğer	23 (22.3)	
Periton	7 (6.8)	
KRAS Mutant, n (%)	35 (33)	
Ölüm	36 (35.0)	

VKI: Vücut Kitle İndeksi. Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. Yaş, ağırlık, VKİ değerleri ortalama ± standart hata (Min-Maks) olarak ifade edildi.

PD-1 rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmlerine ait vaka ve kontrollerdeki karşılaştırmalı genotip sıklıkları **Tablo 3.37**'de verilmiştir. Çalışma grubumuzda *PD-1* rs2227981 polimorfizmine ait heterozigot ve mutant bireyler tespit etmedik. rs2227982 ve rs7421861 polimorfizmlerine ait genotip dağılımları vakalarda ve kontrollerde *Hardy Weinberg* dengesine uyum gösterirken, rs36084323 polimorfizmi kontrollerde sapma göstermiştir.

PD-1 rs2227982 polimorfizmine ait genotip dağılımlarını homozigot yaygın (GG) ve heterozigot (GA) genotipler için vakalarda sırası ile %92.7 ve %7.3; kontrollerde ise %94.8 ve %5.2 olarak tespit ettik. Her iki grupta da homozigot mutant (AA) bireyler

tespit edilmedi. rs2227982 polimorfizmine ait genotip sıklıklarının vaka ve kontrollerdeki dağılımları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.747$).

PD-1 rs36084323 polimorfizmine ait genotip sıklıkları homozigot yaygın (CC) ve heterozigot (CT) genotipler için vakalarda sırası ile %89.6 ve %10.4; kontrollerde ise %47.7 ve %52.3 olarak tespit edildi. Varyant allel taşıyan (T) heterozigot genotipe sahip bireylerin sıklığını vakalara kıyasla kontrollerde oldukça yüksek olarak tespit ettik. Benzer şekilde CC genotipe sahip bireylerin sıklığının da vakalarda yüksek olduğunu saptadık. rs36084323 polimorfizmine ait genotip sıklıklarının vaka ve kontrollerdeki dağılımını istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulduk ($p<0.001$). Çalışma grubumuzda homozigot mutant (TT) bireyler tespit edilmedi.

PD-1 rs7421861 polimorfizmi GG genotip dağılımları vaka ve kontrollerde sırası ile %89.8 ve %65.0; GA genotip dağılımları ise %10.2 ve %35.0 olarak tespit edilmiştir. Varyant allel taşıyan GA genotip sıklığını KRK hastası bireylere göre kontrollerde daha yüksek olarak tespit ettik ($p=0.008$). Çalışma grubumuzda AA bireyler tespit edilmemiştir.

Tablo 3.37: *PD-1* rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıklarının vaka ve kontrollerdeki dağılımları

		Vaka				Kontrol				p^b
rs2227982	n:82 (%)	MAF	χ^2	p^a	n:77 (%)	MAF	χ^2	p^a		
GG	76 (92.7)				73 (94.8)					
GA	6 (7.3)	0.037	0.118	0.73	4 (5.2)	0.026	0.055	0.81	0.747	
rs36084323	n:77 (%)	MAF	χ^2	p^a	n:44 (%)	MAF	χ^2	p^a		
CC	69 (89.6)	0.052	0.231	0.63	21 (47.7)	0.261	5.509	0.02	<0.001	
CT	8 (10.4)				23 (52.3)					
rs7421861	n:49 (%)	MAF	χ^2	p^a	n:40	MAF	χ^2	p^a		
GG	44 (89.8)	0.051	0.142	0.71	26 (65.0)	0.175	1.800	0.18	0.008	
GA	5 (10.2)				14 (35.0)					

MAF: Minor allel frekansı. p^a ve χ^2 Hardy-Weinberg dengesine uygunluk analizi sonuçlarını gösterir. p^b , vakalar ve kontrol grupları arasında yapılan genotip dağılım karşılaştırmaların ki-kare analiz sonuçlarını gösterir. Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

PDL-1 rs10815225, rs2282055, rs2297136 ve rs822336 polimorfizmlerinin vaka ve kontrollerdeki genotip sıklıkları karşılaştırmalı olarak **Tablo 3.38**'de verilmiştir. *PDL-1* rs10815225, rs2282055 ve rs822336 polimorfizmlerinin vakalarda ve kontrollerde Hardy Weinberg dengesine uyum gösterirken, rs2297136 polimorfizmi hem KRK grubunda hem de kontrol grubunda sapma göstermektedir (**Tablo 3.38**).

PDL-1 rs10815225 polimorfizmine ait genotiplerin sıklıkları sırası ile vaka ve kontrollerde homozigot yaygın (GG) genotip için %69.0 ve %60.0; heterozigot (GC) genotip için %26.8 ve % 33.3; homozigot mutant (CC) genotip için %4.2 ve %6.7 olarak belirlenmiştir. *PDL-1* rs10815225 G>C genotiplerinin vaka ve kontrollerdeki dağılımları belirgin bir fark göstermemiştir ($p=0.587$). GG+GC genotipli bireylerin CC genotipli bireylerle kıyaslandığı resesif genetik modelde ve GC+CC genotipli bireylerin GG genotipli bireyler ile kıyaslandığı dominant modelde de vaka ve kontroller arasında belirgin bir fark tespit etmedik ($p=0.676$ ve $p=0.326$, sırası ile).

PDL-1 rs2282055 polimorfizmine ait genotip sıklıkları homozigot yaygın (TT), heterozigot (TG) ve homozigot mutant (GG) genotipler için vakalarda sırası ile %55.7, %38.0 ve %6.3; kontrollerde ise %42.1, %44.7 ve %13.2 olarak tespit edildi. Kodominant modelde yaptığımız karşılaştırmada *PDL-1* rs2282055 polimorfizmine ait genotip sıklıklarının dağılımlarını vaka ve kontrollerde önemli derecede farklı bulmadık ($p=0.153$). TT+TG genotiplerinin GG ile karşılaştırıldığı resesif modelde ise TT+TG genotiplerinin sıklığı vakalarda %93.7; kontrollerde ise %86.8 olarak belirlendi ($p=0.181$). Varyant allel taşıyan TG+GG genotiplerinin varyant allel taşımayan TT genotipleri ile kıyaslandığı dominant model de ise TG+GG genotip sıklıkları vakalarda %44.3; kontrollerde ise %57.9 olarak belirlendi ($p=0.109$).

PDL-1 rs2297136 polimorfizmine ait genotip sıklıkları vaka ve kontrollerde sırası ile AA için %29.6 ve %29.6; AG için %62.0 ve %68.5; ve GG genotipler için %8.5 ve %1.9 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre *PDL-1* rs2297136 polimorfizmine ait genotip dağılımları KRK ve kontroller arasında kodominant, resesif ve dominant modelde istatistiksel anlamlı derece fark göstermemektedir ($p=0.274$, $p=0.139$ ve $p=0.995$, sırası ile).

PDL-1 rs822336 polimorfizmine ait genotip sıklıkları homozigot yaygın (GG), heterozigot (GC) ve homozigot mutant (CC) genotipler için vakalarda sırası ile %26.3, %52.5 ve %21.3; kontrollerde ise %32.9, %48.7 ve %18.4 olarak tespit edildi. *PDL-1* rs822336 polimorfizmine ait genotip sıklıkları vaka kontrollerde kodominant, resesif ve dominant modellerde belirgin bir fark göstermemiştir ($p=0.653$, $p=0.692$ ve $p=0.385$, sırası ile).

Tablo 3.38: *PDL-1* rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıklarının vaka ve kontrollerdeki dağılımları

Vaka					Kontrol				p^b
rs10815225	n:71 (%)	MAF	χ^2	p^a	n:45 (%)	MAF	χ^2	p^a	
GG	49 (69.0)	0.176	0.428	0.51	27 (60.0)	0.233	0.210	0.65	0.587
GC	19 (26.8)				15 (33.3)				
CC	3 (4.2)				3 (6.7)				
GG+GC/CC	68 (95.8)				42 (93.3)				0.676
GC+CC/GG	22 (31.0)				18 (40.0)				0.326
rs2282055	n:79 (%)	MAF	χ^2	p^a	n:76 (%)	MAF	χ^2	p^a	
TT	44 (55.7)	0.253	0.001	0.97	32 (42.1)	0.355	0.042	0.84	0.153
TG	30 (38.0)				34 (44.7)				
GG	5 (6.3)				10 (13.2)				
TT+TG/GG	74 (93.7)				66 (86.8)				0.181
TG+GG/TT	35 (44.3)				44 (57.9)				0.109
rs2297136	n:71 (%)	MAF	χ^2	p^a	n:54 (%)	MAF	χ^2	p^a	
AA	21 (29.6)	0.394	6.278	0.01	16 (29.6)	0.361	12.70	<001	0.274
AG	44 (62.0)				37 (68.5)				
GG	6 (8.5)				1 (1.9)				
AA+AG/GG	65 (91.5)				53 (98.1)				0.139
AG+GG/AA	50 (70.4)				38 (70.4)				0.995
rs822336	n: 80 (%)	MAF	χ^2	p^a	n:76 (%)	MAF	χ^2	p^a	
GG	21 (26.3)	0.475	0.222	0.64	25 (32.9)	0.428	0.002	0.96	0.653
GC	42 (52.5)				37 (48.7)				
CC	17 (21.3)				14 (18.4)				
GG+GC/CC	63 (78.8)				62 (81.6)				0.692
GC+CC/GG	59 (73.8)				51 (67.1)				0.385

MAF: Minor allel frekansı. p^a ve χ^2 Hardy-Weinberg dengesine uygunluk analiz sonuçlarını gösterir. p^b , vakalar ve kontrol grupları arasında yapılan genotip dağılım karşılaştırmaların ki-kare analiz sonuçlarını gösterir. Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.4.2. *PD-1* ve *PDL-1* Polimorfizmlerinin Kolorektal Kanseri Riski ile İlişkileri

PD-1 rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 ve *PDL-1* rs10815225, rs2282055, rs2297136 ve rs822336 polimorfizmlerine ait genotiplerin KKK riski ile ilişkileri sırası ile **Tablo 3.39** ve **Tablo 3.40**'da verilmiştir. Bu tablolarda risk oranları (OR) ve 95% güven aralığı (CI) değerleri yaş, cinsiyet ve sigara içme ortak değişkenlerine göre düzenlenmiş ve düzenlenmemiş olarak 2 farklı şekilde verilmiştir.

Hem düzenlenmiş hem de düzenlenmemiş veriler dikkate alındığında, rs2227982 GG genotipe kıyasla GA genotipe sahip olma durumu ile KKK riski arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi (Düzenlenmemiş OR:1.441 %95 CI:0.391-5.315, $p=0.583$; Düzenlenmiş OR:1.484, %95 CI:0.335-6.568, $p=0.603$).

CC genotipe göre kıyaslandığında rs36084323 CT genotipinin azalan KKK riski ile ileri derecede ilişkili olduğunu tespit ettik (Düzenlenmemiş OR:0.106 %95 CI: 0.041-0.271, $p<0.001$; Düzenlenmiş OR:0.068, %95 CI:0.022-0.211, $p<0.001$).

PD-1 rs7421861 GA genotipe sahip bireylerin GG genotipi taşıyanlara kıyasla KKK riski düzenlenmemiş analizde istatistiksel olarak anlamlı (OR:0.211 %95 CI:0.068-0.654, $p=0.007$); düzenlenmiş analizde ise sınır değere yakın (OR:0.337 %95 CI: 0.094-1.202, $p=0.094$) olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.39: *PD-1* rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmleri ile kolorektal kanser riski arasındaki olasılık oranları

	Düzenlenmemiş OR (%95 CI)	P	Düzenlenmiş OR (%95 CI)	P
<i>PD-1</i> rs2227982				
GG	Referans		Referans	
GA	1.441 (0.391-5.315)	0.583	1.484 (0.335-6.568)	0.603
<i>PD-1</i> rs36084323				
CC	Referans		Referans	
CT	0.106 (0.041-0.271)	<0.001	0.068 (0.022-0.211)	<0.001
<i>PD-1</i> rs7421861				
GG	Referans		Referans	
GA	0.211 (0.068-0.654)	0.007	0.337 (0.094-1.202)	0.094

OR:Odds Ratio (Göreceli olasılıklar oranı), CI: *Confidence interval* (Güven Aralığı)

PDL-1 rs10815225 GG genotipe kıyasla, hem GC (Düzenlenmemiş OR:0.698 %95 CI:0.306-1.591, p=0.392; Düzenlenmiş OR:0.680 %95 CI: 0.279-1.657, p=0.396) hem de CC (Düzenlenmemiş OR:0.551 %95 CI:0.104-2.921, p=0.484; Düzenlenmiş OR:0.554 %95 CI: 0.095-3.220, p=0.511) genotipe sahip bireyler ile KRK riski arasında belirgin bir ilişki tespit etmedik. Benzer sonuçları resesif ve dominant modelde de gözlemledik (**Tablo 3.40**).

PDL-1 rs2282055 polimorfizmine ait TG (Düzenlenmiş OR:0.613, %95 CI: 0.298-1.260, p=0.183), TT+TG (Düzenlenmiş OR:0.341, %95 CI: 0.103-1.125, p=0.077) ve TG+GG (Düzenlenmiş OR:1.891, %95 CI: 0.953-3.750, p=0.068) genotipleri ile KRK riski arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptamadık. Ancak homozigot yaygın (TT) genotiple karşılaştırıldığında rs2282055 GG genotipini düzenlenmiş modelde azalan KRK riski ile ilişkili bulduk (Düzenlenmiş OR:0.271, %95 CI: 0.078-0.940, **p=0.040**). Ancak bu ilişki cinsiyet, yaş ve sigara içme durumuna göre düzenlenmeksizin analiz yapıldığında azalmaktadır (OR:0.364, %95 CI: 0.113-1.167, p=0.089).

PDL-1 rs2297136 AA genotipi ile kıyaslandığında AG (Düzenlenmiş OR:1.008 %95 CI:0.429-2.370, p=0.985) ve GG (Düzenlenmiş OR:4.873 %95 CI:0.497-47.795, p=0.174) genotipleri ile KRK riski arasında anlamlı bir ilişki tespit etmedik. Benzer

sonuçları hem düzenlenmiş hem de düzenlenmemiş modellerde resesif ve dominant modeller için de bulduk (**Tablo 3.40**).

PDL-1 rs822336 polimorfizmine ait GC (Düzenlenmiş OR:1.707, %95 CI: 0.764-3.815, p=0.192), CC (Düzenlenmiş OR:1.578, %95 CI: 0.584-4.263, p=0.368), GG+GC (Düzenlenmiş OR:1.136, %95 CI: 0.481-2.685, p=0.771) ve GC+CC (Düzenlenmiş OR:1.668, %95 CI: 0.784-3.550, p=0.184) genotipleri ile KRK riski arasında önemli bir ilişki tespit etmedik.

Tablo 3.40: *PDL-1* rs10815225, rs2282055, rs2297136 ve rs822336 polimorfizmleri ile kolorektal kanser riski arasındaki olasılık oranları

	Düzenlenmemiş OR (%95 CI)	P	Düzenlenmiş OR (%95 CI)	P
<i>PDL-1</i> rs10815225				
GG	Referans		Referans	
GC	0.698 (0.306-1.591)	0.392	0.680 (0.279-1.657)	0.396
CC	0.551 (0.104-2.921)	0.484	0.554 (0.095-3.220)	0.511
GG+GC	0.618 (0.119-3.203)	0.566	0.623 (0.110-3.534)	0.593
GC+CC	0.673 (0.309-1.469)	0.321	0.658 (0.284-1.523)	0.328
<i>PDL-1</i> rs2282055				
TT	Referans		Referans	
TG	0.642 (0.328-1.254)	0.194	0.613 (0.298-1.260)	0.183
GG	0.364 (0.113-1.167)	0.089	0.271 (0.078-0.940)	0.040
TT+TG/GG	0.446 (0.145-1.372)	0.159	0.341 (0.103-1.125)	0.077
TT/TG+GG	1.729 (0.915-3.265)	0.092	1.891 (0.953-3.750)	0.068
<i>PDL-1</i> rs2297136				
AA	Referans		Referans	
AG	0.906 (0.414-1.984)	0.805	1.008 (0.429-2.370)	0.985
GG	4.571 (0.499-41.866)	0.179	4.873 (0.497-47.795)	0.174
AA+AG/GG	4.892 (0.571-41.910)	0.147	4.845 (0.533-44.050)	0.161
AG+GG/AA	1.003 (0.462-2.176)	0.995	1.122 (0.482-2.610)	0.789
<i>PDL-1</i> rs822336				
GG	Referans		Referans	
GC	1.351 (0.652-2.802)	0.418	1.707 (0.764-3.815)	0.192
CC	1.446 (0.579-3.609)	0.430	1.578 (0.584-4.263)	0.368
GG+GC/CC	1.195 (0.543-2.632)	0.658	1.136 (0.481-2.685)	0.771
GG/GC+CC	1.377 (0.690-2.748)	0.364	1.668 (0.784-3.550)	0.184

OR:Odds Ratio (Göreceli olasılıklar oranı), CI: Confidence interval (Güven Aralığı).

Araştırmamız dahilinde yer alan *PD-1* ve *PDL-1* polimorfizmlerine ait genotipler ve bazı hasta karakteristikleri ile KRK riski arasındaki ilişkiyi araştırmak için uyguladığımız ilk lojistik regresyon modeli **Tablo 3.41**'de verilmiştir. *PDL-1* rs822336 GC+CC (OR:4.791, %95 CI: 1.436-15.983, **p=0.011**) genotipleri artan KRK riski ile; *PD-1* rs36084323 CT genotipi ise azalan KRK riski ile ilişkili bulunmuştur (OR:0.048, %95 CI: 0.012-0.188, **p<0.001**). Modelde yer almayan *PD-1* rs7421861, *PDL-1* rs10815225, rs2282055 ve rs2297136 genotipler modele eklendiğinde ise önemli bir fark tespit etmedik. Oluşturduğumuz bu modele göre artan yaş ile birlikte KRK riskinin arttığını (OR:1.084, %95 CI: 1.040-1.131, **p<0.001**); VKİ ile ise azaldığını saptadık (OR:0.883, %95 CI: 0.799-0.975, **p=0.014**).

Tablo 3.41: Kolorektal kanser riski öngören rs36084323 ve rs822336 polimorfizmlerine ait genotiplerin ve hasta karakteristiklerinin ikili lojistik regresyon modeli

	B	S.E.	Wald	df	OR (%95 CI)	p
rs36084323 CT	-3.041	0.699	18.916	1	0.048 (0.012-0.188)	<0.001
rs822336 GC+CC	1.567	0.615	6.497	1	4.791 (1.436-15.983)	0.011
Yaş	0.081	0.021	14.342	1	1.084 (1.040-1.131)	<0.001
VKİ	-0.125	0.051	6.038	1	0.883 (0.799-0.975)	0.014
Constant	-0.759	1.541	0.243	1	0.468	0.622

VKİ, Vücut Kitle İndeksi; B, regresyon katsayısı; SH, Standart Hata; sd, serbestlik derecesi; OR, olasılık oranı; CI, güven aralığı; p, anlamlılık düzeyi. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Oluşturduğumuz bir diğer modelde ise yaş ve VKİ'ye göre düzenlendiğinde *PDL-1* rs2282055 TG+GG (OR:0.385 %95 CI: 0.130-0.986, **p=0.047**) ile *PD-1* rs36084323 CT (OR:0.054 %95 CI: 0.015-0.194, **p<0.001**) genotipleri azalan KRK riski ile ilişkili bulunmuştur (**Tablo 3.42**). Bu modele *PD-1* rs7421861, *PDL-1* rs10815225, *PDL-1* rs2297136 ve *PDL-1* rs822336 polimorfizmleri eklendiğinde KRK riski ile ilişkili önemli bir fark çıkmamıştır. Denkleme *PD-1* rs2227982 polimorfizmini eklediğimizde ise (veri tablo olarak verilmedi) yalnızca rs2282055TG+GG genotipi istatistiksel sınır değerinin hemen üzerinde bulundu ($p=0.063$).

Tablo 3.42: Kolorektal kanser riski öngören *PD-1* rs36084323 ve *PDL-1* rs2282055 polimorfizmlerine ait genotiplerin ve hasta karakteristiklerinin ikili lojistik regresyon modeli

	B	S.E.	Wald	df	OR (%95 CI)	p
rs36084323 CT	-2.921	0.653	20.032	1	0.054 (0.015-0.194)	<0.001
rs2282055 TG+GG	-1.028	0.518	3.945	1	0.385 (0.130-0.986)	0.047
Yaş	0.062	0.018	11.863	1	1.064 (1.027-1.102)	0.001
VKİ	-0.102	0.049	4.273	1	0.903 (0.820-0.995)	0.039
Constant	1.119	1.540	0.528	1		0.467

VKİ, Vücut Kitle İndeksi; B, regresyon katsayısı; SH, Standart Hata; sd, serbestlik derecesi; OR, olasılık oranı; CI, güven aralığı; p, anlamlılık düzeyi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.4.3. *PD-1* ve *PDL-1* Polimorfizmlerinin Primer Tümör Lokalizasyonu ile İlişkileri

PD-1 rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının primer tümör lokalizasyonuna göre dağılımları **Tablo 3.43**'de verilmiştir. Analiz sonuçlarımıza göre *PD-1* rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmlerine ait genotiplerin dağılımları sağ ve sol kolon kanseri hastalarında belirgin bir fark göstermemiştir ($p=0.85$, $p=0.58$ ve $p=0.57$, sırası ile).

Tablo 3.43: *PD-1* rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının primer tümör lokalizasyonuna göre dağılımları

	Sol Kolon, (%)	Sağ Kolon, (%)	p
<i>PD-1</i> rs2227982			
GG	61 (92.4)	15 (93.8)	0.85
GA	5 (7.6)	1 (6.3)	
<i>PD-1</i> rs36084323			
CC	55 (88.7)	14 (93.3)	0.58
CT	7 (11.3)	1 (6.7)	
<i>PD-1</i> rs7421861			
GG	34 (87.2)	10 (100.0)	0.57
GA	5 (12.8)	0 (0.0)	

Değişkenler n (%) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

PD-1 sonuçlarımız ile benzer şekilde hem kodominant, hem resesif hem de dominant genetik modellerde *PDL-1* rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının dağılımları primer tümör lokalizasyonuna göre farklı bulunmamıştır (**Tablo 3.44**).

Tablo 3.44: *PDL-1* rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının primer tümör lokalizasyonuna göre dağılımları

	Sol Kolon, (%)	Sağ Kolon, (%)	p
<i>PDL-1</i> rs10815225			
GG	40 (67.8)	9 (75.0)	
GC	16 (27.1)	3 (25.0)	0.70
CC	3 (5.1)	0 (0.0)	
GG+GC/CC	56 (94.9)	12 (100.0)	0.29
GC+CC/GG	19 (32.2)	3 (25.0)	0.74
<i>PDL-1</i> rs2282055			
TT	37 (56.9)	7 (50.0)	
TG	24 (36.9)	6 (42.9)	0.89
GG	4 (6.2)	1 (7.1)	
TT+TG/GG	61 (93.8)	13 (92.9)	0.89
TG+GG/TT	28 (43.1)	7 (50.0)	0.77
<i>PDL-1</i> rs2297136			
AA	15 (26.8)	6 (40.0)	
AG	36 (64.3)	8 (53.3)	0.61
GG	5 (8.9)	1 (6.7)	
AA+AG/GG	51 (91.1)	14 (93.3)	0.77
AG+GG/AA	41 (73.2)	9 (60.0)	0.35
<i>PDL-1</i> rs822336			
GG	17 (26.2)	4 (26.7)	
GC	35 (53.8)	7 (46.7)	0.83
CC	13 (20.0)	4 (26.7)	
GG+GC/CC	52 (80.0)	11 (73.3)	0.73
GC+CC/GG	48 (73.8)	11 (73.3)	0.97

Değişkenler n (%) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.4.4. PD-1 ve PDL-1 Polimorfizmleri ve Metastaz İlişkisi

PD-1 rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının metastaz varlığına göre dağılımları **Tablo 3.45**'de verilmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre PD-1 rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmlerinin genotip dağılımları metastatik ve metastatik olmayan hasta grupları arasında istatistiksel anlamlı bir fark göstermemiştir ($p=0.34$, $p=0.34$ ve $p=0.31$, sırası ile). Ancak her ne kadar istatistiksel olarak anlam taşımasa da rs2227982 ve rs36084323 polimorfizmlerinin varyant alellerini taşıyan heterozigot bireylerin tamamı metastatik hastalarda tespit edilmiştir. **Tablo 3.45**'e dahil edilmese de PD-1 rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmleri ile metastaz yeri (karaciğer, akciğer, periton) arasında da bir ilişki tespit etmedik.

Tablo 3.45: PD-1 rs2227982, rs36084323 ve rs7421861 polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının metastaz varlığına göre dağılımları

	Metastatik Olmayan, (%)	Metastatik, (%)	p
PD-1 rs2227982			
GG	17 (100.0)	59 (90.8)	0.34
GA	0 (0.0)	6 (9.2)	
PD-1 rs36084323			
CC	14 (100.0)	55 (87.3)	0.34
CT	0 (0.0)	8 (12.7)	
PD-1 rs7421861			
GG	9 (81.8)	35 (92.1)	0.31
GA	2 (18.2)	3 (7.9)	

Değişkenler n (%) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

PDL-1 rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının metastaz varlığına göre dağılımları **Tablo 3.46**'da verilmiştir. rs10815225 genotip sıklıkları metastatik ve metastatik olmayan hastalar arasında kodominant ($p=0.52$), resesif ($p=0.25$) ve dominant ($p=0.75$) modelde anlamlı bulunmamıştır. rs2282055 polimorfizminin genotip dağılımları metastatik çalışma grupları arasında kodominant ($p=0.82$) resesif ($p=0.99$) ve dominant modelde ($p=0.59$) farklı bulunmamıştır. Benzer şekilde rs2297136 varyasyonunun genotip dağılımları metastatik

ve metastatik olmayan hastalarda kodominant, resesif ve dominant modellerde anlamlı derecede farklı bulunmamıştır ($p=0.95$, $p=0.99$ ve $p=0.74$, sırası ile). Son olarak rs822336 polimorfizmine ait genotip sıklıklarının dağılımları metastatik gruplar arasında üç genetik modelde de dikkate değer derecede farklı bulunmamıştır ($p=0.30$, $p=0.75$ ve $p=0.21$ sırası ile). *PDL-1* rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmleri ile metastaz yeri (karaciğer, akciğer, periton) arasında da bir ilişki tespit etmedik (Veriler tablo olarak verilmedi).

Tablo 3.46: *PDL-1* rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının metastaz varlığına göre dağılımları

	Metastatik Olmayan, (%)	Metastatik, (%)	p
<i>PDL-1</i> rs10815225			
GG	9 (64.3)	40 (70.2)	0.52
GC	5 (35.7)	14 (24.6)	
CC	0 (0.0)	3 (5.3)	
GG+GC/CC	14 (100.0)	54 (94.7)	0.25
GC+CC/GG	5 (35.7)	17 (29.8)	0.75
<i>PDL-1</i> rs2282055			
TT	10 (62.5)	34 (54.0)	0.82
TG	5 (31.3)	25 (39.7)	
GG	1 (6.3)	4 (6.3)	
TT+TG/GG	15 (93.8)	59 (93.7)	0.99
TG+GG/TT	6 (37.5)	29 (46.0)	0.59
<i>PDL-1</i> rs2297136			
AA	4 (33.3)	17 (28.8)	0.95
AG	7 (58.3)	37 (62.7)	
GG	1 (8.3)	5 (8.5)	
AA+AG/GG	11 (91.7)	54 (91.5)	0.99
AG+GG/AA	8 (66.7)	42 (71.2)	0.74
<i>PDL-1</i> rs822336			
GG	2 (11.8)	19 (30.2)	0.30
GC	11 (64.7)	31 (49.2)	
CC	4 (23.5)	13 (20.6)	
GG+GC/CC	13 (76.5)	50 (79.4)	0.75
GC+CC/GG	15 (88.2)	44 (69.8)	0.21

Değişkenler n (%) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.4.5. *PD-1* ve *PDL-1* Polimorfizmlerinin Kolorektal Kanser Hastalarının Sağ Kalım Süreleri ile İlişkisi

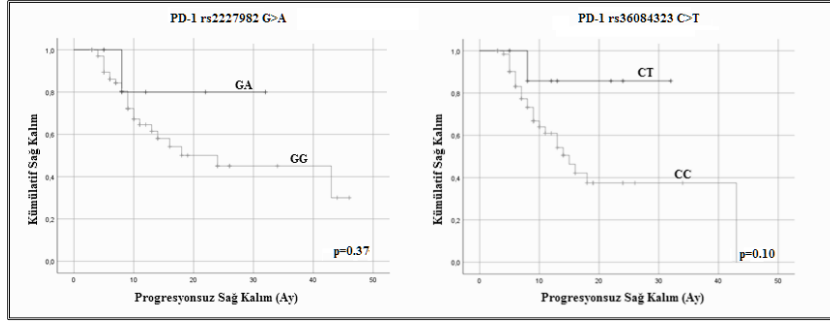
PD-1 rs2227982 ve rs36084323 polimorfizmlerine ait genotiplerin çalışma grubumuzda yer alan KKK hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerine etkileri **Tablo 3.47**'de verilmiştir. *PD-1* rs7421861 polimorfizmi sağ kalım analizleri heterozigot bireylerin hepsi sansürlü olduğundan hesaplanamamıştır.

PD-1 rs2227982 homozigot yabanıl (GG) ve heterozigot (GA) genotiplere sahip vakaların progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında önemli fark tespit etmedik (Log rank=0.811, p=0.37). *PD-1* rs36084323 homozigot yabanıl (CC) ve heterozigot (CT) genotipleri ile çalışma grubumuzdaki hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında da önemli bir ilişki tespit etmedik (Log rank=2.783, p:0.10) (**Şekil 3.16**).

Tablo 3.47: *PD-1* rs2227982 ve rs36084323 polimorfizmlerine ait genotiplerin KKK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Progresyonsuz Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>PD-1</i> rs2227982			
GG	26.38 ± 2.85 (20.792-31.967)	0.811	0.37
GA	27.20 ± 4.29 (18.785-35.615)		
<i>PD-1</i> rs36084323			
CC	22.47 ± 2.82 (16.94-28.00)	2.783	0.10
CT	28.57 ± 3.17 (22.35-34.79)		

Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.



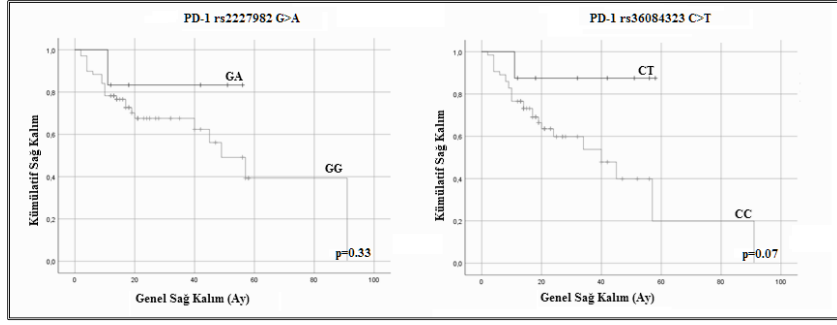
Şekil 3.16: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *PD-1* rs2227982 ve rs36084323 polimorfizmlerine ait genotiplere göre dağılımları

PD-1 rs2227982 ve rs36084323 polimorfizmlerine ait genotiplerin çalışma grubumuzda yer alan KRK hastalarının genel sağ kalım sürelerine etkileri **Tablo 3.48**'de verilmiştir. rs2227982 genotipleri ile hastaların genel sağ kalım süreleri arasında önemli bir fark sapmadık (Log rank=0.956, p=0.33). rs36084323 CC ve CT genotipleri ile genel sağ kalım süreleri arasında belirgin bir fark olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Log rank=3.199, p=0.07) (**Şekil 3.17**).

Tablo 3.48: *PD-1* rs2227982 ve rs36084323 polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Genel Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>PD-1</i> rs2227982			
GG	52.98 ± 6.20 (40.83-65.13)	0.956	0.33
GA	48.50 ± 6.85 (35.08-61.92)		
<i>PD-1</i> rs36084323			
CC	42.26 ± 6.91 (28.72-55.81)	3.199	0.07
CT	52.13 ± 5.50 (41.35-62.90)		

Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.



Şekil 3.17: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *PD-1* rs2227982 ve rs36084323 polimorfizmlerine ait genotiplere göre dağılımları

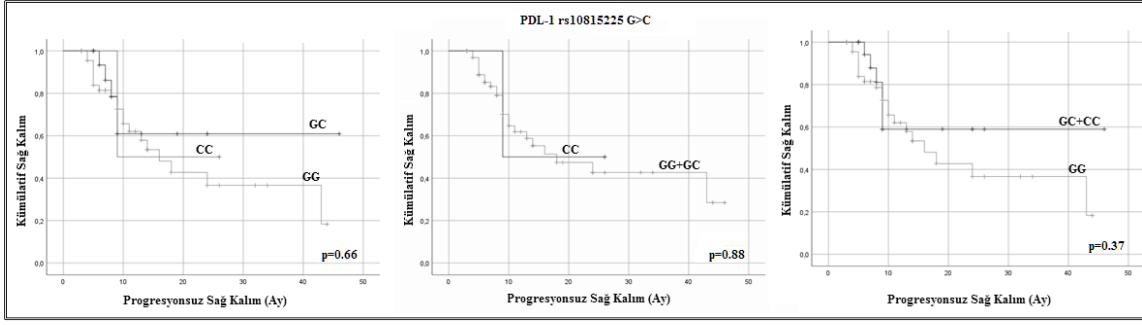
PDL-1 rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotiplerin KKK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri **Tablo 3.49**'da; genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri **Tablo 3.50**'da verilmiştir.

Tablo 3.49: *PDL-1* rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotiplerin KKK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Progresyonsuz Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>PDL-1</i> rs10815225			
GG	23.15 ± 3.13 (17.01-29.29)		
GC	31.12 ± 5.28 (20.78-41.46)	0.829	0.66
CC	17.50 ± 6.01 (5.72-29.28)		
GG+GC/CC	25.44 ± 2.88 (19.79-31.10)	0.023	0.88
GC+CC/GG	30.45 ± 4.93 (20.78-40.12)	0.808	0.37
<i>PDL-1</i> rs2282055			
TT	22.88 ± 2.34 (18.29-27.46)		
TG	27.55 ± 4.57 (18.60-36.51)	6.162	0.05
GG	08.00 ± 1.24 (5.56-10.44)		
TT+TG/GG	27.98 ± 2.81 (22.47-33.50)	6.054	0.01
TG+GG/TT	24.83 ± 4.26 (16.47-33.18)	0.766	0.38
<i>PDL-1</i> rs2297136			
AA	24.70 ± 2.77 (19.27-30.12)		
AG	24.22 ± 3.64 (17.08-31.36)	3.098	0.21
GG	34.67 ± 7.62 (19.73-49.60)		
AA+AG/GG	27.21 ± 2.97 (21.40-33.03)	1.354	0.25
AG+GG/AA	25.58 ± 3.44 (18.83-32.34)	1.022	0.31
<i>PDL-1</i> rs822336			
GG	22.25 ± 4.67 (13.09-31.41)		
GC	26.93 ± 4.01 (19.06-34.79)	1.832	0.40
CC	23.13 ± 3.38 (16.50-29.75)		
GG+GC/CC	25.59 ± 3.16 (19.39-31.79)	0.139	0.71
GC+CC/GG	27.30 ± 3.12 (21.18-33.42)	1.824	0.18

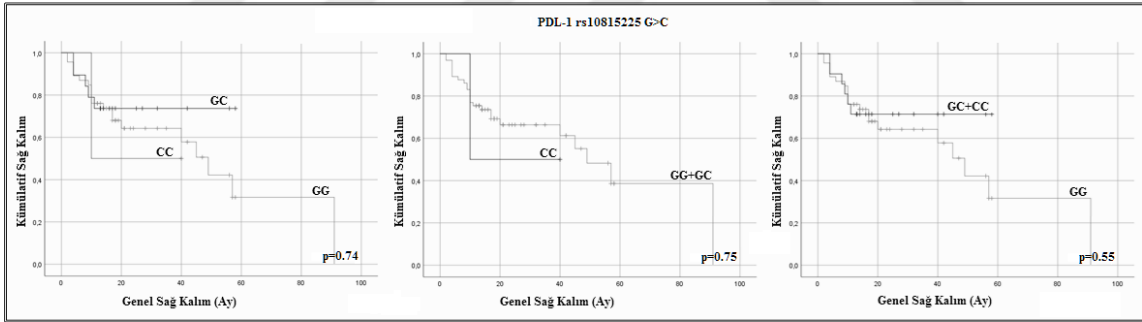
Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

Çalışma grubumuzda *PDL-1* rs10815225 polimorfizmi GG, GC ve CC genotipleri ile hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında anlamlı bir fark tespit etmedik (Log rank=0.829, p=0.66). Benzer şekilde CC genotipi ile kıyaslandığında GG+GC (Log rank=0.023, p=0.88); GG genotipi ile kıyaslandığında ise GC+CC (Log rank=0.808, p=0.37) genotiplerini de progresyonsuz sağ kalım ile ilişkili bulmadık (Şekil 3.18).



Şekil 3.18: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs10815225 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

Çalışma grubumuzdaki KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile *PDL-1* rs10815225 polimorfizmi genotipleri incelendiğinde ise GG, GC ve CC genotipleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark tespit etmedik (Log rank=0.591, $p=0.74$). CC genotipi ile kıyaslandığında GG+GC (Log rank=0.099, $p=0.75$); GG genotipi ile kıyaslandığında ise GC+CC (Log rank=0.350, $p=0.55$) genotiplerini de KRK genel sağ kalım ile ilişkili bulmadık (Şekil 3.19).

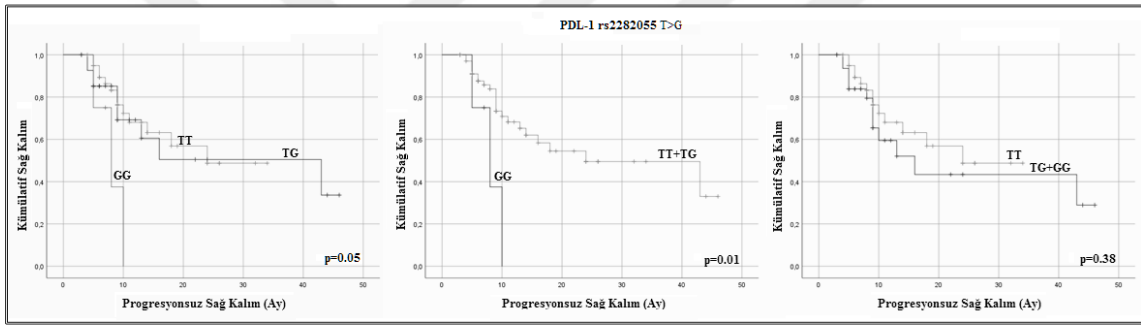


Şekil 3.19: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs10815225 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

Çoklu karşılaştırmalarda *PDL-1* rs2282055 polimorfizmine ait TT, TG ve GG genotipleri ile progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit ettik (Log rank=6.162, $p=0.05$). 3 genotip arasındaki ilişki Bonferroni yöntemi ile detaylı olarak incelendiğinde ise yalnızca TT genotiplerine sahip hastaların GG genotiplerine sahip hastalara kıyasla anlamlı derecede daha uzun progresyonsuz sağ kalım sürelerine sahip olduğunu tespit ettik (Log rank $p=0.013$; Bonferroni yöntemine göre düzenlenen anlamlılık değeri, $\alpha=0.017$, Tabloda verilmedi). Bonferroni yöntemine

göre rs2282055 TT ve TG genotipleri karşılaştırıldığında (*Bonferroni* düzeltilmiş Log rank $p=0.745$, Tabloda verilmedi) ya da TG ve GG genotipleri karşılaştırıldığında (*Bonferroni* düzeltilmiş Log rank $p=0.036$, Tabloda verilmedi) progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

Resesif modelde yaptığımız karşılaştırmada ise TT+TG genotipli bireylerin progresyonsuz sağ kalım süreleri GG genotipi bireylere göre daha uzun olarak belirlenmiştir (Log rank=6.054, $p=0.01$). Ancak dominant modeldeki karşılaştırmada ise *PDL-1* rs2282055 polimorfizmi ile progresyonsuz sağ kalım süresi arasındaki ilişki ortadan kalkmıştır (Log rank=0.766, $p=0.38$) (**Şekil 3.20**). Resesif modelde elde ettiğimiz sonuçlar *Bonferroni* yöntemi ile düzenlenmiş sonuçlarımızı destekler niteliktedir.



Şekil 3.20: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs2282055 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

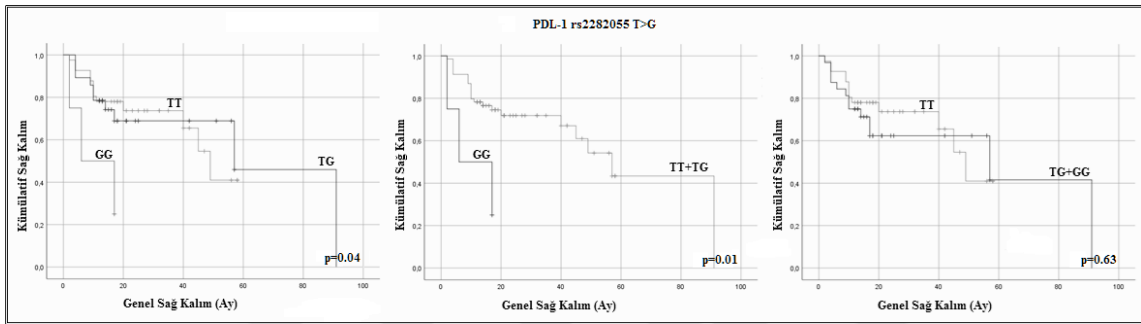
Tablo 3.50: *PDL-1* rs2282055, rs822336, rs10815225 ve rs2297136 polimorfizmlerine ait genotiplerin KKK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Genel Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>PDL-1</i> rs10815225			
GG	48.34 ± 6.91 (34.80-61.89)		
GC	44.63 ± 5.14 (34.55-54.71)	0.591	0.74
CC	25.00 ± 10.61 (4.21-45.79)		
GG+GC/CC	52.01 ± 6.22 (39.81-64.21)	0.099	0.75
GC+CC/GG	43.20 ± 4.97 (33.87-53.37)	0.350	0.55
<i>PDL-1</i> rs2282055			
TT	41.18 ± 3.62 (34.10-48.27)		
TG	57.87 ± 9.61 (39.04-76.70)	6.608	0.04
GG	10.50 ± 4.07 (2.52-18.48)		
TT+TG/GG	56.34 ± 6.22 (44.15-68.52)	6.603	0.01
TG+GG/TT	53.24 ± 8.99 (35.62-70.85)	0.232	0.63
<i>PDL-1</i> rs2297136			
AA	40.44 ± 4.45 (31.72-49.15)		
AG	49.03 ± 8.05 (33.26-64.80)	1.598	0.45
GG	49.00 ± 7.16 (34.98-63.03)		
AA+AG/GG	52.33 ± 7.46 (37.70-66.96)	0.828	0.36
AG+GG/AA	52.33 ± 7.40 (37.83-66.83)	0.448	0.50
<i>PDL-1</i> rs822336			
GG	30.40 ± 5.53 (19.56-41.24)		
GC	58.67 ± 8.84 (41.35-75.99)	4.400	0.11
CC	40.44 ± 5.60 (29.45-51.42)		
GG+GC/CC	53.14 ± 7.13 (39.18-67.11)	0.003	0.95
GC+CC/GG	57.03 ± 6.90 (43.51-70.55)	4.070	0.04

Progresyonsuz sağ kalım sürelerine benzer olarak *PDL-1* rs2282055 TT, TG ve GG genotipleri dağılımları ile hastaların genel sağ kalım süreleri arasında da istatistiksel anlamlı bir fark gözlemledik (Log rank=6.608, p=0.04). 3 genotip arasındaki ilişki *Bonferroni* yöntemi ile detaylı olarak incelendiğinde ise sadece TT ve GG genotipleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bulduk (*Bonferroni* yöntemine göre düzenlenen anlamlılık değeri, $\alpha=0.017$). Buna göre rs2282055 TT genotipi GG genotipinden daha uzun genel sağ kalım süreleri ile sonuçlanmıştır (*Bonferroni* düzeltilmiş Log rank **p=0.009**, Tabloda verilmedi). TT ile TG genotipleri (*Bonferroni* düzeltilmiş log rank p=0.936, Tabloda verilmedi) ile TG ve GG (*Bonferroni* düzeltilmiş

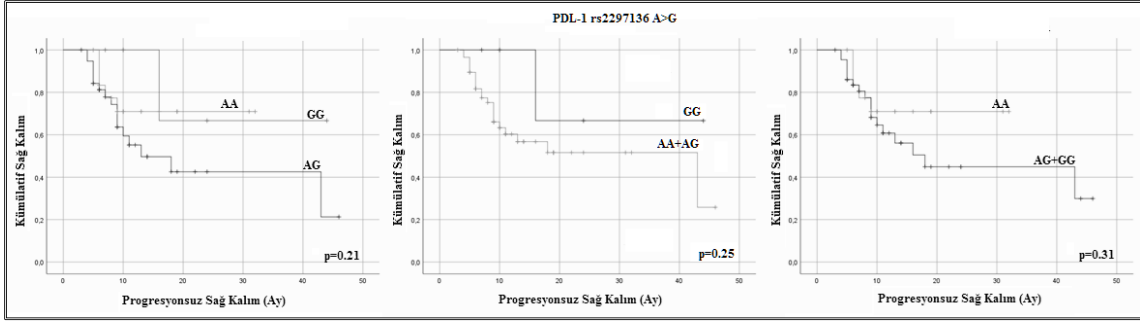
log rank $p=0.051$, Tabloda verilmedi) genotipleri arasındaki ikili karşılaştırmalarda gruplar arasında istatistiksel önem ifade eden bir fark tespit edilmedi.

Resesif modeldeki incelemede, TT+TG genotiplerine sahip hastaların genel sağ kalım süreleri GG genotipli hastalara kıyasla oldukça yüksek bulunmuştur (Log rank=6.603, $p=0.01$). Dominant modeldeki karşılaştırmada ise bu ilişkinin ortadan kalktığını tespit ettik (Log rank=0.232, $p=0.63$) (Şekil 3.21). Resesif modeldeki karşılaştırmadan elde ettiğimiz sonuçlarımız *Bonferroni* ile düzenlenmiş analiz sonuçlarımız ile paralellik göstermektedir.



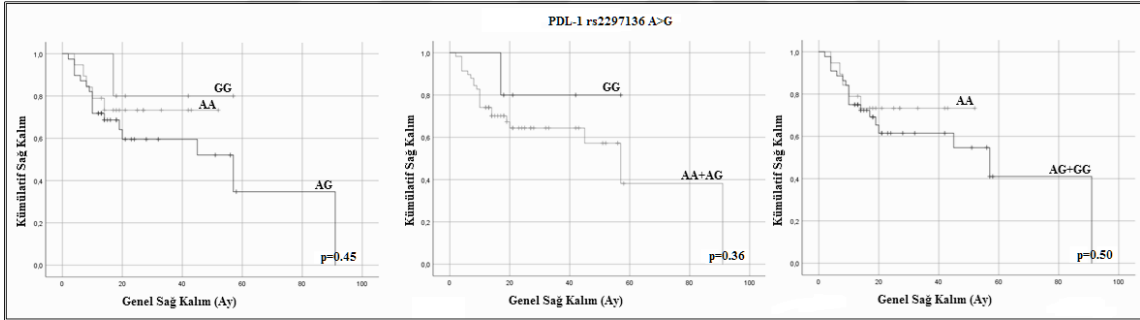
Şekil 3.21: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs2282055 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

Çalışma grubumuzda yer alan KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerine *PDL-1* rs2297136 polimorfizmine ait AA, AG ve GG genotiplerinin etkileri incelendiğinde, rs2297136 polimorfizmi KRK progresyonsuz sağ kalımı ile ilişkili bulunmamıştır (Log rank=3.098, $p=0.21$). Kodominant modelin yanı sıra, GG genotipi ile kıyaslandığında AA+AG (Log rank=1.354, $p=0.25$); AA genotipi ile kıyaslandığında ise AG+GG (Log rank=1.022, $p=0.31$) genotipleri ile progresyonsuz sağ kalım arasında da belirgin bir ilişki bulunmamıştır (Şekil 3.22).



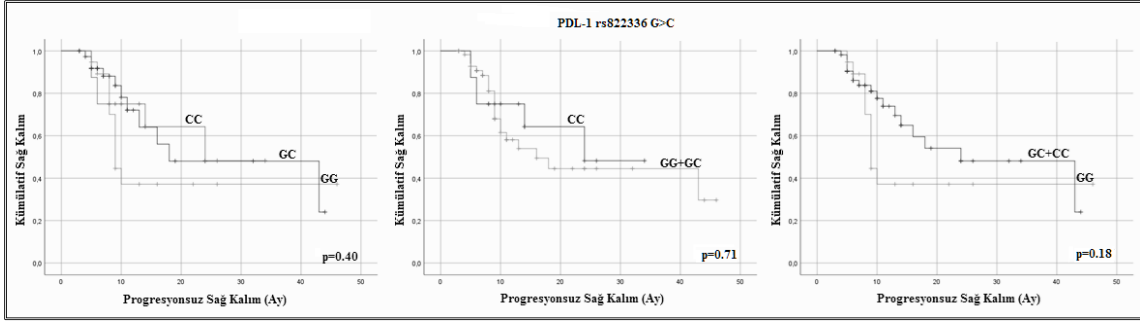
Şekil 3.22: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs2297136 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

Progresyonsuz sağ kalım ile benzer şekilde rs2297136 AA, AG ve GG genotipleri ile hastaların genel sağ kalım süreleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır (Log rank=1.598, $p=0.45$). Kodominant modele benzer olarak resesif (Log rank=0.828, $p=0.36$) ve dominant modellerde (Log rank=0.448, $p=0.50$) de göze çarpan bir ilişki tespit edilmemiştir (**Şekil 3.23**).



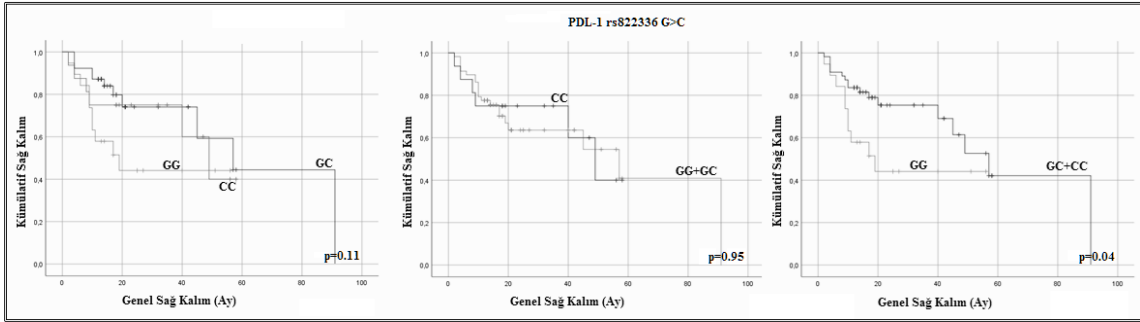
Şekil 3.23: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs2297136 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

PDL-1 rs822336 polimorfizmine ait GG, GC ve CC genotipleri ile hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit etmedik (Log rank=1.832, $p=0.40$). Benzer şekilde resesif (GG+GC/CC, Log rank=0.139, $p=0.71$) ve dominant (GC+CC/GG, Log rank=1.824, $p=0.18$) kıyaslamalarda da bir fark saptamadık (**Şekil 3.24**).



Şekil 3.24: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs822336 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

Hastaların genel sağ kalım süreleri incelendiğinde ise, kodominant modelde GG, GC ve CC genotipleri arasında dikkate değer bir fark saptanmadı (Log rank=4.400, p=0.11). Genel sağ kalım süreleri arasında resesif modeldeki incelemede anlamlı bir fark tespit edilmezken (Log rank=0.003, p=0.95); varyant allelleri içeren GC+CC genotiplerinin, varyant allel içermeyen yabanıl GG genotiple kıyaslandığı dominant modelde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark kaydettik (Log rank=4.070, p=0.04). Buna göre rs822336 varyant allel içeren genotipleri taşıyan hastaların genel sağ kalım süreleri, yaygın genotipe sahip hastalara kıyasla oldukça uzun olarak tespit edildi (Şekil 3.25).



Şekil 3.25: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs822336 polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

3.5. VEGF Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi

3.5.1. VEGF-A +405G>C ve -460C>T Gen Polimorfizmlerinin Genel Dağılımları

VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerinin incelediği çalışma grubuna ait klinopatolojik veriler **Tablo 3.51**'de verilmiştir. Çalışma grubumuzdaki bireylerin cinsiyete göre dağılımları vaka ve kontroller arasında önemli derecede farklı değildi. Kontrol grubumuzun vücut kitle indeksi ortalaması kısmen daha yüksektir. Vakaların ortalama progresyonsuz sağ kalım süresi 11.87 ay; genel sağ kalım süresi ise 22.63 aydır. Vakaların %22.8'inde primer tümörün yeri sağ kolon olarak belirlenmiştir. Hastalarımızın %81.0'i metastatiktir. En yaygın metastaz tipi karaciğer olup; bunu periton metastazı izlemektedir.

Tablo 3.51: VEGF-A polimorfizmlerinin incelediği çalışma grubuna ait demografik, klinik ve patolojik özelliklerinin dağılımı

	Vaka, n (%)	Kontrol, n (%)
Cinsiyet, n (%)	33 (41.8)	31 (41.9)
Kadın	46 (58.2)	43 (58.1)
Erkek		
Yaş	59.78 ± 1.30 (28-82)	53.75 ± 1.9 (22-85)
VKI	26.26 ± 0.5 (18.25-40.57)	27.28 ± 0.5 (19.05-41.62)
Sigara, n (%)		
Hayır	33 (41.8)	33 (47.1)
Evet	9 (11.4)	25 (35.7)
Eski Kullanıcı	37 (46.8)	12 (17.1)
PFS	11.87 ± 8.5 (3-44)	
OSS	22.63 ± 17.48 (2-91)	
Primer Tümör		
Lokalizasyonu, n (%)		
Sağ	18 (22.8)	
Sol	61 (77.2)	
Metastaz, n (%)		
Yok	15 (19.0)	
Karaciğer	61 (80.3)	
Periton	3 (4.7)	
KRAS Mutant	25 (31.6)	
Ölüm	31 (42.5)	

VKİ: Vücut Kitle İndeksi. PSK: Progresyonsuz Sağ Kalım. GSK: Genel Sağ Kalım. Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. Yaş, ağırlık, VKİ, PSK, GSK değerleri ortalama $\pm$ standart hata (min-maks) olarak ifade edildi.

VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait vaka ve kontrollerdeki karşılaştırmalı genotip sıklıkları **Tablo 3.52**'de verilmiştir. Çalışma grubumuzda *VEGF-A* rs1570360 polimorfizmine ait heterozigot ve mutant bireyler tespit etmedik. *VEGF-A* -460C>T polimorfizmine ait genotip dağılımları vakalarda ve kontrollerde *Hardy Weinberg* dengesine uyum gösterirken, +405G>C polimorfizmi kontrollerde sapma göstermiştir.

VEGF-A +405G>C polimorfizmine ait homozigot yaygın (GG), heterozigot (GC) ve homozigot mutant (CC) genotip dağılımlarını vakalarda sırası ile %27.5, %52.5 ve %20; kontrollerde ise %41.5, %32.1 ve %26.4 olarak tespit ettik. *VEGF-A* +405G>C polimorfizmine ait genotip sıklıkları vaka ve kontrollerde önemli derecede farklı bulunmadı ($p=0.136$). GG+GC genotipli bireylerin CC genotipli bireylerle kıyaslandığı resesif genetik modelde ve GC+CC genotipli bireylerin GG genotipli bireyler ile kıyaslandığı dominant modelde de vaka ve kontroller arasında belirgin bir fark tespit etmedik ($p=0.623$ ve $p=0.193$, sırası ile).

VEGF-A -460C>T polimorfizmine ait homozigot yaygın (CC), heterozigot (CT) ve homozigot mutant (TT) genotiplerin vakalardaki dağılımları sırası ile %36.5, %54.1 ve %9.5; kontrollerdeki dağılımları ise %24.2, %59.7 ve %16.1 olarak tespit edilmiştir ($p=0.219$). CC+CT genotipli bireylerin TT genotipli bireyler ile kıyaslandığı resesif modelde ve CT+TT genotipli bireylerin CC genotipli bireyler ile kıyaslandığı dominant modelde de -460C>T polimorfizmine ait genotip dağılımları farkları vaka ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.301$ ve $p=0.139$, sırası ile).

Tablo 3.52: *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotip ve allel sıklıklarının vaka ve kontrollerdeki dağılımları

Vaka					Kontrol				p ^b
+405G>C	n:40 (%)	MAF	χ^2	p ^a	n:53 (%)	MAF	χ^2	p ^a	
GG	11 (27.5)				22 (41.5)				
GC	21 (52.5)	0.463	0.125	0.72	17 (32.1)	0.425	6.255	0.01	0.136
CC	8 (20.0)				14 (26.4)				
GG+GC/CC	32 (80.0)				39 (73.6)				0.623
GC+CC/GG	29 (72.5)				31 (58.5)				0.193
-460C>T	n: 74 (%)	MAF	χ^2	p ^a	n: 62 (%)	MAF	χ^2	p ^a	
CC	27 (36.5)				15 (24.2)				
CT	40 (54.1)	0.365	2.045	0.15	37 (59.7)	0.460	2.513	0.11	0.219
TT	7 (9.5)				10 (16.1)				
CC+CT/TT	67 (90.5)				52 (83.9)				0.301
CT+TT/CC	47 (63.5)				47 (75.8)				0.139

MAF: Minor allel frekansı. p^a ve χ^2 Hardy-Weinberg dengesine uygunluk analizi sonuçlarını gösterir. p^b, vakalar ve kontrol grupları arasında yapılan genotip dağılım karşılaştırmaların ki-kare analiz sonuçlarını gösterir. Kategorik değişkenler n (%) olarak ifade edildi. p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.5.2. *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T Polimorfizmlerinin Kolorektal Kanseri Riski ile İlişkileri

VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK riski ile ilişkileri **Tablo 3.53**'te verilmiştir. Bu tablolarda risk oranları (OR) ve 95% güven aralığı (CI) değerleri yaş, cinsiyet ve sigara içme ortak değişkenlerine göre düzenlenmiş ve düzenlenmemiş olarak 2 farklı şekilde verilmiştir.

Her kadar *VEGF-A* +405G>C polimorfizmi GC genotipi GG genotipe kıyasla, hem düzenlenmemiş (OR:2.471 %95 CI=0.941-6.490, p=0.066) hem de düzenlenmiş modelde (OR:2.643 %95 CI=0.916-7.624, p=0.072) artan KRK riski ile yakın ilişkili bulunsa da sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlı değildi. GC genotipinden farklı olarak GG genotipi KRK riski ile dikkate değer derecede ilişkili bulunmamıştır. *VEGF-A* -460CC genotipi ile kıyaslandığında CT (Düzenlenmiş OR:0.534 %95 CI=0.230-

1.241, p=0.145) ve TT (Düzenlenmiş OR:0.604 %95 CI=0.170-2.154, p=0.437) genotipleri ise KRK riski ile ilişkili bulunmamıştır.

Tablo 3.53: VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmleri ile kolorektal kanser riski arasındaki olasılık oranları

	Düzenlenmemiş OR (%95 CI)	p	Düzenlenmiş OR (%95 CI)	p
VEGF-A +405G>C				
GG	Referans		Referans	
GC	2.471 (0.941-6.490)	0.066	2.643 (0.916-7.624)	0.072
CC	1.143 (0.369-3.540)	0.817	1.351 (0.389-4.698)	0.636
GG+GC/CC	1.436 (0.535-3.851)	0.472	1.284 (0.436-3.788)	0.650
GC+CC/GG	1.871 (0.773-4.526)	0.165	2.101 (0.793-5.568)	0.136
VEGF-A -460C>T				
CC	Referans			
CT	0.601 (0.277-1.302)	0.196	0.534 (0.230-1.241)	0.145
TT	0.389 (0.123-1.233)	0.109	0.604 (0.170-2.154)	0.437
CC+CT/TT	1.841 (0.656-5.164)	0.246	1.097 (0.350-3.437)	0.874
CT+TT/CC	0.556 (0.263-1.176)	0.124	0.545 (0.241-1.235)	0.146

OR:Odds Ratio (Göreceli olasılıklar oranı), CI:Confidence interval (Güven Aralığı).

3.5.3. VEGF-A +405G>C ve -460C>T Polimorfizmlerinin Primer Tümör Lokalizasyonu ile İlişkileri

VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının primer tümör lokalizasyonuna göre dağılımları **Tablo 3.54**'de verilmiştir.

Yaptığımız temel analizler sonucunda VEGF-A +405G>C polimorfizmine ait genotiplerin kodominant, resesif ve dominant dağılımları sağ ve sol kolonda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak dominant modelde GC+CC genotip sıklıkları sol kolonda sağ kolona göre daha yüksek bulunmuştur (p=0.08). Bu sebeple GC+CC genotipleri ve sol kolon kanseri riskini ikili lojistik regresyon analizi ile inceledik (**Tablo 3.55**). Buna göre VEGF-A +405GC+CC genotipleri artan sol kolon kanseri riski ile ilişkili bulunmuştur (Düzenlenmemiş OR:5.208 %95 CI=1.064-25.496, p=**0.04**).

Benzer şekilde *VEGF-A* -460C>T polimorfizmine ait genotip dağılımları sağ ve sol kolon grupları arasında kodominant, resesif ve dominant genetik modellerde istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak varyant allellerin homozigot yaygın genotiple karşılaştırıldığı dominant modelde genotip dağılımları istatistiksel anlam sınırına yakın bulunmuştur (p=0.09). CT+TT genotiplerinin sol kolon kanseri ile ilişkisi de ikili lojistik regresyon analizi ile incelendiğinde ise +405G>C polimorfizmi kadar olmasa da -460CT+TT genotipleri artan sol kolon kanseri ile kısmen ilişkili bulunmuştur (Düzenlenmemiş OR:2.868, %95 CI=0.964-8.532, p=0.06) (**Tablo 3.55**).

Tablo 3.54: *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının primer tümör lokalizasyonuna göre dağılımları

	Sol Kolon, (%)	Sağ Kolon, (%)	p
<i>VEGF-A</i> +405G>C			
GG	6 (19.4)	5 (55.6)	0.10
GC	18 (58.1)	3 (33.3)	
CC	7 (22.6)	1 (11.1)	
GG+GC/CC	24 (77.4)	8 (88.9)	0.66
GC+CC/GG	25 (80.6)	4 (44.4)	0.08
<i>VEGF-A</i> -460C>T			
CC	17 (30.4)	10 (55.6)	0.15
CT	33 (58.9)	7 (38.9)	
TT	6 (10.7)	1 (5.6)	
CC+CT/TT	50 (89.3)	17 (94.4)	0.49
CT+TT/CC	39 (69.6)	8 (44.4)	0.09

Değişkenler n (%) olarak ifade edildi. p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 3.55: *VEGF-A* +405GC+CC ve -460CT+TT genotipleri ile sol kolon kanseri riski arasındaki olasılık oranları

	OR (%95 CI)	p
<i>VEGF-A</i> +405G>C		
GG	Referans	
GC+CC	5.208 (1.064-25.496)	0.04
<i>VEGF-A</i> -460C>T		
CC	Referans	
CT+TT	2.868 (0.964-8.532)	0.06

OR:Odds Ratio (Göreceli olasılıklar oranı), CI:Confidence interval (Güven Aralığı).

3.5.4. VEGF-A +405G>C ve -460C>T Polimorfizmlerinin Metastaz ile İlişkileri

VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının metastaz varlığına göre dağılımları **Tablo 3.56**'da verilmiştir. VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmleri incelenen hastaların 15'i metastatik olmayan 64'ü ise metastatik hastalardan meydana gelmektedir. 64 metastatik hastanın ise yalnızca 3'ü periton metastazı olduğundan dolayı çalışmamızın bu kısmında VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerinin yalnızca karaciğer metastazı ile olan ilişkilerini inceledik.

VEGF-A +405G>C polimorfizmine ait genotip sıklıkları metastatik olmayan ve karaciğer metastazı olan gruplarda sırası ile GG için %0.0 ve %31.3; GC için %83.3 ve %46.9; CC için %16.7 ve %21.9 olarak tespit edilmiştir. +405G>C polimorfizmi genotip dağılımları karaciğer metastazı olan ve metastatik olmayan hasta grupları arasında istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır (p=0.20). Benzer sonuçlar resesif ve dominant modellerde de saptanmıştır (**Tablo 3.56**).

Tablo 3.56: VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotip sıklıklarının metastaz varlığına göre dağılımları

	Metastaz Yok, (%)	Karaciğer Metastazı, (%)	p
VEGF-A +405G>C			
GG	0 (0.0)	10 (31.3)	0.20
GC	5 (83.3)	15 (46.9)	
CC	1 (16.7)	7 (21.9)	
GG+GC/CC	5 (83.3)	27 (78.1)	0.77
GC+CC/GG	6 (100.0)	22 (68.8)	0.17
VEGF-A -460C>T			
CC	2 (13.3)	25 (44.6)	0.04
CT	10 (66.7)	28 (50.0)	
TT	3 (20.0)	3 (5.4)	
CC+CT/TT	12 (80.0)	53 (94.6)	0.10
CT+TT/CC	13 (86.7)	31 (55.4)	0.04

Değişkenler n (%) olarak ifade edildi. p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

VEGF-A -460C>T polimorfizmine ait genotip sıklıkları metastatik olmayan ve karaciğer metastazı olan gruplarda sırası ile CC için %13.3 ve %44.6; CT için %66.7 ve %50.0; TT için %20.0 ve %5.4 olarak tespit edilmiştir. Buna göre metastatik olmayan hastalarda karaciğer metastazı olanlara kıyasla varyant allel taşıyan genotiplerin yüzdesi daha yüksek bulunmuştur ($p=0.04$). Dominant modeldeki incelememizde de CT+TT genotip sıklıkları metastatik olmayan grupta metastatik olan gruba kıyasla yüksek bulunmuştur ($p=0.04$). İkili lojistik regresyon analizine göre ise CC genotipine kıyasla CT (OR:0.224 %95 CI=0.045-1.122, $p=0.07$) ve TT (OR:0.080 %95 CI=0.009-0.689, $p=0.02$) genotipe sahip olmanın azalan metastaz riski ile ilişkili olduğunu tespit ettik. Söz konusu ilişki TT genotipi için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**Tablo 3.57**).

Tablo 3.57: *VEGF-A* -460C>T polimorfizminin karaciğer metastazı ile ilişkisi

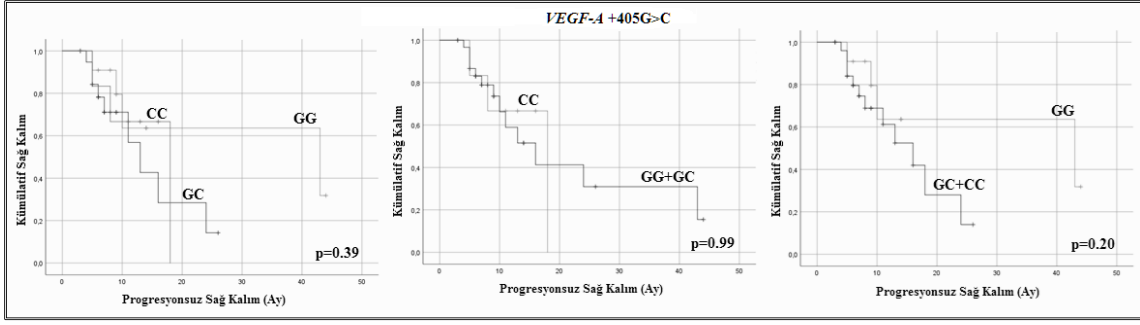
<i>VEGF-A</i> -460C>T	OR (%95 CI)	p
CC	Referans	
CT	0.224 (0.045-1.122)	0.07
TT	0.080 (0.009-0.689)	0.02
CT+TT	0.191 (0.039-0.925)	0.04

OR:Odds Ratio (Göreceli olasılıklar oranı), CI:Confidence interval (Güven Aralığı).

3.5.5. *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T Polimorfizmlerinin Kolorektal Kanser Hastalarının Sağ Kalım Süreleri ile İlişkileri

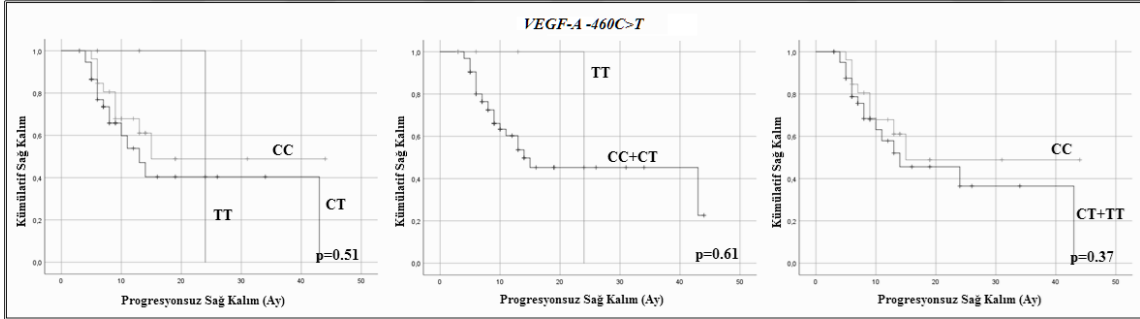
VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri **Tablo 3.58**'de verilmiştir.

VEGF-A +405G>C polimorfizmine ait genotipler ile KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında kodominant, resesif ve dominant modellerde istatistiksel anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. GG genotipine sahip hastalar GC ve CC genotiplere sahip olanlara kıyasla daha uzun progresyonsuz sağ kalım sürelerine sahip olsa da sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi (Log rank=1.88, $p=0.39$). *VEGF-A* +405G>C polimorfizmi genotiplerine ait progresyonsuz sağ kalım eğrileri **Şekil 3.26**'da verilmiştir.



Şekil 3.26: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *VEGF-A +405G>C* polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

VEGF-A -460C>T polimorfizmine ait CC, CT ve TT genotiplerini taşıyan hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri istatistiksel olarak farklı bulunmadı (Log rank=1.35 p=0.51). Benzer şekilde TT genotipli hastalara kıyasla CC+CT genotiplerine sahip hastalar (Log rank=0.26 p=0.61) ile CC genotiplere kıyasla CT+TT genotiplere sahip hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında da istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Log rank=0.81 p=0.37). *VEGF-A -460C>T* genotiplerine ait progresyonsuz sağ kalım eğrileri Şekil 3.27’de verilmiştir.



Şekil 3.27: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerinin *VEGF-A -460C>T* polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

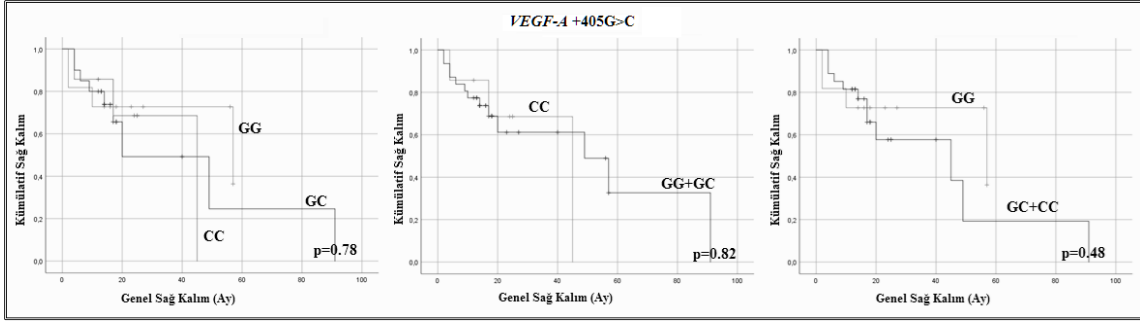
Tablo 3.58: *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Progresyonsuz Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>VEGF-A</i> +405G>C			
GG	30.75 ± 6.127 (18.74-42.76)		
GC	14.39 ± 2.344 (9.80-18.99)	1.88	0.39
CC	14.17 ± 2.745 (8.79-19.55)		
GG+GC/CC	21.70 ± 4.09 (13.68-29.71)	0.00	0.99
GC+CC/GG	15.01 ± 1.92 (11.24-18.77)	1.62	0.20
<i>VEGF-A</i> -460C>T			
CC	26.55 ± 4.45 (17.79-35.26)		
CT	22.49 ± 3.89 (14.87-30.11)	1.35	0.51
TT	24.00 ± 0.0 (24.0-24.0)		
CC+CT/TT	24.60 ± 2.82 (19.07-30.12)	0.26	0.61
CT+TT/CC	22.53 ± 3.67 (15.35-29.72)	0.81	0.37

Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

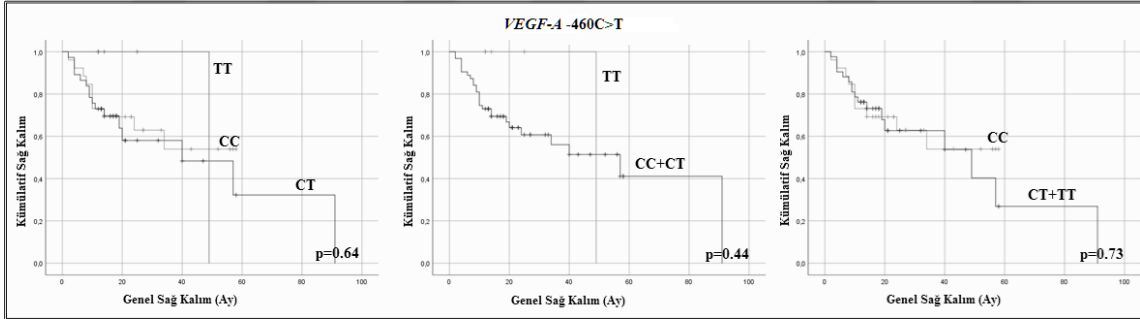
VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri **Tablo 3.59**'da verilmiştir.

Çalışmamızda *VEGF-A* +405G>C polimorfizmi GG, GC ve CC genotipleri ile KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Log rank=0.49, p=0.78). Benzer şekilde CC genotipi taşıyan hastalara kıyasla GG+GC (Log rank=0.05, p=0.82); GG genotipi taşıyan hastalara kıyasla da GC+CC genotiplerine sahip hastaların genel sağ kalım süreleri arasında da dikkate değer bir fark tespit edilmemiştir (Log rank=0.49, p=0.48). *VEGF-A* +405G>C polimorfizmi genotiplerine ait genel sağ kalım eğrileri **Şekil 3.28**'de verilmiştir.



Şekil 3.28: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *VEGF-A* +405 G>C polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

VEGF-A -460C>T polimorfizmi CC, CT ve TT genotipleri ile KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Log rank=0.90, p=0.64). Benzer şekilde TT genotipi taşıyan hastalara kıyasla CC+CT (Log rank=0.59, p=0.44); CC genotipi taşıyan hastalara kıyasla da CT+TT genotiplerine sahip hastaların genel sağ kalım süreleri arasında da önemli bir fark tespit edilmemiştir (Log rank=0.12, p=0.73). *VEGF-A* -460C>T polimorfizmi genotiplerine ait genel sağ kalım eğrileri Şekil 3.29’da verilmiştir.



Şekil 3.29: Çalışma grubumuzdaki kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *VEGF-A* -460C>T polimorfizmine ait genotiplere göre dağılımları

Tablo 3.59: *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkileri

	Genel Sağ Kalım (Ay)	Log rank	p
<i>VEGF-A</i> +405G>C			
GG	42.73 ± 8.14 (26.77-58.69)		
GC	41.15 ± 12.31 (17.01-65.28)	0.49	0.78
CC	34.34 ± 7.78 (19.09-49.59)		
GG+GC/CC	49.06 ± 8.94 (31.53-66.58)	0.05	0.82
GC+CC/GG	40.74 ± 9.32 (22.48-59.01)	0.49	0.48
<i>VEGF-A</i> -460C>T			
CC	38.36 ± 4.81 (28.93-47.78)		
CT	46.95 ± 8.48 (30.34-63.56)	0.90	0.64
TT	49.00 ± 0.00 (49.00-49.00)		
CC+CT/TT	50.95 ± 6.31 (38.59-63.32)	0.59	0.44
CT+TT/CC	46.33 ± 7.86 (30.93-61.73)	0.12	0.73

Değerler, ortalama ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

Hasta sayımızın fazla olmamasından dolayı sağlıklı analizler yapamayacağımızdan tedavi rejimlerine göre alt gruplar oluşturamadık. Ancak, her ne kadar toplam örnek sayısı az olsa da, hastalarımızın çoğunluğu anti-VEGF ajan olan bevasizumab kullandığından dolayı bevasizumab kullanan (BEV⁺) ve kullanmayan (BEV⁻) olmak üzere yeni bir alt grup oluşturduk ve bu gruplar arasında hastaların sağ kalım süreleri ile *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerinin ilişkilerini inceledik.

İlk olarak KRK hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalım sürelerini BEV⁺ ve BEV⁻ gruplar arasında inceledik. Buna göre sağ kalım süreleri BEV⁺ ve BEV⁻ gruplar arasında önemli bir fark göstermedi (progresyonsuz sağ kalım için Log rank=0.221 p=0.638; genel sağ kalım için Log rank=1.288 p=0.256, veriler tabloda verilmedi). Bunun başlıca sebebinin BEV⁻ grubunda olan hastaların çoğunluğunun metastatik olmayan hastalar olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz.

VEGF-A polimorfizmlerine ait genotiplerin bevasizumab reçete edilmiş ve reçete edilmemiş KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişkileri **Tablo 3.60**'da özetlenmiştir. BEV⁺ hastalarda *VEGF-A* +405G>C polimorfizmi GG genotipine sahip bireylerin diğer genotiplere kıyasla daha uzun progresyonsuz sağ kalım sürelerine

sahip olduğunu tespit ettik (Log rank=6.92, p=**0.03**). Benzer ilişki GG genotipi taşıyanlara kıyasla varyant allel içeren GC+CC genotiplerine sahip hastalar ile kıyaslandığında da devam etmektedir (Log rank=4.61, p=**0.03**). Ancak BEV⁻ grubunu ayrı olarak incelediğimizde +405G>C polimorfizmi genotipleri ile hastaların progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında kodominant, resesif ve dominant genetik modelde istatistiksel bir ilişki tespit edilmemiştir. Bu sebeple az sayıda örnekle de olsa bevasizumab kullanımının VEGF-A +405GG genotipine sahip hastalarda daha uzun progresyonsuz sağ kalımla ile sonuçlandığını tespit ettik.

Tablo 3.60: VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin bevasizumab reçete edilmiş ve reçete edilmemiş kolorektal kanser hastalarının progresyonsuz sağ kalım sürelerine olan etkileri

	BEV ⁺	Log rank	p	BEV ⁻	Log rank	p
VEGF-A +405G>C						
GG	43.50 ± 0.35(42.81-44.19)			11.86 ± 1.31 (9.30-14.42)		
GC	10.69 ± 1.90(6.96-14.42)	6.92	0.03	18.00 ± 3.31(11.51-24.49)	0.34	0.84
CC	06.50 ± 1.50 (3.56-9.44)			18.00 ± 0.00 (18.00-18.00)		
GG+GC/CC	22.36 ± 6.27 (10.07-34.6)	3.64	0.06	18.19 ± 2.53 (13.23-23.16)	0.33	0.57
GC+CC/GG	09.74 ± 1.59 (6.63-12.85)	4.61	0.03	18.85 ± 2.40 (14.15-23.55)	0.11	0.74
VEGF-A -460C>T						
CC	26.75 ± 7.61 (11.82-41.67)			14.14 ± 1.38 (11.44-16.84)		
CT	24.62 ± 6.68 (11.52-37.71)	0.71	0.40	19.79 ± 3.46 (13.01-26.57)	0.49	0.78
TT	-			24.00 ± 0.00 (24.00-24.00)		
CC+CT/TT	-	-	-	20.48 ± 2.53 (15.52-25.44)	0.30	0.58
CT+TT/CC	-	-	-	19.86 ± 3.10 (13.78 -25.95)	0.07	0.78

Değerler, ortalama (Ay) ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

VEGF-A -460C>T polimorfizmine ait farklı genotiplere sahip hastaların progresyonsuz kalım süreleri ise BEV⁺ ve BEV⁻ gruplarda istatistiksel olarak fark göstermemiştir (**Tablo 3.60**). Benzer şekilde bevasizumab kullanan ve kullanmayan gruplardaki hastaların genel sağ kalım süreleri hem +405G>C hem de -460C>T polimorfizmlerine ait genotiplere göre istatistiksel anlamlı bir fark göstermemiştir (**Tablo 3.61**).

Tablo 3.61: *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerine ait genotiplerin bevasizumab reçete edilmiş ve reçete edilmemiş kolorektal kanser hastalarının genel sağ kalım sürelerine olan etkileri

	BEV ⁺	Log rank	p	BEV ⁻	Log rank	p
<i>VEGF-A</i> +405G>C						
GG	57.00 ± 0.00(57.00-57.00)			41.71 ± 8.58 (24.91-58.52)		
GC	15.50 ± 2.25(11.08-19.92)	5.37	0.07	59.17 ± 16.41 (27.00-91.34)	0.08	0.96
CC	10.50 ± 6.50 (0.00-23.24)			45.00 ± 0.00 (45.00-45.00)		
GG+GC/CC	32.06 ± 8.83 (14.75-49.38)	2.61	0.11	61.95 ± 12.31 (37.82-86.07)	0.02	0.88
GC+CC/GG	14.50 ± 2.12 (10.35-18.65)	3.79	0.05	55.00 ± 12.84 (29.83-80.17)	0.08	0.78
<i>VEGF-A</i> -460C>T						
CC	39.19 ± 7.96 (23.58-54.79)			37.11 ± 6.07 (25.22-49.00)		
CT	34.48 ± 8.27 (18.27-50.69)	0.74	0.39	56.60 ± 10.56 (35.89-77.31)	0.56	0.75
TT	-			49.00 ± 0.00 (49.00-49.00)		
CC+CT/TT	-	-	-	55.98 ± 7.59 (41.10 -70.86)	0.51	0.48
CT+TT/CC	-	-	-	53.55 ± 10.38 (33.20 -73.90)	0.19	0.66

Değerler, ortalama (Ay) ± standart hata tahmini (%95 Güven Aralığı) şeklinde temsil edildi.

3.6.Tartışma

Kolorektal kanser yapısı itibarı ile heterojen bir hastalıktır. Primer tümörün kolonda kaynaklandığı anatomik bölgeye göre sol veya sağ taraflı kolon kanseri olarak sınıflandırılır (Huang ve ark., 2019; Su ve ark., 2022). Sağ ve sol kolon kanserleri arasındaki farklılıkların birincil sebebi farklı embriyonik kökenlere sahip olmalarıdır. Sol kolon, embriyonik hindguttan; sağ kolon ise embriyonik orta bağırsaktan kökenlenmektedir (Lee ve ark., 2017b). Kökenlendiği bölgelerdeki bu farklılıklar, sağ ve sol kolon kanserlerinin patogenezi, moleküler özellikleri, insidansları ve prognozları gibi farklılıklara neden olarak her iki kanser türünün tedavisinde farklı stratejilerin izlenmesini gerektirir (Lee ve ark., 2017b; Huang ve ark., 2019).

Farklı çalışma grupları tarafından rapor edilen çalışmalarda erkeklerde sol kolon kanserinin, kadınlarda ise sağ kolon kanserinin daha yaygın olduğu bildirilmiştir (Benedix ve ark., 2010; Turner ve ark., 2019; Plastiras ve ark., 2019; Jung ve ark., 2017; Tokunaga ve ark., 2019). Türk popülasyonu ile yapılan bir çalışmada ise sol veya sağ kolon kanserine yakalanma riskinin cinsiyete göre belirgin bir fark göstermediği rapor edilmiştir (Keskin ve ark., 2019). Çalışmamızda ise sağ ve sol kolon kanseri olan hasta yüzdeleri arasında büyük bir fark bulunmadığından kıyaslama yeterince verimli olmamıştır. Her ne kadar erkeklerin sağ; kadınların ise sol kolondaki frekansı yüksek olsa da çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit etmedik. Sonuçlarımız ile benzer şekilde sağ ve sol kolon kanseri olan hasta sayıları arasında eşitsizlik olan 2019 yılında yayınlanan bir çalışmada sağ ve sol kolonda cinsiyet dağılımları farkı istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Huang ve ark., 2019).

Literatürde var olan sağ kolon kanseri ve sol kolon kanseri hastalarının hayatta kalma analizleri genellikle sol kolon kanserlerinin daha uzun olduğunu bildirmektedir. Jung ve arkadaşları çalışmalarında sağ ve sol kolon kanserdeki sağ kalım analizlerini tümör evresini baz alarak yapmışlar ve evre I ve II’de primer tümör lokasyonu ile sağ kalım arasında fark bulmazken; III. evrede hastalısız ve genel sağ kalımın sağ kolon kanserinde sol kolon kanserine göre daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir (Jung ve ark., 2017). Plastiras ve arkadaşları benzer şekilde kanser evrelerini baz alarak gerçekleştirdikleri analizlerinde evre II ve III’te genel ve hastalısız sağ kalımı sol kolon kanserli hastalarda daha uzun tespit etmişlerdir. Araştırmacılar sonuçları evreden

bağımsız olarak genel anlamda incelediklerinde ise hem hastalıksız sağ kalımın hem de genel sağ kalımın sol kolonda daha uzun olduğunu rapor etmişlerdir (Plastiras ve ark., 2019). Benedix ve arkadaşları da sağ kolon kanserini kötü sağ kalım ile ilişkili bulmuşlardır (Benedix ve ark., 2010). Literatürdeki sonuçlar çoğunlukla yukarıdaki örneklerde oldu gibi sağ kolon kanserli hastaların daha kısa hayatta kalma sürelerine sahip olduklarına işaret etmektedir (Warschkow ve ark., 2016; Weiss ve ark., 2011).

Çalışmamızda araştırmamıza dahil olan hastaların progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalım sürelerinin ortalamaları ile sağ ve sol kanseri olma durumu arasında anlamlı bir fark saptamadık. Literatürde sonuçlarımız ile benzerlik gösteren 2 çalışmaya rastladık. İlk çalışmada primer tümör lokasyonları kolon, rektal ve rekto-sigmoid olarak ele alınmış ve hastalıksız sağ kalım sürelerinin tümör lokasyonu ile ilişkili bulmadıkları ifade edilmiştir (Yousef ve ark., 2018). Diğer çalışma ise Türk popülasyonu ile yapılmış bir klinik çalışma olup, genel sağ kalımın sağ kolon ve sol kolon grupları arasında farklılık göstermediği rapor edilmiştir (Keskin ve ark., 2019). Keskin ve arkadaşlarının çalışması ile sonuçlarımızın benzer olmasının sebebi hasta popülasyonun diğer çalışmalar kadar geniş olmaması ya da etnik bir takım farklılıklara dayanıyor olabilir. Ya da Venook ve arkadaşlarının çalışmalarında olduğu (Venook ve ark., 2016) gibi progresyonsuz ve genel sağ kalım süreleri sağ ve sol kolonda başka bir takım genetik değişkenlerin etkisiyle farklılık gösteriyor olabilir düşüncesindeyiz.

Togunaga ve arkadaşları 994 sağ kolon ve 1080 sol kolon hastası ile yaptıkları çalışmalarında KRAS pozitif hastaların yüzdesinin sağ kolonda sol kolona göre daha yüksek bulduklarını bildirmişlerdir (Togunaga ve ark., 2019). Turner ve arkadaşları KRAS mutasyonu taşıyan hastaların frekansının sağ kolon kanseri hastalarda daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (Turner ve ark., 2019). Huang ve arkadaşları ise KRAS mutasyon varlığının gruplar arasında anlamlı derecede bir fark ortaya koymadığını bildirmişlerdir (Huang ve ark., 2019). Breivik ve arkadaşları 1997’de yaptıkları çalışmalarında ise KRAS mutasyonların frekansının sol kolon kanserlerinde sağ kolon kanserlerine göre (yaş ve cinsiyetin de etkisinde kalarak) daha yüksek olduğunu rapor etmiştir (Breivik ve ark., 1997). Çalışmamızda ise KRAS pozitif hastaların yüzdesi sağ kolonda daha yüksek tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların alkol kullanım durumunu sağ ve sol kolon kanseri hastaları arasında kıyaslandığımızda, alkol

kullanımının sağ kolon kanseri riski ile ilişkili olduğunu tespit ettik ($p=0.003$). Benedix ve arkadaşlarına ait çalışmada ise alkol kullanımının sol kolon kanserinde daha sık gözlemlendiği rapor edilmiştir (Benedix ve ark., 2010).

KRK kaynaklı ölüm durumları ile tümör lokalizasyonunu ele alan çalışmalarda sağ kolon kanserlerinin ölüm oranlarının sol kolon kanserlerine göre yüksek olduğu bir çok çalışma tarafından ortaya atılmıştır (Benedix ve ark., 2010; Petrelli ve ark., 2017; Meguid ve ark., 2008). Çalışmamızda ise ölen hastaların sağ ve sol kolondaki dağılımları istatistiksel olarak farklı değildi.

5-FU kaynaklı yan etkilerin primer tümör yeri ile ilişkisini araştıran sınırlı sayıda çalışmaya rastladık. Varma ve arkadaşları çalışmalarında yan etkileri seviye olarak vermeden tek tek kolon ve rektumdaki dağılımlarını incelemişlerdir. Çalışmadaki hasta popülasyonunda tüm yan etkiler ile primer tümörün yeri arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (Varma ve ark., 2019). Balibrea ve arkadaşlarına ait çalışmada hemotolojik ve hematolojik olmayan yan etkilerin kolon ve rektumdaki dağılımları karşılaştırılmış ancak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Martinez-Balibrea ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada ise yan etkiler seviye 3+4 ve ≤ 2 olarak ikiye ayrılmış ve kolon ve rektumdaki dağılımları incelenmiştir. Çalışma sonucunda ise primer tümör yeri ile yan etki grupları arasında anlamlı bir ilişki rapor edilmemiştir (Nahid ve ark., 2018). Lee ve arkadaşlarına ait çalışmada ise 5-FU kaynaklı toksisite gösteren hastalar seviye ≥ 3 olanlar ve olmayanlar olarak ele alınıp sağ ve sol kolondaki dağılımları incelenmiştir. Çalışmaları sonucunda araştırmacılar sağ kolon kanseri olanlarda seviye ≥ 3 olan hasta frekansını sol kolon kanserine göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Ancak seviye ≥ 3 olmayan hasta gruplarında ise sağ ve sol kolon kanseri hasta frekanslarını arasında fazla bir fark tespit etmemişlerdir (Lee ve ark., 2014b). Araştırmamızda primer tümör lokalizasyonu ile 5-FU kaynaklı yan etkiler arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Çalışmamızda seviye ≥ 3 olan hasta sayısının az olduğunu göz önüne alındığında sonuçlarımız literatür ile kısmen benzerlik göstermektedir.

DPD enzimi, tedavi amacı ile alınan 5-FU'nun yaklaşık %80'nin katabolizmasından sorumludur ve *DPYD* genindeki varyasyonlar kanda 5-FU artışına sebep olarak 5-FU kaynaklı toksisitelere yol açabilir (Heggie ve ark., 1987; Gentile ve ark., 2016).

Polimorfik değişimler sebebi ile DPD'nin enzimatik aktivitesinin azalması ilacın yarılanma ömründe ve doza bağlı şiddetli toksisite riskinde artışa yol açacağından (Miura ve ark., 2010), DPDY genindeki varyasyonların klinik anlamlarının belirlenmesi tedavide başarı elde edilmesinde oldukça önemlidir. Bu sebeple çalışmamızda Türk toplumunda kolorektal kanserli hastalarda *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* polimorfizmlerinin 5-FU ile ilişkili toksisiteler üzerindeki etkilerini araştırdık. 5-FU kaynaklı toksisiteleri seviye 0-2 ve seviye 3-4 olarak iki gruba ayırdık ve bu gruplar arasında analizler gerçekleştirdik. Ayrıca *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* polimorfizmlerinin primer tümör lokasyonu, metastaz ve sağ kalım ile ilişkisini de inceledik.

DPYD 85T>C genotiplerinin 5-FU kaynaklı toksisiteler ile ilişkisini inceleyen birçok çalışma literatürde mevcuttur. Ancak bu çalışmaların sonuçları heterojenlik göstermektedir. Her ne kadar *DPYD* varyantlarının klinikteki etkilerini özetleyen ve araştırmacılara yol göstermek için yayınlanan CPIC ve DPWG kılavuzlarında *DPYD* 85T>C polimorfizminin DPD aktivitesini belirgin bir şekilde etkilemediği belirtilse de (Amstutz ve ark., 2018; Lunenburg ve ark., 2020) ve literatürde benzer şekilde *DPYD* 85T>C genotiplerinin DPD klinik cevabı ile bir korelasyonu bulunmadığını rapor eden çalışmalar bulunsada (Maharjan ve ark., 2019; Boisdron-Celle ve ark., 2007; Deenen ve ark., 2011; Pellicer ve ark., 2017), 85T>C polimorfizminin 5-FU kaynaklı toksisitelerde rolü olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur. Bunlardan en çarpıcı olanı Gentile ve arkadaşlarına ait çalışmadır. Araştırmacılar öncelikle kemoterapi sonrası kandaki 5-FU degradasyonunu ölçmek için 5FUDR miktarları ölçmüşler ve elde ettikleri değerleri *DPYD* polimorfik bölgeleri ile kıyaslamışlardır. Analizleri sonucunda *DPYD* 85T>C'nin de içinde bulunduğu bazı genotiplerin (496A>G ve 1905+1G>A) azalmış 5-FUDR ile ilişkili olduğunu; ancak etkinin DPD'de fonksiyon kaybına sebep olan 1905+1G>A polimorfizmindeki kadar ileri derecede olmadığını rapor etmişlerdir (Gentile ve ark., 2016). DPD'de fonksiyon kaybına sebep olan *DPYD* polimorfik bölgelerin analiz sonucu olmadan yalnızca 85T>C üzerinden analizini yürütmüş olan Nie ve arkadaşları çalışmalarında 85T>C polimorfizmini miyelosupresyon, karaciğer hasarı, gastrointestinal reaksiyonlar ve mukozal hasar ile ilişkili bulmuşlardır (Nie ve ark., 2019). Benzer şekilde Varma ve arkadaşları 85T>C varyant allelinin dominant modelde el-ayak sendromu, diyare ve trombositopenia ile istatistiksel olarak ilişkili olarak rapor etmişlerdir (Varma ve ark., 2019). Jeorger ve arkadaşları DPD aktivitesinde

azalmaya neden olduğu bilinen (2846A>T ve 1905+1G>A) polimorfizmlerinin de aralarında bulunduğu polimorfik bölgelerin yan etkiler ile olan ilişkisini analiz etmişlerdir ve *DPYD* 85T>C'nin metastatik KRK'da diyare ile ilişkili olmadığını ancak metastatik gastroözofageal kanserde istatistiksel olarak ilişkili olduğunu saptamışlardır. Ancak araştırmacılar bu ilişkinin fonksiyon kaybına sebep olan *DPYD* 1905+1G>A polimorfizmi kadar belirgin olmadığını rapor etmişlerdir (Joerger ve ark., 2015). Araştırmamızda ise *DPYD* 85T>C polimorfizmi ile 5-FU kaynaklı derecelendirilmiş toksisiteler arasında dikkate değer bir ilişki tespit etmedik. Çalışmamızda DPD enziminin fonksiyonunu sınırlayan varyantlar ya hiç görülmediği ya da frekansı çok düşük görüldüğü için sonuçlarımızın *DPYD* 85T>C polimorfizminin ilaç cevabı üzerindeki genel etkisinin gözlenmesi açısından önemli olduğunu düşünüyoruz.

2020 yılında yayınlanan DPWG kılavuzunda *DPYD* 496A>G bölgesine ait varyantların DPD enzim aktivitesi ve ciddi floropirimidin kaynaklı toksisiteler ile ilişkisine dair kesin kanıda bulunabilecek derecede yeterli kanıt olmadığı sonucuna varılmıştır (Lunenburg ve ark., 2020). Literatürdeki veriler ise bu sonuca varılmasına yol açacak şekilde birbiri ile çelişmektedir. 5-FU tedavisi gören KRK hastaları ile yapılan bazı çalışmalar floropirimidin kaynaklı diyare, el-ayak sendromu ve nötropeni gibi ciddi yan etkiler ile *DPYD* 496A>G varyasyonunun ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (Gross ve ark., 2008; Deenen ve ark., 2011; Del Re ve ark., 2019; Falvella ve ark., 2015). Falvella ve arkadaşları KRK hastalarında 5-FU tedavisi sonrası gözlenen seviye 3-4 yan etkilerin *DPYD* 496A>G polimorfizmi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Falvella ve ark., 2015). Deenen ve arkadaşları *DPYD* 496AG+GG genotiplerinin KRK hastalarında kapesitabin ile indüklenen seviye 0-2 diyare ve seviye 2-3 el-ayak sendromu ile ilişkili olduğunu, ancak hematolojik toksisitelerle ilişkili olmadığını rapor etmişlerdir (Deenen ve ark., 2011). Diğer bir çalışmada 496A>G polimorfizminin gastroözofageal ve meme kanserinde derece 3-4 yan etkilerle ilişkili olduğu, ancak kolorektal kanserlerde söz konusu ilişkinin tespit edilmediği bildirilmiştir (Gross ve ark., 2008). Çalışmalardan elde edilen farklı sonuçlar uygulanan farklı tedavi rejimleri ve bu tedavi rejimlerini etkileyebilecek farklı genetik arka planlar, gözlenen advers olayların türü ve kanser türü gibi birçok değişkene bağlı olarak ortaya çıkıyor gibi görünmektedir. Daha önce bahsi geçtiği üzere Gentile ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada DPD aktivitesini fonksiyon kaybına sebep olan varyant kadar olmasa da 496A>G'nin de kandaki 5-FUDR

seviyelerini azalttığı rapor edilmiştir (Gentile ve ark., 2016). Bu araştırmacılar farklı olarak *DPYD* 496A>G genotipleri ile 5-FU kaynaklı toksisiteler arasında anlamlı bir ilişki saptamayan çalışmalar da mevcuttur (Pellicer ve ark., 2017; Loganayagam ve ark., 2013).

Araştırmamızın sonuçları ise *DPYD* 496A>G polimorfizminin 5-FU yan etkiler ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir. Çalışma grubumuzdaki hasta sayımız yeterince fazla olmadığı için *DPYD* 496A>G genotipleri ile sınıflandırılan yan etkiler arasında güvenilir veri sağlayacak bir analiz yapamadık. Ancak diğer çalışmalardan farklı olarak *DPYD* 496A>G polimorfizminin şiddetli toksisitelerden ziyade derece 0-2 toksisitelerle ilişkili olabileceğini bulduk. *DPYD* 496A>G polimorfizminin hafif ancak şiddetli olmayan yan etkilerle ilişkili bulunduğundan, *DPYD* 496A>G polimorfizminin 5-FU ile ilişkili ciddi advers olaylara karşı koruyucu olabileceğini düşünüyoruz.

DPYD 496A>G polimorfizmine benzer şekilde, *DPWG* kılavuzuna göre *DPYD* 1601G>A polimorfizminin DPD enzim aktivitesi ve ilaç cevabı üzerine kesin etkileri hakkında yeterli araştırma olmadığı rapor edilmiştir (Lunenborg ve ark., 2020). Nitekim literatürde *DPYD* 1601G>A genotiplerinin 5-FU kaynaklı toksisiteler ile ilişkilerini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bilgimiz dahilinde kolorektal adenokarsinomda yalnızca Loganayagam ve arkadaşları 1601G>A varyasyonu ile floropirimidin kaynaklı toksisite arasında pozitif korelasyon rapor etmişlerdir (Loganayagam ve ark., 2013). Literatürdeki diğer çalışmalar ise 1601G>A varyasyonu ile floropirimidin toksisitesi arasında ciddi bir ilişki rapor etmemişlerdir (Deneen ve ark., 2011; Del Re ve ark., 2019; Meulendijks ve ark., 2015). Araştırmamızda 1601G>A genotipleri ile sınıflandırılan yan etkiler arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ancak *DPYD* 1601G>A polimorfizminin tüm varyant alellerini seviye 0-2 grubunda tespit ettik ve seviye 3-4 grubunda ise varyant allele rastlamadık. Buna göre *DPYD* 1601G>A varyant alleli 5-FU kaynaklı ciddi yan etkilerden koruyor olabilir. Ancak daha net sonuçlar elde etmek için toplumumuzda daha fazla örnek içeren ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

DPYD 1905+1G>A polimorfizmi (*2A), ekzon 14'ün okunması sırasında 165 baz çiftlik alanının silinerek çıkarılmasına ve inaktif bir enzimin oluşmasına neden olur (Vreken ve ark., 1996; Van Kuilenburg ve ark., 1997; Offer ve ark., 2013). Birçok çalışmada *DPYD*

*2A varyant alleleine sahip bireylerde 5-FU kullanımına bağılı ciddi yan etkiler kaydedilmiştir (Terrazzino ve ark., 2013; Deenen ve ark., 2011; Loganayagam ve ark., 2013; Joerger ve ark., 2015). Çalışmamızda ise varyant *2A alleli taşıyan az sayıda hastaya rastladığımızdan *DPYD* *2A varyant alleli ile 5-FU kaynaklı toksisiteler arasında anlamlı bir ilişki kuramadık. Ancak tüm varyant allelleri seviye 3-4 grubunda saptadığımızdan literatürle benzer şekilde *DPYD* *2A varyant allelinin 5-FU ile ilişkili ciddi yan etkilerle ilişkili olabileceğini gösterdik.

MTHFR, TYMS ile birlikte dUMP'nin dTMP'a dönüştürülmesinde dolayısı ile DNA sentezinin inhibisyonunda görev alan CH₂THF'nin hücre içi konsantrasyonunun sağlanmasından sorumludur (Lurje ve ark., 2008; Rosenblatt, 2001). DNA sentezi ve nükleotid dengesinin korunması için dTMP gerekli olduğundan MTHFR, DNA sentezi ve onarımında önemli bir rol oynar (Goyette ve ark., 1994). MTHFR enziminin kilit noktadaki işlevinden dolayı, sentezinden sorumlu DNA bölgesindeki varyasyonların DNA sentez sürecini etkilemesi kaçınılmazdır. *MTHFR* 677C>T ve 1298A>C polimorfizmleri enzim aktivitesi ile bağılantılı olduğundan 5-FU kaynaklı toksisiteler ile ilişkili olması beklenir.

Literatürdeki birçok çalışma *MTHFR* 677C>T polimorfizminin 5-FU kaynaklı farklı yan etkiler ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir. Lee ve arkadaşları 292 KRK hastası ile yaptıkları çalışmalarında şiddetli nötropenisi olan hastalarda *MTHFR* 677TT genotip frekansının yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (Lee ve ark., 2013). Glimelius ve arkadaşları *MTHFR* 677C>T polimorfizmini azalan seviye 3-4 toksisite riski ile ilişkili bulmuştur (Glimelius ve ark., 2011). Derwinger ve arkadaşları ise CT+TT genotipine sahip KRK hastalarının 5-FU kullanımından doğabilecek yan etkilerle karşı karşıya gelme riskinin yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (Derwinger ve ark., 2009). Şimdiye kadar *MTHFR* 677C>T varyantları ile 5-FU kaynaklı toksisiteler arasında yapılmış olan yukarıdaki çalışmaların tümünde DPD aktivitesini ortadan kaldıracak ya da azaltacak gen bölgeleri çalışmalara dahil edilmemiştir. Dolayısı ile gözlenen bu yan etkilerin tek sorumlusunun *MTHFR* 677C>T varyasyonu olduğu konusunda soru işaretleri ortaya koymaktadır. Ancak Nahid ve arkadaşlarına ait çalışmada DPD enziminde fonksiyon kaybına sebep olan *DPYD* 1905+1G>A polimorfizmi ile *MTHFR* 677C>T polimorfizmi eş zamanlı incelenmiştir. Her iki polimorfizme ait varyantlar seviye 3-4 nötropeni ve

diyare ile ilişkilendirilmiştir. Çarpıcı olarak bu çalışmada 1905+1A>G varyantları mukozitis ile ilişkili bulunmaz iken *MTHFR* 677T varyantı ile ilişkili bulunmuştur (Nahid ve ark., 2018). Jeorger ve arkadaşları çalışmalarında DPD fonksiyon azalmasına ve ortadan kalkmasına yol açan polimorfik bölgeler (2846A>T, 1905+1G>A) ile *MTHFR* 677C>T polimorfizmini toksisite göstermeyen ve seviye 1-3 toksisite gösteren KRK hastalarında spesifik olarak incelemişler *DPYD* varyantlarından farklı olarak ve 677CT bireylerin frekansının bulantı gözlenen hastalarda anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır (Jeorger ve ark., 2015). Amirfallah ve arkadaşları tarafından Türk popülasyonunda yapılan çalışmada ise DPD fonksiyon kaybı ya da azalmasına sebep olan polimorfik bölgelerin frekansı yüksek çıkmadığından toksisite değerlendirilmeleri yapılmamış olup 677T allelini taşıyan hastaları genel toksisite ile ilişkili bulmuşlar (Amirfallah ve ark., 2018). *MTHFR* 677C>T varyantı ile 5-FU kaynaklı toksisite arasında önemli bir ilişki saptamayan az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamıza benzer şekilde Mazzuca ve arkadaşları 433 KRK hastasının da bulunduğu 1010 hastayı dahil ettikleri çalışmalarında hastalardaki 5-FUDR miktarları ile sahip oldukları genotipleri karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar 5-FUDR miktarları ile *MTHFR* 677C>T varyasyonu arasında belirgin bir ilişki bulmamışlardır (Mazzuca ve ark., 2016). Analizlerimiz sonucunda Mazzuca ve arkadaşlarının sonuçlarını destekler nitelikte *MTHFR* 677C>T varyasyonu ile 5-FU kaynaklı toksisiteler arasında dikkate değer bir ilişki tespit edilmemiştir.

MTHFR A1298C varyasyonu ise bazı çalışmalarda 5-FU kaynaklı yan etkiler için bağımsız bir tespit faktörü olarak gösterilmiştir ve C alleli taşıyan hastalarda genel veya spesifik yan etkiler ile ilişkili olarak bulunmuştur (Amirfallah ve ark., 2018; Kristensen ve ark., 2010; Capitain ve ark., 2008; Loganayagam ve ark., 2013). Bu çalışmalara zıt olarak *MTHFR* 1298A>C polimorfizmleri ile 5-FU kaynaklı yan etkiler arasında herhangi bir ilişki saptamayan çalışmalar da mevcuttur. Daha önce bahsi geçen Mazzuca ve arkadaşlarına ait çalışmada, hastalardaki 5-FUDR miktarları ile *MTHFR* 1298A>C genotipleri arasında istatistiksel anlam sınırına yakın ($p=0.072$) bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Mazzuca ve ark., 2016). Glimelius ve arkadaşları *MTHFR* 1298A>C polimorfizmi genotipleri ile seviye 3-4 yan etkiler arasında anlamlı bir ilişki bulmadıklarını bildirmişlerdir (Glimelius ve ark., 2011). Benzer şekilde analizlerimiz

sonucunda da *MTHFR* 1298A>C polimorfizmi 5-FU kaynaklı toksisiteler ile ilişkili bulunmamıştır.

De novo pirimidin sentezinden sorumlu olan *TYMS* enzimini kodlayan gende yer alan 6 bp'lik delesyon kolorektal tümör dokularında *TYMS* mRNA ekspresyonunun azalmasına sebep olmaktadır (Lenz ve ark., 2002). Ayrıca kanserli dokulardaki düşük *TYMS* miktarının floropirimidin etkinliğini arttırdığı da bilinmektedir (Leichman ve ark., 1997). 5-FU'nun aktif metabolitinin birincil hedefi olması nedeniyle *TYMS* genindeki enzim aktivitesini etkileyen bu varyasyonun 5-FU cevabında etkisinin olması gerektiği düşünülse de bu polimorfizme ait bulgular birbiri ile çelişir durumdadır. *TYMS* 1494 6 bp varyantı ile 5-FU kaynaklı yan etkiler arasında ciddi bir ilişki rapor eden çok az çalışmaya rastladık. Logayanam ve arkadaşları *TYMS* 1494ins/del polimorfizminin hem floropirimidin ile ilişkili toksisite ile, hem de klinik yanıtla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (Logayanam ve ark., 2013). Rosmarin ve arkadaşları *TYMS* 1494ins/del polimorfizminin 5-FU kaynaklı genel toksisite ile ilişkili olduğunu rapor etmişleridir (Rosmarin ve ark., 2014). Bu çalışmaların aksine literatürdeki bir çok çalışmada, gerek spesifik toksisiteler ile gerekse genel toksisiteler açısından *TYMS* 1494ins/del polimorfizminin 5-FU kaynaklı yan etkiler ile ilişkili olmadığı rapor edilmiştir (Amirfallah ve ark., 2018; Gusella ve ark., 2009; Kristensen ve ark., 2010; Lecomte ve ark. 2004; Nie ve ark., 2019). Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki çoğunluğa uygun olarak *TYMS* 1494ins/del polimorfizmi ile 5-FU kaynaklı toksisite arasında önemli bir ilişki olmadığı yönündedir.

Araştırmamızda genotip analizini yaptığımız *DPYD* polimorfizmlerinin sağ ve sol kolondaki genotip dağılımları ile ilgi literatürde çok az çalışmaya rastladık. Li ve arkadaşları 117 kolorektal kanser hastasının *9A ve *2A genotiplerinin dağılımlarının primer tümörün lokasyonuna bağlı olarak değişmediğini rapor etmişlerdir (Li ve ark., 2016). Li ve arkadaşlarının çalışmalarına benzer şekilde çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre de incelediğimiz *DPYD* polimorfizmleri ile primer tümörün yeri arasında doğrudan bir ilişki saptamadık. Ancak *DPYD* 496AG+GG ve AA genotiplerinin temel karşılaştırılması sonucunda dikkate değer bir ilişki tespit ettik ($p=0.09$) ve cinsiyete göre düzenlenmiş lojistik regresyon modeli oluşturduk. Buna göre 496AG+GG genotipi sol kolon kanseri riski ile ilişkili bulundu (Düzenlenmiş OR:4.777 (%95 CI:1.007-22.661),

p=0.05). Ancak bu sonucun, daha geniş popülasyonlarda valide edilmesi gerektiği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda yer alan *MTHFR* 677C>T ve 1298A>C polimorfik bölgelerine ait genotiplerin sağ ve sol kolon kanseri gelişimine olan etkisi üzerine yapılmış var olan çalışmalar ile çelişen sonuçlar rapor etmişlerdir. Iacopetta ve arkadaşları 275 sağ kolon ve 575 sol kolon kanseri hastalarında *MTHFR* 677C>T genotip dağılımını incelemişler. Çalışmalarında homozigot ve heterozigot formda allel taşıyan hastaların (CT+TT) frekansını sağ kolon kanseri hastalarında daha yüksek tespit etmişler ve T allel taşıma durumunun sağ kolon kanseri gelişimi riskini artırdığını rapor etmişlerdir (Iacopetta ve ark., 2009). Farklı iki çalışmada ise *MTHFR* 677C>T ve 1298A>C polimorfizmleri genotiplerinin kolon ve rektumdaki dağılımlarının farklı olmadığı rapor edilmiştir (Yeh ve ark., 2017; Zhu ve ark., 2013). Jang ve arkadaşları *MTHFR* 677C>T ve 1298A>C polimorfizmlerine ait genotiplerin kodominant, dominant ve resesif modeldeki dağılımlarını kolon ve rektumda incelemişler ve diğer iki grupta olduğu gibi anlamlı bir fark saptamamışlardır (Jang ve ark., 2014). Çalışmamızda da *MTHFR* 677C>T ve 1298A>C polimorfizmleri ile primer tümör yeri arasında belirgin bir ilişki tespit etmedik.

Çalışmamızda KRK tedavisinde kullanılan kemoterpötik ajan olan 5-FU için birincil hedef olduğundan dolayı *TYMS* 1494del6 gen polimorfizmi de araştırılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla, *TYMS* 1494del6 genotiplerinin primer kolon yerine göre analiz edildiği çalışmalar literatürde yok denecek kadar azdır. Jang ve ark., 372 kolon kanseri vakası ile yaptıkları çalışmalarında *TYMS* 1494del6 polimorfizmi genotiplerini kodominat, dominant ve resesif modellerde primer kolon yeri ile ilişkili bulmamışlardır (Jang ve ark., 2014). Analiz sonuçlarımız Jang ve arkadaşları çalışması ile benzerlik göstermekte olup *TYMS* 1494del6 polimorfizmi genotipleri ile primer kolonun yeri arasında anlamlı bir ilişki tespit etmedik.

DPYD, *MTHFR* ve *TYMS* polimorfizmleri temelde 5-FU metabolizması ile ilişkili olmalarına rağmen, bazı çalışmalarda bu genlerdeki polimorfik bölgelerinin sağ kalım süreçlerinde de etkili olduğu da bildirilmiştir (Deenen ve ark., 2011; Yousef ve ark., 2018; Zhao ve ark., 2014). Bu sebeple çalışmamızda aynı zamanda *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* polimorfizmlerinin KRK hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalım süreleri

üzerindeki etkilerini de inceledik. Analizlerimize göre yalnızca *DPYD* 85T>C polimorfizmi progresyonsuz sağ kalım ile yakından; genel sağ kalımla ise kısmen ilişkili bulunmuştur. *DPYD* 85TC+CC genotipi taşıyan hastaların daha uzun progresyonsuz sağ kalım sürelerine sahip olduğunu tespit ettik (Log rank $p=0.01$). Literatürde yalnızca Deenen ve arkadaşları *DPYD* 85T>C polimorfizminin KRK hastalarının sağ kalım sürelerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar sonuçlarımızdan farklı olarak *DPYD* 85T>C polimorfizmini KRK hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir (Deenen ve ark., 2011).

Özetlemek gerekirse, *DPYD* 496A>G polimorfizmi 5-FU kaynaklı seviye 0-2 yan etkiler ile ilişkili bulunmuştur. *DPYD* 496A>G fonksiyonel bir varyasyon olarak kabul edilse de (Lunenburg ve ark., 2020), literatürdeki veriler yetersiz olduğundan bu polimorfizmin 5-FU metabolizması üzerindeki etkisi halen tartışmalıdır. Bu nedenle sonucumuzun literatüre ek katkı sağlayacağına inanıyoruz. Çalışmamızın bir diğer sonucu da KRK prognozunda ayrıyeten kullanılabilecek *DPYD* 85T>C polimorfizmi ile sağ kalım süreleri arasındaki ilişkidir. Ancak bu sonuca yönelik daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu da kaçınılmaz bir gerçektir. Son olarak, Türk toplumu için *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* polimorfizmlerini geniş bir yelpazede araştıran çok sayıda çalışma bulunmadığından dolayı sonuçlarımızın literatüre yeni veriler kazandıracağını düşünüyoruz.

Günümüzde kanser kaynaklı ölümlerin yüksek çoğunluğu tümör hücrelerinin metastatik yayılım ile beraber önlenemez çoğalmasından dolayı meydana gelmektedir (Christofori, 2006). Bu sebeple metastatik süreçte etkili olan tüm moleküler mekanizmaların araştırılarak açığa çıkarılması kanserle mücadelede oldukça önem taşımaktadır. Metastatik süreçlerde kilit rol alan epitelyal-mezenkimal geçiş (EMG) sayesinde, birçok yeni özellik kazanan kanser hücreleri bulundukları primer dokudan kan damarları aracılığı ile yeni dokulara ulaşarak buralara yerleşerek kanserin vücutta dağılıp agresifleşmesine yol açarlar (Kalluri ve Weinberg, 2010; Nieto ve ark., 2016; Thiery, 2002; Behrens ve ark., 1991; Mani ve ark.; 2008). EMG birçok transkripsiyon faktörünün kontrolü altındadır. Bu transkripsiyon faktörlerinin en önemlilerinden birisi EMG indükleyici özellikte olan *SNAI1*'dir (Peinado ve ark. 2007). *SNAI1*'in karsinogenezdeki rolü hakkında birçok çalışma rapor edilmiş olsa da (Blanco ve ark.,

2002; Elloul ve ark., 2005; Rosivatz ve ark., 2002; Miyoshi ve ark., 2005; Sugimachi ve ark., 2003; Pálmer ve ark., 2004; Blechschmidt ve ark., 2008; Yang ve ark., 2007; Yuan ve ark., 2013; Côme ve ark., 2006; Moes ve ark., 2012; Pena ve ark., 2009; Olmeda ve ark., 2007a; Olmeda ve ark., 2007b); *SNAIL* geni üzerinde yer alan polimorfizmlerin kanser gelişimini nasıl etkilediklerine dair literatürde oldukça sınırlı çalışmalar yer almaktadır (Wang ve ark., 2018; Wang ve ark., 2020; Yang ve ark., 2014; Yang ve ark., 2016). *SNAIL* uzak organ metastazını desteklediğinden dolayı bilim çevrelerinde terapötik hedef olarak kabul görmektedir (Côme ve ark., 2006). Bu sebeple metastatik süreçlerdeki moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına yardımcı olması ve tedavi süreçlerine katkı sağlayabilecek yeni hedeflerin yapılarının anlaşılması açısından, *SNAIL* polimorfizmlerinin incelenmesinin oldukça önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Araştırmamızda, hakkında çok az sonuç rapor edilmiş olan *SNAIL* geninde yer alan rs6125849 G>A ve *LOXL2* geninde yer alan rs6999447 C>T varyasyonlarının KRK riski, metastaz durumu ve primer tümör lokalizasyonu ile ilişkisini ve sağ kalım süreçlerindeki rolünü inceledik. Bilgimiz dâhilinde literatürde kanserli bireylerde *SNAIL* rs6125849 genotip analizi rapor eden yalnızca 2 çalışma bulunmaktadır.

Wang ve arkadaşları (2018) Çinli kadın bireyler üzerinde yaptıkları çalışmalarında *SNAIL* rs6125849 polimorfizmine ait genotiplerin, 1161 meme ve 286 yumurtalık kanseri hastası grubu ile 1273 kişiden oluşan kontrol grubu arasındaki dağılımlarını incelemişler. Bu çalışmaya göre *SNAIL* rs6125849 polimorfizmine ait genotiplerin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımlarının farklı olduğunu tespit etmişlerdir (p=0.0128). Araştırmacılar *SNAIL* rs6125849 GG, GA ve AA genotip dağılımlarını vakalarda sırası ile %31.58, %48.58 ve %19.83; sağlıklı kontrollerde ise %26.47, %51.61, %21.92 olarak rapor etmişlerdir. Kontrol grubunda varyant A alleli taşıma sıklığını G alleli taşıma sıklığına göre daha yüksek; vakalarda ise daha düşük tespit etmişlerdir (p=0.0079). Araştırmacılar çalışmalarından elde ettikleri sonuçlara dayanarak *SNAIL* rs6125849 polimorfizminin azalan meme kanseri riski ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Wang ve ark., 2018).

Yang ve arkadaşları 516 endometriyum kanseri hastası ve 707 sağlıklı kontrolü ele aldıkları çalışmalarında rs6125849'u da içeren farklı *SNAIL* polimorfizmlerini

incelemişlerdir. Araştırmacılar rs6125849 GG, GA ve AA genotip dağılımlarını vakalarda sırası ile %28.10, %49.22 ve %22.67; kontrollerde ise sırası ile %28.01, %50.64 ve %21.36 olarak rapor etmişlerdir ($p=0.8371$). Araştırmacılar *SNAI1* rs6125849 polimorfizmi ile kanser riski arasında anlamlı bir ilişki tespit etmemişlerdir (Yang ve ark., 2016).

Çin popülasyonunu ele alan her iki çalışmada da (Wang ve ark., 2018; Yang ve ark., 2016) *SNAI1* rs6125849 genotip dağılımları oldukça benzerlik göstermekte olup hem vaka ve kontrollerde hem de genel yüzdede bakıldığında en yaygın genotipin heterozigot olduğunu bunu homozigot yaygının takip ettiğini gözlemledik. Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre ise Türk toplumunda en sık gözlenen *SNAI1* rs6125849 genotipinin vakalarda hafif sapma gösterse de homozigot yaygın tip olduğunu ve bunu heterozigot genotipin takip ettiğini gözlemledik. *SNAI1* rs6125849 minor allel frekansını Türk toplumunda Çin toplumuna göre daha düşük bulduk.

Çalışmamızda *SNAI1* rs6125849 polimorfizmine ait genotiplerin kodominant, dominant ve resesif genetik modellerdeki dağılımlarını KRK vakalar ve kontrol grupları arasında incelememiz sonrasında iki grup arasında istatistiksel anlamlı bir fark tespit etmedik ($p=0.20$). rs6125849 GG, GA ve AA genotiplerinin vakalardaki dağılımlarını sırası ile %44.44, %45.83 ve %9.72; kontrollerde ise %57.97, %37.68 ve %4.35 olarak tespit ettik. Buna göre homozigot yaygın genotip sıklığını kontrollerde daha yüksek; heterozigot ve homozigot mutant genotip sıklığı ise vakalarda daha yüksek tespit ettik. Kısacası literatürdeki çalışmalardan farklı olarak KRK hastaları içeren çalışma grubumuzda varyant A alleli taşıma frekansını vaka grubunda daha yüksek tespit ettik. Farklı sonuçlar elde etmemizin sebebi daha düşük örnek sayılarına sahip olmamız olabilir. Aynı zamanda KRK gelişimi ile A varyant alleli sahip olma arasında diğer kanser türlerinden farklı bir ilişki de olabilir. Çalışmamız *SNAI1* rs6125849 polimorfizminin KRK riski ile ilişkisini ilk kez ele alan çalışma olduğundan dolayı daha kesin sonuçlar için daha geniş popülasyonlarda çalışılması gerektiği açıktır.

Literatürde yer alan az sayıdaki çalışmalar kanser riskine ya da hassasiyetine odaklanmış olsa da biz çalışmamızda *SNAI1* rs6125849 polimorfizminin metastatik süreçlere olan etkisini de gözlemlemeyi amaçladık. Çeşitli transkripsiyon faktörlerinin

bağlanma bölgesi olduğu düşünölen bu bölgede meydana gelen varyasyonun EMG üzerinden metastaz sürecine etkili olabileceğini düşöndük. Bu sebeple çalışma grubumuz içerisinde yer alan vakaları metastatik ve metastatik olmayan olmak üzere 2 alt gruba böldük ve rs6125849 genotip dağılımlarını bu alt gruplar arasında inceledik. Her ne kadar metastatik olmayan hasta sayımız metastatik olana göre oldukça düşük olsa da özellikle rs6125849 polimorfizmine ait her iki varyant alleli birden taşıyan homozigot mutant bireylerin tamamının metastatik hastalar olması, metastatik olmayanlarda ise gözlenmemesi oldukça dikkat çekiciydi. Varyant allel etkisini daha verimli gözlemleyebilmek amacı ile oluşturulan dominant genetik modelde rs6125849 polimorfizminin genotip dağılımları arasında hasta sayımız az olmasına rağmen önemli derecede bir fark tespit ettik. Daha sonra analize varyant allelin etkisinin azaldığı resesif genetik modelle devam ettiğimizde ise farkın oldukça azaldığını gördük ki bu da rs6125849 A allelinin metastaz gelişiminde etkili olduğuna işaret ediyor olabilir. Nitekim lojistik regresyon analizi sonuçlarına göre GA+AA genotipleri ile artan metastaz riski ile yakından ilişkili bulunmuştur.

Çalışmamızda *SNAI1* rs6125849 genotip dağılımları ile hastaların progresyonsuz sağ ve genel sağ kalım süreçleri ile olan ilişkisini de inceledik. Bu analizlerde A allelinin metastaz üzerine olan etkisi gibi tümör gelişimini destekleyici olan tavrını, genel sağ kalım sürelerinde sebep olduğu azalmada da gözlemledik. Buna göre yalnızca G alleli taşıyan hastalarda ortalama sağ kalım süresini, A alleli taşıyan GA+AA genotiplerine sahip hastalara kıyasla oldukça yüksek olarak tespit ettik. Genel olarak baktığımızda ise A allelinin genel sağ kalım sürelerinde bir azalmaya sebep olduğunu gözlemledik. A varyant alleli taşıma durumu ile paralel olarak progresyonsuz sağ kalım sürelerinde azalma tespit edilse de oranlar oldukça düşöktü.

Daha önce, HaploReg veri tabanına göre *SNAI1* rs6125849 varyasyonun E2F6 ailesi üyelerinin bağlanma afinitesini azaltabileceği öngöröldüğünden dolayı, Wang ve arkadaşları çalışmalarından da elde ettikleri sonuca dayanarak rs6125849 G>A değişiminin *SNAI1* transkripsiyonunu etkileyerek tümör gelişimini inhibe edebileceğini varsaymışlardır (Wang ve ark., 2018). Ancak bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar A allelinin tümör gelişimini inhibisyonundan ziyade G alleleline kıyasla metastazı teşvik edebileceğine işaret etmektedir. Bu durumda çalışmamızdan elde

ettiğimiz sonuçlar Wang ve arkadaşlarının (2018) sonuçları ile çelişmektedir. Sonuçlarımıza dayanarak *SNAI1* rs6125849 G>A değişiminin EMG dinamiklerinde metastatik fenotipin ortaya çıkmasına sebep olabilecek birtakım mekanizmaları tetiklediğini düşünüyoruz. Bu durum A alleli taşıyan KRK hastalarının genel sağ kalım sürelerinin G allelini taşıyanlara göre daha kısa bulmamızın sebebini açıklıyor olabilir. Karsinogeneizde *SNAI1* anlatım seviyelerindeki değişimleri araştıran bir çalışmada primer tümör hücrelerinde EMG'yi uyarmak için *SNAI1*'in yeterli olduğu ve artan *SNAI1* seviyelerinin azalan nüksüz sağ kalımı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Moody ve ark., 2005). Bu sebeple *SNAI1* rs6125849 G>A değişimi *SNAI1* gen anlatımını artırıcı yönde etkili olabileceği düşüncesindeyiz.

Literatür incelemelerimiz sonunda *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizminin kanser süreçlerindeki etkisine dair herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Ancak yüksek *LOXL2* seviyelerinin agresif tümör fenotipine yol açtığı ve metastazı teşvik ettiği bilindiğinden (Fan ve ark., 2020; Cebrià-Costa ve ark., 2020; Kato ve ark., 2017; Tian ve ark., 2019) ve rs6999447 polimorfizminin gen üzerinde kodlama yapan bölgeye yakınlığından dolayı çalışmamıza dahil ettik. İncelemelerimiz sonucunda *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmi ile KRK kanser riski, primer tümörün yeri, metastaz ve sağ kalım arasında doğrudan ilişki tespit etmedik.

Park ve arkadaşları, yüksek *LOXL2* anlatım seviyelerine sahip KRK hastalarının, düşük seviyeli olanlara göre daha kısa bir genel sağ kalıma ($p=0.024$) sahip olduklarını ve *LOXL2*'nin KRK gelişiminde prometastatik rolü olduğunu rapor etmişlerdir (Park ve ark., 2017). Farklı kanser türlerinde yapılan bir çok çalışmada da benzer sonuçlar bildirmektedir (Fan ve ark., 2020; Cebrià-Costa ve ark., 2020; Kato ve ark., 2017; Tian ve ark., 2019). Çalışmamızda *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmi ile metastaz ve sağ kalım arasında istatistiksel anlam ifade eden bir ilişki tespit etmediğimizden dolayı *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizminin *LOXL2* fonksiyonu üzerinde doğrudan bir etkisi olmadığı düşüncesindeyiz. Dolayısı ile *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmi tek başına KRK'da verimli bir prognostik belirteç olmayabilir.

Park ve çalışma arkadaşları ile Kim ve çalışma arkadaşlarını KRK'da *LOXL2* seviyelerinin kolonun farklı bölgelerinde farklılık göstermediğini bildirmişlerdir (Park

ve ark., 2017; Kim ve ark., 2009). Her ne kadar protein fonksiyonu üzerine doğrudan etki ettiğini düşünmesek de bizde çalışmamızda *LOXL2* rs6999447 C>T polimorfizmini primer tümör lokalizasyonu ile ilişkili bulmadık.

Yapılan araştırmalar EMG sürecinde *LOXL2* ve *SNAIL* ilişkisini ortaya koymuştur. *LOXL2* çeşitli mekanizmalar aracılığıyla *SNAIL*'i stabilize eder ve *SNAIL* artışına yol açar ve sonuç olarak EMG'yi teşvik eder (Peinado ve ark., 2005b; Millanes-Romero ve ark., 2015). Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar *LOXL2* ile *SNAIL* birlikteliğini ve birlikte fonksiyon gördüklerini ortaya koymaktadır (Salvador ve ark., 2017; Fan ve ark., 2020; Peinado ve ark., 2005b). Bunlar ile birlikte KRK'da da *LOXL2* anlatımı ile *SNAIL* stabilizasyonunun ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Park ve ark., 2017). Bu sebepler ile *LOXL2* rs6999447 C>T ile *SNAIL* rs6125849 G>A polimorfizmlerinin KRK süreçlerine olan kombin etkilerini inceledik. Yaptığımız analizler sonucunda *LOXL2* rs6999447 CT+TT ve rs6125849 GA+AA genotiplere sahip olma durumunun artan metastaz riski ile ilişkili olduğunu tespit ettik.

Sonuçlarımız *LOXL2* rs6999447 polimorfizminin metastaz üzerine doğrudan etkisinin olmayıp *SNAIL* üzerinden etki edebileceğine işaret etmektedir. Bu durum, *LOXL2*'nin *SNAIL* üzerindeki etkisi düşünüldüğünde, *LOXL2* rs6999447 polimorfizmi ile *SNAIL* rs6125849 polimorfizminin arasındaki metastatik fenotip riskini artıran sinerjik bir etkiden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca *LOXL2* anlatımında meydana gelen değişikliklerin *SNAIL* anlatımında da benzer yönde etki ettiği bilindiğinden (Fan ve ark., 2020), *LOXL2* rs6999447 polimorfizminin *SNAIL* ile etkileşimde işlevsel olduğunu düşünüyoruz. Ayrıca yalnızca hücre içi *LOXL2* aktivitesi *SNAIL* anlatımını etkilediğinden (Fan ve ark., 2020), *LOXL2* rs6999447 polimorfizmi *LOXL2*'in hücre içinde görev alan formunda etkili olabilir. Ancak *LOXL2* rs6999447 ile *SNAIL* rs6125849 polimorfizmlerinin metastatik fenotiple sonuçlanabilecek potansiyel sinerjik etkisinin in vivo ve in vitro ileri çalışmalar ile araştırılması gerekmektedir.

Çalışmamızda immün kontrol noktası moleküllerinden *PD-1* ve spesifik ligandı *PDL-1*'e ait rs2227982, rs36084323, rs7421861, rs10815225, rs2282055, rs2297136 ve rs822336 polimorfizmlerinin KRK riskine, prognozuna, primer tümör lokalizasyonuna ve metastaza olan etkilerini Türk hastalarda inceledik. Bilgimiz dahilinde bu çalışma

PD-1 ve *PDL-1* polimorfizmlerinin KRK risk ve prognozuna olan etkilerini kapsamlı şekilde inceleyen ilk çalışmadır.

Önceki yıllarda farklı kanser türleri ile yapılan çalışmalar *PD-1* rs2227982 G>A polimorfizminin kanser riski ile ilişkili olmadığını rapor etmişlerdir (Hashemi ve ark., 2019; Hua ve ark., 2011). Özellikle Zang ve arkadaşlarının *PD-1* rs2227982 polimorfizminin kanser riski ile ilişkilerini inceleyen 13 makaledeki 24 vaka kontrol çalışmasını değerlendirdikleri bir meta analizde, *PD-1* rs2227982 polimorfizmi ile kanser riski arasında dikkate değer bir ilişki tespit edilmemiştir (Zhang ve ark., 2016). Benzer şekilde Ge ve arkadaşları *PD-1* rs2227982 polimorfizmi ile KRK riski arasında doğrudan önemli bir ilişki tespit etmemişlerdir (Ge ve ark., 2015). Ma ve arkadaşları ise rs2227982 polimorfizmi TT (AA) genotip sıklığının küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek olduğunu; AA genotipinin CC (GG) ve CT (GA) genotiplerine kıyasla artan kanser riski ile az da olsa ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (p=0.09) (Ma ve ark., 2015). Literatürde mevcut diğer çalışmalarda ise *PD-1* rs2227982 polimorfizmi CT (GA) ve TT (AA) genotipleri azalan meme kanseri ile ilişkili bulunurken (Ren ve ark., 2016); farklı bir çalışmada GA+AA genotipleri artan ovaryum kanseri ile ilişkili bulunmuştur (Tan ve ark., 2018). 2.740 birey ile yapılan bir çalışmada ise *PD-1* rs2227892 polimorfizmi G allelinin özofagogastrik bileşke adenokarsinomunda koruyucu rol üstlendiği rapor edilmiştir (Tang ve ark., 2017).

Çalışmamızda ise Ge ve arkadaşlarının sonucuna benzer şekilde (Ge ve ark., 2015), *PD-1* rs2227982 polimorfizmi ile KRK riski arasında doğrudan dikkate değer bir ilişki bulunmamıştır.

Literatürde *PD-1* rs2227982 G>A polimorfizminin sağ kalım süreçlerindeki etkisinin araştırıldığı sınırlı sayıdaki sağ kalım analizlerinde birbirlerinden farklı sonuçlar bildirilmiştir. *PD-1* rs2227982 varyant allel içeren genotipleri taşıyan ovaryum kanseri hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalım sürelerinin homozigot yaygın genotipe kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (p<0.05) (Tan ve ark., 2018). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve gastrik kanserde ise *PD-1* rs2227982 polimorfizmi ile hastaların sağ kalım süreleri arasında belirgin bir ilişki tespit edilmemiştir (Lee ve ark., 2017a; Wu ve ark., 2019). Benzer şekilde biz de çalışma grubumuzdaki KRK

hastalarının gerek progresyonsuz gerekse genel sağ kalım süreleri ile *PD-1* rs2227982 polimorfizmi arasında istatistiksel önem ifade eden bir ilişki tespit etmedik.

Literatürde *PD-1* rs36084323 C>T polimorfizminin kanser riski ile ilişkisini ele alan, farklı popülasyonlara ait, birbiri ile çelişen sonuçlar rapor eden, farklı çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmalara göre *PD-1* rs36084323 polimorfizmi bazal hücre karsinomu, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, berrak hücreli renal hücreli karsinom, özefagal squamoz hücreli karsinom ve çoklu miyelom gibi birçok kanser riski ile ilişkili bulunmamıştır (Fathi ve ark., 2021; Ma ve ark., 2015; Sasaki ve ark., 2014; Wagner ve ark., 2020; Kasamatsu ve ark., 2020; Hashemi ve ark., 2019). Ancak bu çalışmaların sonuçlarına zıt sonuçlar rapor eden ve *PD-1* rs36084323 polimorfizminin kanser yatkınlığı ile ilişkisine işaret eden çalışmalar da mevcuttur. Hua arkadaşları Çin popülasyonunda meme kanseri üzerine yaptıkları çalışmalarında *PD-1* rs36084323 GG (CC) genotip sıklığını vakalarda daha düşük bulmuşlardır ($p=0.020$) (Hua ve ark., 2011). Shamsdin ve arkadaşları ise İran popülasyonunda *PD-1* rs36084323 polimorfizminin kolon kanseri riski ile olan ilişkisini incelemişler ve sonuçlarımızla uyum içinde *PD-1* rs36084323 CC (GG) genotip ve C (G) allel sıklığını hasta grubunda ($p<0.001$ ve $p<0.001$, sırası ile); TT (AA) ve CT (AT) genotiplerini ise kontrol grubunda belirgin şekilde yüksek tespit etmişlerdir ($p<0.001$ ve $p=0.012$, sırası ile) (Shamsdin ve ark., 2018). Da ve arkadaşlarının 10 farklı çalışmadaki verilerinden yola çıkarak *PD-1* rs36084323 polimorfizmi ile kanser riski arasındaki ilişkiyi inceledikleri ve 2018 yılında yayınladıkları bir meta analizde, *PD-1* rs36084323 polimorfizminin Asya popülasyonlarında azalan kanser riski ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda *PD-1* rs36084323 ve kanser ilişkisine dair literatürde yer alan heterojenik verilerin etnisite ile ($p=0.029$) önemli derecede ilişkili olduğunu ancak kanser türü ($p=0.792$), örnek sayısı ($p=0.585$) ve kontrol kaynağı ($p=0.207$) gibi değişkenlerle ilişkili olmadığını belirtmişlerdir (Da ve ark., 2018). Araştırmamızda ise Shamsdin ve arkadaşlarının sonuçlarına benzer şekilde, *PD-1* rs36084323 CT genotip sıklığı kontrollerde; CC genotip sıklığı ise KRK vakalarında daha yüksek bulunurken ($p<0.001$), *PD-1* rs36084323 CT genotipi azalan KRK riski ile ilişkili bulunmuştur ($p<0.001$).

Ishizaki ve arkadaşları Japon ve Filipin kökenli subakut sklerozan panensefalit (SSPE) hastalarda ve sağlıklı kontrollerde yaptıkları karşılaştırmalı analizlerde, *PD-1* rs36084323 polimorfizminin hastalık riskine, periferik mononükleer hücrelerdeki gen anlatım seviyelerine ve *PD-1* geninin promotör aktivitesi üzerine olan etkilerini incelemişler. Araştırmacılar C allel sıklığının SSPE hastalarında sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğunu; promotör bölgesinde yer alan *PD-1* rs36084323 polimorfizminin T allelinin promotör aktivitesinin C allelinden daha düşük olduğunu ve *PD-1* göreceli gen anlatım seviyelerinin SSPE hastalarında kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (Ishizaki ve ark., 2010). Ishizaki ve arkadaşlarının çalışmasına ve genel bilgilere dayanarak, *PD-1* rs36084323 C allelinin yüksek promotör aktivitesine sebep olarak yüksek gen anlatımına yol açıp hastalığa olan eğilimi arttırdığı söylenebilir. Benzer bir motif ile *PD-1* rs36084323 C allelinin gen transkripsiyonu ve aktivasyonu üzerinden KRK gelişimini etkileyebildiği söylenebilir. C allelinden kaynaklanan yüksek *PD-1* gen anlatımı, immün sistem hücrelerinin daha fazla *PD-1* reseptörlerine sahip olmasına dolayısı ile kanser hücrelerinden salınan PDL-1 moleküllerinin hedef sayısının artmasına ve sonuçta azalan tümör immün cevabı ile sonuçlanıyor olabilir. Ancak KRK'nın *PD-1* rs36084323 C alleli ile olan ilişkisinin tam olarak aydınlatılması için ileri çalışmalar gerekmektedir.

PD-1 rs36084323 CC ve CT genotipleri ile çalışma grubumuzdaki KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında önemli bir ilişki tespit etmedik. Aynı zamanda *PD-1* rs36084323 CC genotipinin CT genotipine göre istatistiksel limit değerine yakın ve belirgin bir şekilde daha kısa bir genel sağ kalıma sebep olduğunu tespit ettik ($p=0.07$). Farklı kanser türlerinde yapılan araştırmalarda *PD-1* rs36084323 polimorfizmi ile sağ kalım süreleri arasında dikkate değer bir ilişki olmadığını rapor eden çalışmalar ile birlikte (Li ve ark., 2017b; Wu ve ark., 2019), rs36084323 CC genotipine sahip bireylerin hayatta kalma sürelerinin CT ya da TT genotiplerine göre önemli derecede düşük olduğunu rapor eden ve rs36084323 CC genotipinin kötü prognoz ile sonuçlandığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (Sasaki ve ark., 2014; Yamamoto ve ark., 2020).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler *PD-1* rs36084323 C>T polimorfizminin KRK gelişimini etkileyen genetik bir risk faktörü olup KRK riski ile doğrudan ilişkili olduğuna ve ayrıca KRK prognozunu da etkileyebildiğine işaret etmektedir.

Çok sayıda düzenleyici ve splaying kontrol elemanlarının bulunduğu intron 1'de yer alan *PD-1* rs7421861 polimorfizminin kanser riski ile ilişkisini ele alan sınırlı sayıdaki çalışmaların sonuçları kanser türüne göre farklılık göstermektedir. Hashemi ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladıkları ve literatürde yer alan *PD-1* rs7421861 polimorfizmini inceleyen 26 makaleye ait 54 vaka-kontrol çalışmasını değerlendiren meta analizde *PD-1* rs7421861 polimorfizminin kanser geliştirme riskini artırdığı rapor edilmiştir ($p=0.03$) (Hashemi ve ark., 2019). Ancak 2016 yılında yayınlanan iki farklı meta analizde ise rs7421861 polimorfizmi ile kanser riski arasında dikkate değer bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2016; Dong ve ark., 2016). Ortaya çıkan farklı meta analiz sonuçlarının altında farklı araştırma metotları veya içerikleri yatıyor olabilir.

Çin popülasyonunda yapılan çalışmalarda *PD-1* rs7421861 polimorfizmi ile meme, özafagus ve gastrik kardial adenokarsinomu riski arasında ilişki olmadığı bildirilmiştir (Hua ve ark., 2011; Ren ve ark., 2016; Qiu ve ark., 2014; Tang ve ark., 2015). Tang ve arkadaşları tarafından yayınlanan farklı bir çalışmada ise rs7421861 polimorfizmi özofagogastrik bileşke adenokarsinomu gelişimi ile ilişkili bulunmuş ve rs7421861 polimorfizminin özofagogastrik bileşke adenokarsinomu için genetik risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (Tang ve ark., 2017). Wagner ve arkadaşlarının berrak hücreli renal hücreli karsinom (BHRHK) hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında yaptıkları karşılaştırmalı analizlerde, rs7421861 CC (GG) genotipi artan BHRHK riski ile ilişkili bulunmuştur ($p=0.043$) (Wagner ve ark., 2020).

Bilgimiz dahilinde literatürde *PD-1* rs7421861 polimorfizmi ile KRK riskini ele alan yalnızca tek bulunmaktadır. Bu çalışmada rs7421861 CT (GA) genotipinin TT (AA) genotipine kıyasla artan KRK riski ile ilişkili olduğu bildirilmiş olup ($p=0.04$), rs7421861 polimorfizminin KRK yatkınlığında aday genetik belirteç olabileceği rapor edilmiştir (Ge ve ark., 2015). Ancak çalışmamızda *PD-1* rs7421861 GA genotipli bireylerin sıklığını KRK hastalarında kontrollere kıyasla daha düşük tespit ettik ($p=0.008$). Lojistik regresyon analizinde ise yaş, cinsiyet ve sigara içme durumlarına

göre düzenlenmediğinde rs7421861 GA genotipinin azalan KRK riski ile ilişkili olduğunu ($p=0.007$); düzenlenmiş analizde ise bu ilişkinin azalsa da hala mevcut olduğunu tespit ettik ($p=0.094$).

PDCDL1 geninin promotör bölgesinde, Sp1 transkripsiyon faktörünün bağlanma sekansı üzerinde yer alan *PDL-1* rs10815225 (-62G>C) polimorfizmi (Abelson ve ark., 2007; Tao ve ark., 2017) ile ilgili sınırlı sayıda çalışma rapor edilmiş olup *PDL-1* rs10815225 polimorfizminin fonksiyonu, tümör gelişimi ve progresyonu üzerine olan etkisi henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Literatürde yer alan sınırlı sayıdaki çalışmalarda *PDL-1* rs10815225 polimorfizmi berrak hücreli renal karsinomu ve mide kanseri riski ile ilişkili bulunmuştur (Tao ve ark., 2017; Wagner ve ark., 2020). Wang ve arkadaşları tarafından rapor edilen farklı bir çalışmada ise *PDL-1* rs10815225 polimorfizmi genotip dağılımlarının gastrik kanser hastalarının genel sağ kalım süreleri ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2017).

Araştırmamızda *PDL-1* rs10815225 polimorfizmine ait genotiplerin dağılımları KRK ve kontrollerde fark göstermemiştir. Ayrıca lojistik regresyon analizlerinde de *PDL-1* rs10815225 polimorfizmi KRK riski ile ilişkili bulunmamıştır. Sağ kalım analizi sonuçlarımıza göre ise *PDL-1* rs10815225 polimorfizmi ile KRK prognozu arasında dikkate değer bir ilişki saptamadık. Bu noktada sonuçlarımız farklı kanser türü olsa da Wang ve arkadaşlarının çalışması ile benzerlik göstermektedir. Bu sebeple *PDL-1* rs10815225 polimorfizminin sindirim sistemi kanserleri riski ve prognozu ile ilişkili olmadığını düşünüyoruz.

İntron 1’de yer alan (O’Doherty ve ark., 2009) *PDL-1* rs2282055 T>G polimorfizmi hakkında literatürde sınırlı veri bulunmaktadır. Araştırmamız sonucunda elde ettiğimiz verilere göre homozigot yaygın genotiple (TT) karşılaştırıldığında *PDL-1* rs2282055 homozigot mutant (GG) genotipi azalan KRK riski ile ilişkili bulunmuştur ($p=0.040$). Ancak bu ilişki cinsiyet, yaş ve sigara içme durumuna göre düzenlenmeksizin analiz edildiğinde önemi azalmaktadır ($p=0.089$). Ayrıca oluşturduğumuz KRK riskini öngören lojistik regresyon modelinde yaş ve VKİ verilerine göre düzenlendiğinde *PD-1* rs36084323 CT genotipi ile birlikte *PDL-1* rs2282055 TG+GG genotipi azalan KRK riski ile ilişkili bulunmuştur ($p=0.047$). Literatürde *PDL-1* rs2282055 polimorfizminin

KRK riski ile ilişkili olduğunu rapor eden başka bir araştırmaya rastlamadığımızdan dolayı, çalışmamız bu konuda ilk sonuçları bildirmektedir.

Literatürde *PDL-1* rs2282055 T>G polimorfizminin sağ kalım süreçlerine olan etkisine dair oldukça sınırlı veriler bulunmaktadır. Nivolumab tedavisi altında olan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastaları ile yapılan bir çalışmada, *PDL-1* rs2282055 TT genotipine sahip hastalarda, GG ve GT genotipine sahip hastalara kıyasla daha kısa progresyonsuz sağ kalım gözlemlendiği bildirilmiştir ($p=0.0163$) (Nomizo ve ark., 2017). Çalışmamızda ise Nomizo ve arkadaşlarının sonuçlarının aksine *PDL-1* rs2282055 heterozigot (TG) genotipe sahip hastaların progresyonsuz ve genel sağ kalım sürelerini diğer genotiplere göre yüksek tespit ettik ($p=0.05$, $p=0.04$ sırası ile). Detaylı incelemede rs2282055 TT genotipli hastalar GG genotipli hastalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha uzun progresyonsuz ve genel sağ kalım süreleri göstermiştir (*Bonferroni* düzeltilmiş Log rank $p=0.013$ ve *Bonferroni* düzeltilmiş Log rank $p=0.009$, sırasıyla). Sonuçlarımızın farklı olması *PDL-1* ligandı Nivolumabın varlığı, farklı popülasyonlar veya farklı kanser türlerindeki farklı etkileşimlerden kaynaklanıyor olabilir.

Farklı popülasyonlarda çeşitli kanser türleri ile yapılmış çalışmalar *PDL-1* rs2297136 polimorfizminin kanser gelişimi ve prognozu üzerine olan etkisi hakkında farklı sonuçlar bildirmektedirler. Bazı çalışmalar *PDL-1* rs2297136 polimorfizmini kanser riski ve prognozu ile ilişki bulmazken (Machado-Rugolo ve ark., 2021; Kasamatsu ve ark., 2020; Zhao ve ark., 2020a; Zhao ve ark 2020b; Lee ve ark., 2017a); bazı çalışmalar ise tam tersi sonuçlar rapor etmektedir (Xie ve ark., 2018; Du ve ark., 2017; Lee ve ark., 2016b). Çalışmamızda ise KRK hastaları ve kontroller arasında yaptığımız karşılaştırmalı analizlerde *PDL-1* rs2297136 polimorfizmi KRK riski ile ilişkili bulunmamıştır.

Benzer şekilde *PDL-1* rs2297136 polimorfizmine ait farklı genotiplere sahip KRK hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalım süreleri önemli derecede farklı değildi. Yaptığımız incelemelerde KRK hastalarında *PDL-1* rs2297136 polimorfizminin sağ kalıma etkilerini ele alan yalnızca 2 çalışmaya rastladık. Huijian ve arkadaşları kapesitabin tedavisi altındaki KRK hastaları ile yaptıkları çalışmalarında *PDL-1* rs2297136 polimorfizmi AG+GG genotipine sahip hastaların AA genotipine sahip

olanlara kıyasla daha kısa hastalıksız sağ kalım ve genel sağ kalım sürelerine sahip olduğunu rapor etmişlerdir ($p=0.001$, $p<0.001$). Çalışmada aynı zamanda operasyon sonrası dokularda PDL-1 gen anlatım seviyelerine bakılmış ve rs2297136 TC+CC (AG+GG) genotiplerine sahip bireylerde TT (AA) genotipine sahip bireylere göre gen anlatım seviyelerinin daha yüksek olduğu saptanmış ($p<0.001$) (Huijian ve ark., 2019). Benzer şekilde Su ve arkadaşları kapesitabin tedavisi altındaki R0 rezeksiyonlu KRK hastalarında rs2297136 polimorfizminin sağ kalımla ve PDL-1 gen anlatım seviyeleri ile olan ilişkilerini incelemişler. Araştırmacılar AG+GG genotipinin AA genotipine göre daha kısa hastalıksız ve genel sağ kalıma yol açtığını rapor etmişlerdir ($p=0.008$ ve $p=0.007$). Araştırmacılar aynı zamanda periferik mononükleer hücrelerdeki PDL-1 gen anlatımının AG+GG genotipine sahip bireylerde homozigot yaygın AA genotipine göre daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir ($p<0.001$) (Su ve ark., 2020). Çalışma grubumuzda ise KRK hastalarına ait progresyonsuz ve genel sağ kalım süreleri *PDL-1* rs2297136 genotiplerine göre belirgin bir fark göstermedi. Dolayısı ile sonuçlarımız KRK hastaları ile yapılan diğer iki çalışma ile (Huijian ve ark., 2019; Su ve ark., 2020) uyum göstermemektedir. Bu durum popülasyonlar arasındaki bağlantı dengesizliği farklılıklarından olabileceği gibi çalışma grubumuzda katılımcı sayısının az olmasından kaynaklı *PDL-1* rs2297136 polimorfizmi genotip dağılımlarının *Hardy Weinberg* dengesinden sapma göstermesinden dolayı da olabileceği görüşündeyiz.

PDL-1 rs822336 -1813G>C polimorfizmi, promotör bölgesinde, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma dizileri üzerinde yer alan (Wu ve ark., 2019) bir varyasyon bölgesi olup bu noktadaki G>C nükleotit değişimi azalan promotör aktivitesi ile sonuçlansa da (Lee ve ark., 2017a) kanser riski ve prognozu da birbiri ile çelişen verilerden dolayı işlevi tam olarak aydınlatılamamıştır.

Literatürde *PDL-1* rs822336 polimorfizmi ile kanser riski ilişkisini mercek altına alan az sayıda çalışma yer almaktadır ve bilginiz dahilinde KRK riski üzerine etkisi daha önce incelenmemiştir. Zhao ve arkadaşları tarafından rapor edilmiş çalışmada, *PDL-1* rs822336 polimorfizmi küçük hücreli akciğer kanseri riski ile ilişkili bulunmamıştır (Zhao ve ark., 2020b). Çalışmamızda ise *PDL-1* rs822336 polimorfizminin KRK riski ile doğrudan ilişkili olmadığını ancak yaş ve VKİ'ye göre düzenlendiğinde ve rs36084323 CT genotipi varlığında *PDL-1* rs822336 GC+CC genotipinin artan KRK

riski ile ilişkili olduğunu tespit ettik ($p=0.011$). Her ne kadar temel karşılaştırmalı analizler dikkate alındığında sonuçlar farklı iki kanser türünde de benzerlik gösterse de, *PDL-1* rs822336 polimorfizminin kanser riski ile ilişkisinin tam olarak aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu açıktır.

Kanser yatkınlığının aksine *PDL-1* rs822336 polimorfizminin kanser prognozuna olan etkisini ele alan çalışma sayısı fazladır. Ancak bu çalışmaların sonuçları her zaman birbirleri ile uyum göstermemektedir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının genel sağ kalım sürelerinin *PDL-1* rs822336 CC genotipine sahip hastalarda GG+GC genotiplerine sahip hastalara kıyasla daha düşük olduğu rapor edilmiştir ($p=0.02$) (Lee ve ark., 2017a). Gastrik kanserde ise *PDL-1* rs822336 CC genotipini taşıyan hastaların GG+GC genotipini taşıyan hastalara kıyasla daha uzun yaşadığı rapor edilmiştir ($p=0.020$) (Wu ve ark., 2019). Farklı bir çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanseri vakalarında rs822336 GG genotipe sahip hastaların hastalıksız ve genel sağ kalım süreleri GC+CC genotiplere kıyasla daha düşük tespit edilmiştir ($p=0.01$ ve $p=0.008$) (Zhao ve ark., 2020a). Aynı çalışmada Multivariate Cox Regresyon analizi sonuçlarına göre ise rs822336 polimorfizmi, genel sağ kalım ($p=0.015$) ve hastalıksız sağ kalım ($p=0.035$) için bağımsız risk faktörü olarak rapor edilmiştir (Zhao ve ark., 2020a). Farklı bir araştırma grubu ise *PDL-1* rs822336 G>A polimorfizmi ile küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında önemli bir bağlantı saptamazken; GG genotipine sahip hastaların genel sağ kalım sürelerini GC+CC genotiplerine sahip olanlara kıyasla daha yüksek tespit etmişlerdir ($p=0.044$). Araştırmacılar *PDL-1* rs822336 GG genotipinin daha uzun genel sağ kalımla sonuçlandığını bildirmişlerdir ($p=0.021$) (Zhao ve ark., 2020b). Su ve arkadaşları kapesitabin tedavisi altındaki R0 rezeksiyonlu KRK hastalarında *PDL-1* rs822336 G>C polimorfizminin sağ kalımla ya da *PDL-1* gen anlatım seviyesi ile ilişkili olmadığını rapor etmişlerdir (Su ve ark., 2020). Benzer şekilde Huijian ve arkadaşları kapesitabin tedavisi altındaki KRK hastaları ile yaptıkları çalışmalarında da *PDL-1* rs822336 G>C polimorfizmi ile *PDL-1* gen anlatımı arasında önemli bir ilişkili tespit etmemişlerdir (Huijian ve ark., 2019).

Çalışmamızda ise *PDL-1* rs822336 polimorfizmi ile KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri arasında tüm genetik modellerde istatistiksel önem ifade eden bir

ilişki tespit etmedik. Ancak hastaların genel sağ kalım süreleri incelendiğinde, kodominant ve resesif modelde anlamlı bir fark bulamazken dominant modelde GG genotipli bireylerin genel sağ kalım sürelerini GC+CC genotipli bireylere kıyasla oldukça düşük bulduk ($p=0.04$).

PDL-1 rs822336 polimorfizminin genel sağ kalım ile ilişkisine dair bulgularımız Zhao ve arkadaşlarının sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar aynı zamanda GG genotipine sahip hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinde *PDL-1* mRNA anlatımının GC+CC genotiplerine kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğunu bildirmişlerdir ($p<0.001$) (Zhao ve ark., 2020a). Her ne kadar literatürde *PDL-1* rs822336 polimorfizmi ile *PDL-1* gen anlatımı arasında farklı sonuçlar rapor eden çalışmalar yer alsada (Krawczyk ve ark., 2019; Yeo ve ark., 2017; Wu ve ark., 2019; Lee ve ark., 2017a) GG genotipinin sebep olduğu yüksek *PDL-1* seviyeleri daha fazla *PD-1/PDL-1* ligasyonu ile sonuçlanabilir. Dolayısı ile artan *PD-1/PDL-1* kompleksleri kanser hücrelerinin immün sistemden daha kolay kaçışına imkan sağlayacağından *PDL-1* rs822336 GG genotipinin kısa genel sağ kalım ile sonuçlanan daha agresif fenotipe yol açtığını düşünüyoruz. Bununla birlikte, tümör infiltre eden hücrelerdeki yüksek *PDL-1* anlatımı KKR'da uzun süreli genel sağ kalım için bağımsız faktör olarak belirlendiğinden (Berntsson ve ark., 2018), *PDL-1* rs822336 polimorfizminin KKR prognozu üzerindeki etkilerinin ayrıntılı olarak araştırılması gerektiği düşüncesindeyiz.

Araştırmamızda Türk toplumunda *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerinin KKR riski, primer tümör lokalizasyonu, metastaz ve prognoz ile ilişkilerini inceledik. Literatürde yer alan çalışmalar KKR riskinde *VEGF-A* +405G>C polimorfizminin etkisine dair farklı sonuçlar rapor etmektedirler. Bazı araştırmacılar *VEGF-A* mRNA seviyelerinin normal kolon mukozasına kıyasla kolorektal tümörlerde 2.1 kat daha fazla olduğunu ($p<0.01$), ama bu durumun içlerinde +405G>C'nin de olduğu bazı tek nükleotit polimorfizmleri ile ilişkili olmadığını bildirmişlerse de (Ungerback ve ark., 2009) literatürde bu çalışma ile çelişen çalışmalar mevcuttur. Toplamda 2270 KKR hastası ve 2568 kontrolü içeren 12 çalışmanın incelendiği bir meta analizde GG genotip sıklıklarının KKR vakalarında kontrollere kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu rapor edilmiştir (OR:1.24, %95 CI=1.06-1.44) (Zhao ve ark., 2012). Farklı bir meta analiz çalışmasında ise *VEGF-A* +405G>C polimorfizminin resesif modelde KKR riskini

artırdığı gösterilmiştir (Guo ve ark., 2014). Kore popülasyonunda yapılan çalışmada GC genotipinin sağlıklı kontrollerde daha yüksek ve azalan KRK riski ile ilişkili olduğu bulunmuş. Ancak CC genotipi için aynı ilişki tespit edilmemiş. Dominant modelde yapılan analizde ise GC+CC genotipleri azalan KRK ile ilişkili bulunmuş ($p=0.001$) (Chae ve ark., 2008). Antonacopoulou ve arkadaşları +405G>C polimorfizmi C allel sıklığının kontrollere kıyasla KRK hastalarında daha yüksek olduğunu bildirmişler, ancak +405G>C polimorfizmini KRK riski ile ilişkili bulmamışlar (Antonacopoulou ve ark., 2012). Kore popülasyonunda yapılan farklı bir çalışmada ise +405G>C polimorfizmine ait genotip dağılımları vaka ve kontroller arasında önemli derecede farklı bulunmamış (Jang ve ark., 2013a). Benzer sonuçlar Dassoulas ve arkadaşları tarafından da rapor edilmiş (Dassoulas ve ark., 2009). Çalışmamızda çoğu çalışma ile benzer olarak, KRK ve kontrollerdeki *VEGF-A* +405G>C polimorfizmine ait genotip sıklıkları dağılımları kodominant, resesif ve dominant modellerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.136$, $p=0.623$ ve $p=0.193$, sırası ile). GC genotipi GG genotipe kıyasla hem düzenlenmemiş (OR:2.471 %95 CI=0.941-6.490, $p=0.066$), hem de düzenlenmiş modelde (OR:2.643 %95 CI=0.916-7.624, $p=0.072$) artan KRK riski ile yakın ilişkili bulunsada, sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlı değildi.

KRK hastaları ile sağlıklı kontrollerde karşılaştırmalı olarak incelediğimiz diğer bir *VEGF-A* tek nükleotit polimorfizmi olan *VEGF-A* -460C>T polimorfizmine ait genotip dağılımları vaka ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.219$, $p=0.301$ ve $p=0.139$, sırası ile). Aynı zamanda lojistik regresyon analizi sonucunda da *VEGF-A* -460C>T polimorfizmi ile KRK riski arasında dikkate değer bir ilişki tespit edilmedi. Sonuçlarımız ile uyumlu olarak, Türk popülasyonunda daha önceki yıllarda KRK hastaları ve sağlıklı kontroller ile yapılan çalışmada da -460C>T genotip dağılımları vaka ve kontrollerde önemli derece farklı bulunmamış (Jannuzzi ve ark., 2015). Antonacopoulou ve arkadaşlarına ait çalışmada -460C>T genotip dağılımları vaka ve kontroller arasında fark göstermezken, risk analizlerinde CC genotipinin artan KRK riski ile ilişkili olduğu bildirilmiş ($p=0.048$) (Antonacopoulou ve ark., 2012). İtalyan popülasyonunda ise *VEGF-A* -460CC ($p=0.0006$) ve CC+CG ($p<0.001$) genotip sıklıkları vakalarda daha yüksek tespit edilmiş (Maltese ve ark., 2009). Kafkas ırkında -460TC (OR:1.54, %95 CI=1.22, 1.94) ve -460CC (OR:2.00, %95 CI=1.50, 2.67) genotipleri kontrollere kıyasla KRK vakalarında yüksek rapor edilmiş (Zhao ve ark.,

2012). Dassoulas ve arkadaşlarına ait çalışma da ise -460T>C polimorfizmi KRK ile ilişkili bulunmamış (Dassoulas ve ark., 2009). Çalışmamızda *VEGF-A* -460CC ve CT genotip dağılımları vakalarda kontrollere kıyasla daha yüksek tespit edilmiş olsa da sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Kolorektal kanserler primer tümörün yerine bağlı olarak farklı histolojik, patolojik, moleküler veya genetik özelliklere sahip olabilirler (Plastiras ve ark., 2019; Benedix ve ark., 2010; Lee ve ark., 2015). Sahip oldukları farklılıklardan ötürü sağ kolondaki tümörler sol kolondakilere kıyasla seyrek olarak gözlenseler de daha kötü prognoza ve daha yüksek mortaliteye sahiptirler (Benedix ve ark., 2010; Stintzing ve ark., 2017). Dolayısı ile KRK'da primer tümörün yeri, kanser gelişimi ve ilerleme sürecinin değerlendirilmesinde başvuru kriterlerinden birisi olma potansiyeline sahiptir. *VEGF* sinyalizasyonda görev alan *VEGF-A*'nın da içinde bulunduğu molekülleri kodlayan gen bölgelerindeki bazı polimorfizmlerin primer tümörün yerine bağlı olarak KRK'yı etkilediği bilinmektedir (Riera ve ark., 2018; Grassadonia ve ark., 2019). *VEGF* anlatım seviyelerinin kolonun farklı bölgelerinde değişiklik gösterdiği de bilindiğinden (Bendardaf ve ark., 2008; Szajewski ve ark., 2014), *VEGF* gen anlatım seviyeleri üzerine etki etme potansiyeli olan *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T genetik varyasyonların primer tümörün yeri ile ilişkili olabileceğini düşündük.

Literatürde yer alan birçok çalışma *VEGF-A* polimorfizmlerinin daha çok KRK riski, prognozu, ilaç cevabı gibi genel özellikleri üzerine yoğunlaşmakta olup yalnızca sınırlı sayıda çalışma anjiyogenez üzerine etkili olma potansiyeline sahip polimorfizmlerin primer tümörün yeri ile ilişkisini ele almıştır. Sınırlı sayıdaki bu incelemelerde de çalışma gruplarının sınıflandırılmasında farklı kriterlerin kullanılmasından dolayı ikna edici sonuçlar elde edilememiştir. Slattey ve arkadaşları çalışma gruplarını primer tümörün rektum veya kolonda olmasına göre iki grup altında ele almışlar ve *VEGF-A* +405GC+CC genotiplerini rektal kanser gelişimi ile ilişkili bulmuşlardır ($p=0.007$) (Slattey ve ark., 2014). Benzer şekilde Jang ve arkadaşları primer tümör yerini kolon ve rektum olarak ele almışlar, ancak Slattey ve arkadaşlarının sonuçlarından farklı olarak +405GC+CC genotipleri ile primer tümör lokalizasyonu arasında belirgin bir ilişki saptamamışlardır (Jang ve ark., 2013b). Bir diğer çalışmada ise çalışma grubu primer kolonun yerine göre kolon, rektum ve rektosigmoid olmak üzere üç ayrı alt grup olarak

ele alınmış. Bu çalışmada da hem +405G>C hem de -460C>T polimorfizmleri ile primer tümörün yeri arasında bir bağlantı tespit edilmemiştir (Koutras ve ark; 2012).

Araştırmamızda çalışma grubumuzu primer tümörün sağ (çekum, yükselen kolon, hepatik fleksura ve transvers kolon) veya sol (splenik fleksura, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum) kolonda olmasına göre iki alt gruba ayırdık. Lojistik regresyon analizleri sonucunda *VEGF-A* +405GC+CC genotipleri sağ kolona kıyasla sol kolon kanseri ile ilişkili bulunmuştur (Düzenlenmemiş OR:5.208 %95 CI=1.064-25.496, p=0.04). Sonuçlarımıza göre, *VEGF-A* +405GC+CC genotiplerinin sol kolon kanserine daha yatkın olmasından dolayı, agresif karakterde olan sağ kolon kanserine karşı koruyucu rol oynuyor olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda aynı zamanda *VEGF-A* +405 polimorfizmi kadar olmasa da, -460CT+TT genotipleri de sol kolon kanseri ile kısmen ilişkili bulunmuştur (Düzenlenmemiş OR:2.868, %95 CI=0.964-8.532, p=0.06).

Tümör anjiyogenezinin, solid tümörlerin büyümesi ve hayatta kalmasındaki önemi iyi bilinmektedir (Hasina ve Lingen, 2001; Gupta ve Qin; 2003). Bunun yanı sıra anjiyogenez, tümör hücrelerinin metastatik yayılımını da kolaylaştırarak kanserin gelişimine büyük katkı sağlar (Kumar ve ark., 2004). Dolayısı ile başarılı bir metastazın meydana gelmesinde anjiyogenez kilit rol oynar. Bu sebeple araştırmamızda *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerinin KRK karaciğer metastazındaki etkilerini inceledik. Buna göre *VEGF-A* +405G>C polimorfizmi kodominant, resesif ve dominant modellerde metastaz ile ilişkili bulunmamıştır. *VEGF-A* -460C>T polimorfizminde ise varyant allel taşıyan genotiplerin (CT+TT) yüzdesi, metastatik olmayanlarda daha yüksek bulunmuştur (p=0.04). Lojistik regresyon analizi sonuçlarına göre ise CC genotipe kıyasla TT ve CT+TT genotipleri azalan karaciğer metastazı riski ile ilişkili bulunmuştur (OR:0.080 %95 CI=0.009-0.689 p=0.02 ve OR:0.191 %95 CI=0.039-0.925, p=0.04, sırası ile).

Sonuçlarımız ile benzer olarak, Santo ve arkadaşları *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerinin karaciğer metastazı üzerine olan etkilerini incelemişler ve -460C>T polimorfizmini azalan karaciğer metastazı riski ile ilişkili bulmuşlar (OR:0.32; p=0.048). +405G>C polimorfizmi için ise aynı ilişki saptanmamış (do Espírito Santo ve ark., 2017). Chae ve arkadaşları ise çalışma gruplarını uzak organ metastazı varlığına

göre iki alt gruba ayırmışlar ve +405GC genotipini azalan metastaz riski ile yakın ilişkili bulsalar da ($p=0.05$) CC genotipi ile aynı ilişkiyi tespit etmemişlerdir (Chae ve ark., 2008). Farklı bir çalışmada ise *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmleri karaciğer metastazı ile ilişkili bulunmamıştır (Koutras ve ark., 2012).

Her ne kadar farklı çıktıları olan araştırmalar olsa da, çalışmamızdan elde ettiğimiz ve Santo ve arkadaşlarının da rapor ettiği benzer sonuçlar, *VEGF-A* -460C>T değişiminin KRK gelişiminde metastazı önleyici bir tavır sergilediğine işaret etmektedir. Daha önce yapılmış bir çalışmaya göre KRK'da *VEGF-A* -460TT genotipinin TC ve CC genotiplere kıyasla VEGF mRNA sentezinde azalmaya yol açtığı da bilindiğinden (Yamamori ve ark., 2004), *VEGF* geni üzerinde meydana gelen -460C>T tek nükleotit polimorfizminin KRK karaciğer metastazı ve genel metastazdan koruyucu rol üstlendiği kanısındayız. Ancak *VEGF-A* -460C>T polimorfizminin hangi mekanizmalar ile metastazdan koruduğunun anlaşılması için in vivo ve in vitro çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızın devamında *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerinin çalışma grubumuzdaki KRK hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalım süreleri ile ilişkilerini ele aldık. *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerinin KRK sağ kalımı ile ilişkilerini önce alt gruplara ayırmaksızın tüm KRK hastalarında, daha sonra ise bevasizumab kullanım durumuna göre iki alt gruba ayırarak inceledik. İlk analizlerimizde *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmleri KRK hastalarının progresyonsuz ve genel sağ kalımları ile ilişkili bulunmamıştır.

Bevasizumab tedavisinin popülasyon düzeyinde verimliliği, çoklu direnç mekanizmaları nedeniyle sınırlıdır. Bu sebeple farklı bevasizumab yanıtlarının altında yatan moleküler genetik mekanizmalar henüz yeterince aydınlatılamadığından bevasizumab tedavisini bireyselleştirme girişimleri yetersiz kalmaktadır. Bu sebeple *VEGF-A* polimorfizmleri ile bevasizumab cevabı arasındaki ilişkileri ortaya koyan bilgilere ihtiyaç olduğundan dolayı bu çalışmada *VEGF-A* +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerinin hastaların bevasizumab kullanımına bağlı progresyonsuz ve genel sağ kalım süreleri üzerindeki etkilerini değerlendirdik. BEV⁺ gruptaki, *VEGF-A* +405GG genotipine sahip KRK hastalarının progresyonsuz sağ kalım süreleri GC+CC genotiplerine kıyasla daha uzun tespit edildi (Log rank=4.61, $p=0.03$, sırası ile). Fakat BEV⁻ gruptaki incelemede belirgin bir fark izlenmedi. Progresyonsuz sağ kalımdan farklı olarak BEV⁺ ve BEV⁻

gruplarda *VEGF-A* +405G>C polimorfizmi genel sağ kalım ile ilişkili bulunmamıştır. Analizlerimiz bevasizumab kullanımının *VEGF-A* +405GG genotipine sahip KRK hastalarında daha uzun progresyonsuz sağ kalım ile sonuçlandığına işaret etmektedir.

Literatürde yer alan *VEGF-A* +405G>C polimorfizminin KRK sağ kalımı ile ilişkisine dair çalışmalar gerek içerik gerekse sonuç açısından heterojenlik göstermektedir. Dassoulas ve arkadaşları +405CC genotipine sahip KRK hastalarının 6 yıllık sağ kalım yüzdelerinin diğer genotiplere kıyasla düşük olduğunu bildirmişler, ancak araştırmacılar çalışmalarında hastaların tedavi rejimleri ile ilgili detay vermemişlerdir (Dassoulas ve ark., 2009). Hansen ve arkadaşları birinci basamak kapesitabin ve oxaliplatin tedavisi gören mKRK hastalarında +405GC genotipini progresyonsuz sağ kalım ile sınır değerinde ilişkili bulmuşlar (Hansen ve ark., 2011). Santo ve arkadaşları +405CC genotipini KRK hastalarının 5 yıllık hayatta kalımları ile çoklu varyans analizinde ilişkili bulurlarken; tek varyans analizinde ise belirgin bir ilişki saptamamışlardır (do Espírito Santo ve ark., 2017). Fluorourasil, irinotekan veya oxaliplatin tabanlı kombin kemoterapilere ek olarak bevasizumab uygulanan KRK hastaları ile yapılan çalışmaların yüksek çoğunluğunda ise *VEGF-A* +405G>C polimorfizmi ile progresyonsuz ve/veya genel sağ kalım arasında dikkate değer bir ilişki olmadığı rapor edilmiştir (Koutras ve ark.; 2012; Loupakis ve ark., 2011a; Papachristos ve ark., 2019; Pander ve ark., 2011; Loupakis ve ark., 2011b).

Yapılan araştırmaların birçoğu *VEGF-A* +405GG genotipinin tümör hücrelerinde daha düşük VEGF protein seviyelerine ve düşük anjiyogenisiteye sebep olduğuna işaret etmektedir (Koukourakis ve ark., 2004; Awata ve ark., 2002). Ayrıca VEGF anlatım seviyeleri düşük veya az olan hastaların sağ kalımlarının, yüksek olan hastalara kıyasla iyi olduğu da bilinmektedir (Lee ve ark., 2000; Ferroni ve ark., 2005; Kuramochi ve ark., 2006; Altomare ve ark., 2007). Bu sebeple *VEGF-A* +405GG genotipinin VEGF anlatım seviyeleri üzerinden KRK prognozunu etkilediği öngörülebilir. Ancak FOLFOXIRI+bevasizumab tedavisi altındaki KRK hastaları ile yapılan bir çalışmada *VEGF-A* +405G>C polimorfizminin plazmadaki VEGF protein seviyeleri ilişkili olmadığı bildirildiğinden (Loupakis ve ark., 2011a), *VEGF-A* +405GG polimorfizminin KRK prognozundaki rolünün tam olarak aydınlatılabilmesi için daha geniş çalışma gruplarında ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Çalışma grubumuzda VEGF -460C>T polimorfizmine ait farklı genotiplere sahip hastaların progresyonsuz ve genel kalım süreleri BEV⁺ ve BEV⁻ gruplarda istatistiksel anlam ifade eden bir fark göstermemiştir. Sonuçlarımızla paralel olarak fluorourasil, irinotekan veya oxaliptatin tabanlı kombin kemoterapilere ek olarak bevasizumab uygulanan KRK hastaları ile yapılan çalışmaların yüksek çoğunluğunda VEGF-A -460C>T polimorfizmi ile progresyonsuz ve/veya genel sağ kalım arasında dikkate değer ilişkili rapor edilmemiştir (Koutras ve ark., 2012; Sohn ve ark., 2014; Paré-Brunet ve ark., 2015; Dassoulas ve ark., 2009; Hansen ve ark., 2011; Gaibar ve ark., 2021; Loupakis ve ark., 2011a; Pander ve ark., 2011). Ancak farklı sonuçlar rapor eden çalışmalar da mevcuttur. Cui ve arkadaşları FOLFIRI+bevasizumab kullanan KRK hastalarında VEGF-A -460TT genotipinin TC ve CC genotiplerine kıyasla daha uzun progresyonsuz sağ kalım ile sonuçlandığını bildirmişlerdir (p=0.002) (Cui ve ark., 2017). Loupakis ve arkadaşları VEGF-A polimorfizmlerinin genel ve progresyonsuz sağ kalım ile ilişkilerini ilk basamak FOLFIRI+bevasizumab kullanan KRK hastaları ve yalnızca FOLFIRI kullanan hastalar arasında incelemişlerdir. Buna göre bevasizumab kullanan hastalarda -460C>T polimorfizmi progresyonsuz sağ kalım ile ilişkili bulunurken genel sağ kalımın sınır değerinde ilişkili olduğu bildirilmiştir. Yalnızca FOLFIRI kullanan grupta ise -460C>T polimorfizmi sağ kalım ile ilişkili bulunmamıştır (Loupakis ve ark., 2011b). Farklı bir çalışmada ise VEGF-A -460CT ve CC genotiplerinin KRK hastalarının 5 yıllık hayatta kalımı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (do Espirito Santo ve ark., 2017). 5-FU tabanlı kemoterapi ile tedavi edilen seviye 2 ve 3 KRK hastaları ile yapılan bir başka çalışmada ise, VEGF-A -460C>T polimorfizmi genel sağ kalım ile seviye 3 hastalarında ilişkili bulunmaz iken; seviye 2 grupta ilişkili bulunmuştur (Riera ve ark., 2018).

Yaptığımız incelemelere göre, literatürde yer alan çalışmalar arasında gözlenen sonuç farklılıkları çalışmaların boyutu, içeriği, analiz yöntemleri ve gözlem sürelerindeki farklılıklardan veya çalışma gruplarındaki hastaların etnik kökenlerinin, genetik arka planlarının, uygulanan ilaç rejimlerinin veya hastalığın karakteristiklerinin farklılığından dolayı meydana gelebilir. Bu sebeple VEGF-A +405G>C ve -460C>T polimorfizmlerinin sağ kalımla olan ilişkilerinin kesin olarak tanımlanması zordur. Ancak her çalışma grubu ayrıntılı olarak tanımlanabilirse ve sağ kalım üzerinde etkili olabileceği düşünülen faktörlerde standardize edilip göz önüne alınırsa belki ortak bir

paydada buluşulabilir ve bu polimorfizmlerin sağ kalım sũreęlerindeki etkileri aydınlatılabilir.



4. SONUÇLAR

Kolorektal kanser (KRK), tedavi rejimlerindeki gelişmelere rağmen, ortaya çıkmasında, metastazında ve prognozunda görev alan moleküler genetik etkileşimlerin tam olarak aydınlatılamamasından dolayı ülkemizde de olduğu gibi hala dünya çapında en sık gözlenen hastalıklar ve ölüm sebepleri arasında yer almakta olup küresel yükü gittikçe artmaktadır. Bu sebeple araştırmamızda, KRK etiyojisi ve malignitesinin farklı basamaklarında görev alan *DPYD*, *MTHFR*, *TYMS*, *SNAI1*, *LOXL2*, *PD-1*, *PDL-1* ve *VEGF-A* genlerine ait spesifik polimorfizmlerin KRK hassasiyeti, metastazı, primer tümör yeri, sağ kalımı ve kemoterapi cevabı ile ilişkilerini detaylı olarak inceledik.

Çalışmamızda öncelikle floropirimidin tedavisine cevap olarak gözlenen yan etkiler ile floropirimidin metabolizmasında görev alan *DPYD*, *MTHFR*, *TYMS* varyasyonlarının Türk toplumundaki ilişkilerini ele aldık. Analizlerimiz sonucunda çalışma grubumuzda DPD geninde fonksiyon kaybı ile sonuçlanan *DPYD* *13 polimorfizmi varyant alleli tespit edilmediğinden ve *DPYD* *2 polimorfizmi varyant alleli nadir gözlemlendiğinden dolayı floropirimidin kaynaklı seviye 5 yan etkiler ve ölümler gözlenmemiştir. *DPYD* 496A>G polimorfizmi G allelinin floropirimidin kullanımı kaynaklı şiddetli yan etkilere karşı koruyucu rol üstlenebileceğini tespit ettik. *DPYD* 496A>G polimorfizmi fonksiyonel bir varyasyon olarak kabul edilse de, 5-FU metabolizması üzerindeki etkisi yeterli ikna edici veri bulunmadığından halen tartışmalıdır. Bu nedenle çalışmamızdan elde edilen sonucun *DPYD* 496A>G polimorfizminin sınıflandırılmasında literatüre katkı sağlayacağına inanıyoruz.

Araştırmamızda ayrıca *DPYD* 496AG+GG genotipleri ile sol kolon kanseri ve azalan metastaz riski arasında dikkate değer bir ilişki tespit ettik. *DPYD* 496A>G polimorfizminin yanı sıra *DPYD* 85T>C polimorfizmini ise KRK prognozu ile yakın ilişkili bulduk. Ancak bu sonuçların kesinliğine yönelik daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu kaçınılmaz bir gerçektir. Ayrıca Türk toplumunda *DPYD*, *MTHFR* ve *TYMS* polimorfizmlerini geniş bir yelpazede araştıran çok sayıda çalışma bulunmadığından, sonuçlarımızın literatüre yeni bilgiler katacağını düşünüyoruz.

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMG) sürecinde rol alan kilit moleküller, malign fenotipin ortaya çıkmasından sorumlu olan metastazı tetikleyici etkilerinden dolayı hem metastaz

araştırmalarında hem de yeni terapötik hedef arayışlarında gittikçe daha fazla yere sahip olmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda EMG’de rol alan ve birlikte ve/veya ayrı olarak işlevsel LOXL2 ve SNAI1 proteinlerini kodlayan DNA bölgelerindeki polimorfizmlerin KKK ile ilişkilerini inceleyerek araştırmalara katkıda bulunduk. Literatürde *LOXL2* rs6999447 ve *SNAI1* rs6125849 polimorfizmlerinin gen anlatımlarına ve kanser süreçlerine olan etkisi ile ilgili henüz yeterli ve açık bir veri bulunmamakta olup, özellikle kanser çalışmalarında yerini daha yeni almaktadır. Bizim çalışmamızda dahil olmak üzere yapılan sınırlı sayıdaki çalışmaların sonuçlarına göre *SNAI1* rs6125849 polimorfizminin karsinogeneizde önemli bir rolü olduğunu düşüncesindeyiz. Ancak, rs6125849 varyasyonunun işlevinin anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalar gerektiği açıktır. *SNAI1* rs6125849 A alleli ile metastaz arasındaki ilişki her ne kadar araştırmamızın limitasyonlarından dolayı validasyona ihtiyaç duysa da bu konuda öncül sonuçlar elde ettiğimizi düşünüyoruz. Aynı zamanda çalışmamız *LOXL2* rs6999447 ile *SNAI1* rs6125849 polimorfizmlerinin metastatik fenotiple sonuçlanan sinerjik etkisini ilk kez ortaya koyan çalışma olası açısından önemlidir.

PD-1 ve PDL-1, tümöre karşı oluşturulan bağışıklık tepkisi, kansere yatkınlık ve prognozda dahil oldukları görevlerden dolayı kanser gelişiminde önemli genetik risk faktörleri olarak kabul edilmektedirler. Tümör hücrelerine karşı anti tümör cevabın oluşturulmasında görev alan bu moleküller aynı zamanda tümör hücreleri tarafından manipüle edilerek tümör bağışıklığını etkilediklerinden dolayı son yıllarda yeni tedavi yaklaşımlarının hedefleri olmuşlardır. Ancak hala PD-1 ve PDL-1 protein işlevlerinin kendilerini kodlayan DNA bölgelerindeki varyasyonlardan nasıl etkilendiği tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu sebeple araştırmamızda kritik bölgelerde yer alan bazı *PD-1* ve *PDL-1* polimorfizmlerinin KKK etiyojindeki ve malignitesindeki etkilerini inceledik. Bulgularımıza göre, *PD-1* rs36084323 CT, *PD-1* rs7421861 GA ve *PDL-1* rs2282055 GG genotipleri KKK gelişimini etkileyen genetik birer risk faktörleridir. *PDL-1* rs822336 G>C polimorfizmi KKK prognozunda; *PDL-1* rs2282055 T>G polimorfizmi ise hem KKK riskinde hem de prognozunda rol oynamaktadır. Bulgularımız *PD-1* ve *PDL-1* polimorfizmlerinin KKK riski ve prognozunda önemli bir role sahip olduğunu açıkça göstermekte olup aynı zamanda *PD-1* ve *PDL-1* polimorfizmlerinin KKK riski ve klinik sonuçları üzerindeki etkilerini aydınlatmaya ilişkin yeni araştırmalara teşvik edici niteliktedir.

Tümör anjiyogenezi neoplastik hücrelerin bulundukları dokulardan kan damarları aracılığıyla yeni metastatik nişlere geçişlerine imkan sağlayan, çok sayıda molekül ve sinyalizasyon ile kontrol edilen karmaşık bir süreçtir. VEGF-A ise tümör anjiyogenezinde yeni kan damarlarının oluşumunda rol alan temel moleküllerden birisidir. Birçok çalışmada VEGF-A ile tümör malignitesi arasındaki ilişki irdelenmiştir. Bizde çalışmamızda Türk toplumunda KRK gelişiminde ve prognozunda *VEGF-A* geninde yer alan spesifik varyasyonların etkilerini inceledik. Buna göre *VEGF-A* +405G>C polimorfizmini primer tümör lokalizasyonu ile *VEGF-A* -460C>T polimorfizmini ise KRK karaciğer metastazı ile ilişkili bulduk. Ayrıca *VEGF-A* +405G>C polimorfizminin VEGF-A inhibitörü olan bevasizumab tedavisi cevabı ile ilişkili olabileceğini tespit ettik. Elde ettiğimiz sonuçlar *VEGF-A* polimorfizmlerinin yalnızca KRK gelişiminde değil aynı zamanda anti-VEGF tedavisine verilen cevapta da etkili olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak, her ne kadar çalışmamız örnek sayısının azlığı, homojen olmayan terapi rejimleri, aktivite skoru, tümör nodül metastaz seviyeleri, MSI verileri gibi elde edilemeyen bazı klinik ve genetik veriler gibi limitasyonlar içerse de araştırmamızda KRK etiyojisi ve malignitesinde rol oynayan bazı genetik etkileşimleri ve yeni potansiyel terapötik hedefleri tespit etmekle kalmayıp uygulanan tedavilerin cevabını etkileyen varyasyonları da ortaya çıkarak, klinik pratikte izlenen terapötik seçeneklerin iyileştirilmesine katkı sağlayacak veriler elde etmeyi başardık. Elde ettiğimiz sonuçların KRK'nın moleküler genetik arka planının anlaşılmasına katkı sağlayacağını düşünüyoruz. Ancak yine de sonuçlarımızın gerek daha geniş popülasyonlarda gerekse hücre düzeyinde kapsamlı in vivo ve in vitro ileri çalışmalar ile desteklenmesi gerektiğini düşünüyoruz.

5. KAYNAKLAR

- Abelson, A. K., Johansson, C. M., Kozyrev, S. V., Kristjansdottir, H., Gunnarsson, I., Svenungsson, E., ... & Alarcón-Riquelme, M. E. (2007). No evidence of association between genetic variants of the PDCD1 ligands and SLE. *Genes & Immunity*, 8(1), 69-74.
- Abushullaih, S., Saad, E. D., Munsell, M., & Hoff, P. M. (2002). Incidence and severity of hand-foot syndrome in colorectal cancer patients treated with capecitabine: a single-institution experience. *Cancer investigation*, 20(1), 3-10.
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., & Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 114(8), 1537-1544.
- Al-Ansari, S., Zecha, J. A., Barasch, A., de Lange, J., Rozema, F. R., & Raber-Durlacher, J. E. (2015). Oral mucositis induced by anticancer therapies. *Current oral health reports*, 2(4), 202-211.
- Alcindor, T., & Beauger, N. (2011). Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current oncology*, 18(1), 18-25.
- Al-Habboubi, H. H., Mahdi, N., Abu-Hijleh, T. M., Abu-Hijleh, F. M., Sater, M. S., & Almawi, W. Y. (2012). The relation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms on VEGF levels and the risk of vasoocclusive crisis in sickle cell disease. *European journal of haematology*, 89(5), 403-409.
- Al-Habboubi, H. H., Sater, M. S., Almawi, A. W., Al-Khateeb, G. M., & Almawi, W. Y. (2011). Contribution of VEGF polymorphisms to variation in VEGF serum levels in a healthy population. *Eur Cytokine Netw*, 22(3), 154-158.
- Alsanosi, SM., Skiffington, C., Padmanabhan, S. (2014). Chapter 17— pharmacokinetic pharmacogenomics. *Handbook Pharmacogenomics Stratified Med* 341-364
- Alsheridah, N., & Akhtar, S. (2018). Diet, obesity and colorectal carcinoma risk: results from a national cancer registry-based middle-eastern study. *BMC cancer*, 18(1), 1-10.
- Altomare, D. F., Rotelli, M. T., Pentimone, A., Rossiello, M. R., Martinelli, E., Guglielmi, A., ... & Semeraro, N. (2007). Tissue factor and vascular endothelial growth

factor expression in colorectal cancer: relation with cancer recurrence. *Colorectal Disease*, 9(2), 133-138.

Amirfallah, A., Kocal, G., Unal, O., Ellidokuz, H., Oztop, I., & Basbinar, Y. (2018). DPYD, TYMS and MTHFR genes polymorphism frequencies in a series of Turkish colorectal cancer patients. *J Pers Med*, 8(4), 45.

Amstutz, U., Henricks, L. M., Offer, S. M., Barbarino, J., Schellens, J. H., Swen, J. J., ... & Schwab, M. (2018). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing: 2017 update. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 103(2), 210-216.

Antonacopoulou, A. G., Kottorou, A. E., Dimitrakopoulos, F. I. D., Triantafyllia, V., Marousi, S., Koutras, A., & Kalofonos, H. P. (2012). VEGF polymorphisms may be associated with susceptibility to colorectal cancer: A case-control study. *Cancer Biomarkers*, 10(5), 213-217.

Araghi, M., Soerjomataram, I., Jenkins, M., Brierley, J., Morris, E., Bray, F., & Arnold, M. (2019). Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035. *International journal of cancer*, 144(12), 2992-3000.

Arnold, D., Lueza, B., Douillard, J. Y., Peeters, M., Lenz, H. J., Venook, A., ... & Ciardiello, F. (2017b). Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Annals of oncology*, 28(8), 1713-1729.

Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017a). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691.

Awata, T., Inoue, K., Kurihara, S., Ohkubo, T., Watanabe, M., Inukai, K., ... & Katayama, S. (2002). A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(5), 1635-1639.

Azimirad, M., Rostami-Nejad, M., Rostami, K., Naji, T., & Zali, M. R. (2015). The susceptibility of celiac disease intestinal microbiota to *Clostridium difficile*

infection. *Official journal of the American College of Gastroenterology*| *ACG*, 110(12), 1740-1741.

Bagley, P. J., & Selhub, J. (1998). A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(22), 13217-13220.

Bak, S. T., Sakellariou, D., & Pena-Diaz, J. (2014). The dual nature of mismatch repair as antimutator and mutator: for better or for worse. *Frontiers in genetics*, 5, 287.

Ballas, Z. K. (2018). The 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine: an exemplar of bench to bedside in immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(6), 1752-1753.

Banyard, J., & Bielenberg, D. R. (2015). The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connective tissue research*, 56(5), 403-413.

Bao, L., Syed, R., & Aloahd, M. S. (2019). Analysis of VEGF gene polymorphisms and serum VEGF protein levels contribution in polycystic ovary syndrome of patients. *Molecular biology reports*, 46(6), 5821-5829.

Baralle, D., & Baralle, M. (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of medical genetics*, 42(10), 737-748.

Baraniskin, A., Buchberger, B., Pox, C., Graeven, U., Holch, J. W., Schmiegel, W., & Heinemann, V. (2019). Efficacy of bevacizumab in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer*, 106, 37-44.

Barault, L., Charon-Barra, C., Jooste, V., De La Vega, M. F., Martin, L., Roignot, P., ... & Piard, F. (2008). Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer research*, 68(20), 8541-8546.

Bariol, C., Suter, C., Cheong, K., Ku, S. L., Meagher, A., Hawkins, N., & Ward, R. (2003). The relationship between hypomethylation and CpG island methylation in colorectal neoplasia. *The American journal of pathology*, 162(4), 1361-1371.

- Barker, H. E., Chang, J., Cox, T. R., Lang, G., Bird, D., Nicolau, M., ... & Erler, J. T. (2011). LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer research*, 71(5), 1561-1572.
- Barker, H. E., Cox, T. R., & Erler, J. T. (2012). The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(8), 540-552.
- Barrallo-Gimeno, A., & Nieto, M. A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, 132(14), 3151-3161.
- Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., & De Herreros, A. G. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature cell biology*, 2(2), 84-89.
- Beggs, A. D., Latchford, A. R., Vasen, H. F., Moslein, G., Alonso, A., Aretz, S., ... & Hodgson, S. V. (2010). Peutz–Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut*, 59(7), 975-986.
- Behrens, J., Löwrick, O., Klein-Hitpass, L., & Birchmeier, W. (1991). The E-cadherin promoter: functional analysis of a GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(24), 11495-11499.
- Bendardaf, R., Buhmeida, A., Hilska, M., Laato, M., Syrjänen, S., Syrjänen, K., ... & Pyrhönen, S. (2008). VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage, and long-term disease-specific survival. *Anticancer research*, 28(6B), 3865-3870.
- Bendardaf, R., El-Serafi, A., Syrjänen, K., Collan, Y., & Pyrhönen, S. (2017). The effect of vascular endothelial growth factor-1 expression on survival of advanced colorectal cancer patients. *Libyan Journal of Medicine*, 12(1).
- Benedix, F., Kube, R., Meyer, F., Schmidt, U., Gastinger, I., Lippert, H., & Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group. (2010). Comparison of 17,641 patients with right-and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Diseases of the Colon & Rectum*, 53(1), 57-64.

- Benoit, T., Keller, E. X., Wolfsgruber, P., Hermanns, T., Günthart, M., Banzola, I., ... & Poyet, C. (2015). High VEGF-D and low MMP-2 serum levels predict nodal-positive disease in invasive bladder cancer. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 21, 2266.
- Berger, K. N., & Pu, J. J. (2018). PD-1 pathway and its clinical application: A 20 year journey after discovery of the complete human PD-1 gene. *Gene*, 638, 20-25.
- Berntsson, J., Eberhard, J., Nodin, B., Leandersson, K., Larsson, A. H., & Jirström, K. (2018). Expression of programmed cell death protein 1 (PD-1) and its ligand PD-L1 in colorectal cancer: relationship with sidedness and prognosis. *Oncoimmunology*, 7(8), e1465165
- Bian, B., Fanale, D., Dusetti, N., Roque, J., Pastor, S., Chretien, A. S., ... & Iovanna, J. (2019). Prognostic significance of circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1 and BTLA in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology*, 8(4), e1561120.
- Birchmeier, W., Behrens, J., Weidner, K. M., Frixen, U. H., & Schipper, J. (1991). Dominant and recessive genes involved in tumor cell invasion. *Current opinion in cell biology*, 3(5), 832-840.
- Bisgaard, M. L., Fenger, K., Bülow, S., Niebuhr, E., & Mohr, J. (1994). Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Human mutation*, 3(2), 121-125.
- Bishehsari, F., Magno, E., Swanson, G., Desai, V., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., & Keshavarzian, A. (2017). Alcohol and gut-derived inflammation. *Alcohol research: current reviews*, 38(2), 163.
- Blanco, M. J., Moreno-Bueno, G., Sarrio, D., Locascio, A., Cano, A., Palacios, J., & Nieto, M. A. (2002). Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*, 21(20), 3241-3246.
- Blank, C., Gajewski, T. F., & Mackensen, A. (2005). Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 54(4), 307-314.

- Blehschmidt, K., Sassen, S., Schmalfeldt, B., Schuster, T., Höfler, H., & Becker, K. F. (2008). The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients. *British journal of cancer*, 98(2), 489-495.
- Bogaert, J., & Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of gastroenterology*, 27(1), 9.
- Boisdron-Celle, M., Remaud, G., Traore, S., Poirier, A. L., Gamelin, L., Morel, A., & Gamelin, E. (2007). 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer letters*, 249(2), 271-282.
- Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073-2087.
- Bolós, V., Peinado, H., Pérez-Moreno, M. A., Fraga, M. F., Esteller, M., & Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of cell science*, 116(3), 499-511.
- Bosetti, C., Levi, F., Rosato, V., Bertuccio, P., Lucchini, F., Negri, E., & La Vecchia, C. (2011). Recent trends in colorectal cancer mortality in Europe. *International journal of cancer*, 129(1), 180-191.
- Botrel, T. E. A., de Oliveira Clark, L. G., Paladini, L., & Clark, O. A. C. (2016). Efficacy and safety of bevacizumab plus chemotherapy compared to chemotherapy alone in previously untreated advanced or metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC cancer*, 16(1), 1-19.
- Boussiotis, V. A. (2016). Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway. *New England Journal of Medicine*, 375(18), 1767-1778.
- Boussiotis, V. A., Chatterjee, P., & Li, L. (2014). Biochemical signaling of PD-1 on T cells and its functional implications. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 20(4), 265.
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., ... & Wigginton, J. M. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2455-2465.

- Bray, L. J., Hutmacher, D. W., & Bock, N. (2019). Addressing patient specificity in the engineering of tumor models. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 217.
- Breivik, J., Lothe, R. A., Meling, G. I., Rognum, T. O., Børresen-Dale, A. L., & Gaudernack, G. (1997). Different genetic pathways to proximal and distal colorectal cancer influenced by sex-related factors. *International journal of cancer*, 74(6), 664-669.
- Brulé, S. Y., Jonker, D. J., Karapetis, C. S., O'Callaghan, C. J., Moore, M. J., Wong, R., ... & Goodwin, R. A. (2015). Location of colon cancer (right-sided versus left-sided) as a prognostic factor and a predictor of benefit from cetuximab in NCIC CO. 17. *European journal of cancer*, 51(11), 1405-1414.
- Bufill, J. A. (1990). Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Annals of internal medicine*, 113(10), 779-788.
- Bukhari, N., Alshangiti, A., Tashkandi, E., Algarni, M., Al-Shamsi, H. O., & Al-Khallaf, H. (2021). Fluoropyrimidine-Induced Severe Toxicities Associated with Rare DPYD Polymorphisms: Case Series from Saudi Arabia and a Review of the Literature. *Clinics and Practice*, 11(3), 467-471.
- Bultman, S. J. (2017). Interplay between diet, gut microbiota, epigenetic events, and colorectal cancer. *Molecular nutrition & food research*, 61(1), 1500902.
- Cai, S., Li, Y., Ding, Y., Chen, K., & Jin, M. (2014). Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis. *European Journal of Cancer Prevention*, 23(6), 532-539.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., ... & Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology*, 2(2), 76-83.
- Capitain, O., Boisdron-Celle, M., Poirier, A. L., Abadie-Lacourtoisie, S., Morel, A., & Gamelin, E. (2008). The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J*, 8(4), 256
- Carmeliet, P. (1999). Controlling the cellular brakes. *Nature*, 401(6754), 657-658.

- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, 6(4), 389-395.
- Catena, R., Larzabal, L., Larrayoz, M., Molina, E., Hermida, J., Agorreta, J., ... & Calvo, A. (2010). VEGF 121 b and VEGF 165 b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Molecular cancer*, 9(1), 1-14.
- Cebrià-Costa, J. P., Pascual-Reguant, L., Gonzalez-Perez, A., Serra-Bardenys, G., Querol, J., Cosín, M., ... & Peiró, S. (2020). LOXL2-mediated H3K4 oxidation reduces chromatin accessibility in triple-negative breast cancer cells. *Oncogene*, 39(1), 79-121.
- Ceeraz, S., Nowak, E. C., & Noelle, R. J. (2013). B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in immunology*, 34(11), 556-563.
- Chae, Y. S., Kim, J. G., Sohn, S. K., Cho, Y. Y., Ahn, B. M., Moon, J. H., ... & Jun, S. H. (2008). Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of colorectal cancer. *Journal of Korean medical science*, 23(3), 421-427.
- Chan, C. W., Chang, A. M., Molassiotis, A., Lee, I. Y., & Lee, G. C. (2003). Oral complications in Chinese cancer patients undergoing chemotherapy. *Supportive care in cancer*, 11(1), 48-55.
- Chang, C. T., Ho, T. Y., Lin, H., Liang, J. A., Huang, H. C., Li, C. C., ... & Hsiang, C. Y. (2012). 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PloS one*, 7(3), e31808.
- Chatenoud, L., Bertuccio, P., Bosetti, C., Malvezzi, M., Levi, F., Negri, E., & La Vecchia, C. (2014). Trends in mortality from major cancers in the Americas: 1980–2010. *Annals of oncology*, 25(9), 1843-1853.
- Chen, D., Jansson, A., Sim, D., Larsson, A., & Nordlund, P. (2017). Structural analyses of human thymidylate synthase reveal a site that may control conformational switching between active and inactive states. *Journal of Biological Chemistry*, 292(32), 13449-13458.
- Chen, J., Jiang, C. C., Jin, L., & Zhang, X. D. (2016). Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Annals of oncology*, 27(3), 409-416.

- Chen, K. H., Shao, Y. Y., Chen, H. M., Lin, Y. L., Lin, Z. Z., Lai, M. S., ... & Yeh, K. H. (2016). Primary tumor site is a useful predictor of cetuximab efficacy in the third-line or salvage treatment of KRAS wild-type (exon 2 non-mutant) metastatic colorectal cancer: a nationwide cohort study. *BMC cancer*, 16(1), 1-8.
- Chen, L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature Reviews Immunology*, 4(5), 336-347.
- Cheng, C. W., Wu, P. E., Yu, J. C., Huang, C. S., Yue, C. T., Wu, C. W., & Shen, C. Y. (2001). Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene*, 20(29), 3814-3823.
- Cheng, J. Z., Chen, J. J., Xue, K., Wang, Z. G., & Yu, D. (2018). Clinicopathologic and prognostic significance of VEGF, JAK2 and STAT3 in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer cell international*, 18(1), 1-9.
- Choi, J., Chung, T., Rhee, H., Kim, Y. J., Jeon, Y., Yoo, J. E., ... & Park, Y. N. (2019). Increased expression of the matrix-modifying enzyme lysyl oxidase-like 2 in aggressive hepatocellular carcinoma with poor prognosis. *Gut and Liver*, 13(1), 83.
- Chow, E., Meldrum, C. J., Crooks, R., Macrae, F., Spigelman, A. D., & Scott, R. J. (2006). An updated mutation spectrum in an Australian series of PJS patients provides further evidence for only one gene locus. *Clinical genetics*, 70(5), 409-414.
- Christofori, G. (2006). New signals from the invasive front. *Nature*, 441(7092), 444-450.
- Ciombor, K. K., Berlin, J., & Chan, E. (2013). Aflibercept. *Clinical Cancer Research*, 19(8), 1920-1925.
- Cohen, V., Panet-Raymond, V., Sabbaghian, N., Morin, I., Batist, G., & Rozen, R. (2003). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clinical cancer research*, 9(5), 1611-1615.
- Collie-Duguid, E. S. R., Etienne, M. C., Milano, G., & McLeod, H. L. (2000). Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics and Genomics*, 10(3), 217-223.

- Côme, C., Magnino, F., Bibeau, F., De Santa Barbara, P., Becker, K. F., Theillet, C., & Savagner, P. (2006). Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clinical cancer research*, 12(18), 5395-5402.
- Coskun, U., Günel, N., Toruner, F. B., Sancak, B., Onuk, E., Bayram, O., ... & Ozkan, S. (2003). Serum leptin, prolactin and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with breast cancer. *Neoplasma*, 50(1), 41-46.
- Coussens, L. M., Zitvogel, L., & Palucka, A. K. (2013). Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet?. *Science*, 339(6117), 286-291.
- CPIC 2020. Guideline for Fluoropyrimidines and DPYD. <https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/> (Kasım 2021).
- Csiszar, K. (2001). Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family.
- CTCAE, 2017. U.S. Department of Health and Human Services. Common terminology criteria for adverse events (CTCAE), version 5 (November, 2017).
- Cuevas, E. P., Moreno-Bueno, G., Canesin, G., Santos, V., Portillo, F., & Cano, A. (2014). LOXL2 catalytically inactive mutants mediate epithelial-to-mesenchymal transition. *Biology open*, 3(2), 129-137.
- Cui, H., Onyango, P., Brandenburg, S., Wu, Y., Hsieh, C. L., & Feinberg, A. P. (2002). Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer research*, 62(22), 6442-6446.
- Cui, W., Li, F., Yuan, Q., Chen, G., Chen, C., & Yu, B. (2017). Role of VEGFA gene polymorphisms in colorectal cancer patients who treated with bevacizumab. *Oncotarget*, 8(62), 105472.
- Cui, X., Wang, G., Shen, W., Huang, Z., He, H., & Cui, L. (2018). Lysyl oxidase-like 2 is highly expressed in colorectal cancer cells and promotes the development of colorectal cancer. *Oncology reports*, 40(2), 932-942.
- Cunningham, J. M., Kim, C. Y., Christensen, E. R., Tester, D. J., Parc, Y., Burgart, L. J., ... & Thibodeau, S. N. (2001). The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *The American Journal of Human Genetics*, 69(4), 780-790.

- D'Haene, N., Koopmansch, C., Van Eycke, Y. R., Hulet, F., Allard, J., Bouri, S., ... & Salmon, I. (2018). The prognostic value of the combination of low VEGFR-1 and High VEGFR-2 expression in endothelial cells of colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3536.
- Da, L. S., Zhang, Y., Zhang, C. J., Bu, L. J., Zhu, Y. Z., Ma, T., & Gu, K. S. (2018). The PD-1 rs36084323 A> G polymorphism decrease cancer risk in Asian: A meta-analysis. *Pathology-Research and Practice*, 214(11), 1758-1764.
- Daher, G. C., Harris, B. E., & Diasio, R. B. (1990). Metabolism of pyrimidine analogues and their nucleosides. *Pharmacology & therapeutics*, 48(2), 189-222.
- Dalavi, S. B., Vedpalsingh, T. H., Bankar, S. S., Ahmed, M. H. S., & Bhosale, D. N. (2015). Familial Adenomatous Polyposis (FAP)—A Case Study and Review of Literature. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 9(3), PD05.
- Danenberg, P. V., & Danenberg, K. D. (1978). Effect of 5, 10-methylenetetrahydrofolate on the dissociation of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate from thymidylate synthetase: evidence for an ordered mechanism. *Biochemistry*, 17(19), 4018-4024.
- Dassoulas, K., Gazouli, M., Rizos, S., Theodoropoulos, G., Christoni, Z., Nikiteas, N., & Karakitsos, P. (2009). Common polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and colorectal cancer development, prognosis, and survival. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 48(6), 563-569.
- de Freitas Silva, B. S., Yamamoto-Silva, F. P., Pontes, H. A. R., & Pinto Júnior, D. D. S. (2014). E-cadherin downregulation and T wist overexpression since early stages of oral carcinogenesis. *Journal of oral pathology & medicine*, 43(2), 125-131.
- de GeusSWL, V., MieogJSD, P., van de VeldeCJH, B., & Kuppen, P. J. K. (2021). Prognostic significance of angiogenic growth factors in pancreatic cancer. *Emerging Molecular Biomarkers and Treatment Strategies in Resectable Pancreatic Cancer*, 41.
- De Mattia, E., & Toffoli, G. (2009). C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *European journal of cancer*, 45(8), 1333-1351.

- de Moraes, E. F., de Pontes Santos, H. B., Cavalcante, I. L., Rabenhorst, S. H. B., Dos Santos, J. N., Galvão, H. C., & de Almeida Freitas, R. (2019). Twist and E-cadherin deregulation might predict poor prognosis in lower lip squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 127(4), 318-329.
- De Re, V., Tornesello, M. L., De Zorzi, M., Caggiari, L., Pezzuto, F., Leone, P., ... & Buonaguro, F. M. (2019). Clinical significance of polymorphisms in immune response genes in hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *Frontiers in microbiology*, 10, 475.
- Deenen, M. J., Meulendijks, D., Cats, A., Sechterberger, M. K., Severens, J. L., Boot, H., ... & Schellens, J. H. (2016). Upfront genotyping of DPYD* 2A to individualize fluoropyrimidine therapy: a safety and cost analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 34(3), 227-34.
- Deenen, M. J., Tol, J., Burylo, A. M., Doodeman, V. D., De Boer, A., Vincent, A., ... & Cats, A. (2011). Relationship between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in DPYD and toxicity and efficacy of capecitabine in advanced colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(10), 3455-3468.
- Del Re, M., Cinieri, S., Michelucci, A., Salvadori, S., Loupakis, F., Schirripa, M., ... & Danesi, R. (2019). DPYD* 6 plays an important role in fluoropyrimidine toxicity in addition to DPYD* 2A and c. 2846A> T: a comprehensive analysis in 1254 patients. *The pharmacogenomics journal*, 19(6), 556-563.
- Delattre, O., Law, D. J., Remvikos, Y., Sastre, X., Feinberg, A. P., Olschwang, S., ... & Thomas, G. (1989). Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *The Lancet*, 334(8659), 353-356.
- Deng, Y., Chakraborty, P., Jolly, M. K., & Levine, H. (2021). A theoretical approach to coupling the epithelial-mesenchymal transition (EMT) to extracellular matrix (ECM) stiffness via LOXL2. *Cancers*, 13(7), 1609.
- Dermani, F. K., Samadi, P., Rahmani, G., Kohlan, A. K., & Najafi, R. (2019). PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. *Journal of cellular physiology*, 234(2), 1313-1325.
- Derwinger, K., & Gustavsson, B. (2011). Variations in demography and prognosis by colon cancer location. *Anticancer research*, 31(6), 2347-2350.

- Derwinger, K., Wettergren, Y., Odin, E., Carlsson, G., & Gustavsson, B. (2009). A study of the MTHFR gene polymorphism C677T in colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer*, 8(1), 43-48.
- Di Salvatore, M., Pietrantonio, F., Orlandi, A., Del Re, M., Berenato, R., Rossi, E., ... & Barone, C. (2017). IL-8 and eNOS polymorphisms predict bevacizumab-based first line treatment outcomes in RAS mutant metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget*, 8(10), 16887.
- Diasio, R. B. (1998). The role of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) modulation in 5-FU pharmacology. *Oncology (Williston Park, NY)*, 12(10 Suppl 7), 23-27.
- Dimova, I., Popivanov, G., & Djonov, V. (2014). Angiogenesis in cancer-general pathways and their therapeutic implications. *Jbuon*, 19(1), 15-21.
- Dinami, R., Porru, M., Amoreo, C. A., Sperduti, I., Mottolise, M., Buglioni, S., ... & Zizza, P. (2020). TRF2 and VEGF-A: an unknown relationship with prognostic impact on survival of colorectal cancer patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), 1-13.
- Dinis-Oliveira, R. (2016). Oxidative and non-oxidative metabolomics of ethanol. *Current drug metabolism*, 17(4), 327-335.
- Dirican, A., Varol, U., Kucukzeybek, Y., Alacacioglu, A., Erten, C., Somali, I., ... & Tarhan, M. O. (2014). Treatment of metastatic colorectal cancer with or without bevacizumab: can the neutrophil/lymphocyte ratio predict the efficiency of bevacizumab?. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(12), 4781-4786.
- do Espírito Santo, G. F., Galera, B. B., Duarte, E. C., Chen, E. S., Azis, L., Damazo, A. S., ... & Waisberg, J. (2017). Prognostic significance of vascular endothelial growth factor polymorphisms in colorectal cancer patients. *World journal of gastrointestinal oncology*, 9(2), 78.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., & Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature medicine*, 5(12), 1365-1369.
- Dong, W., Gong, M., Shi, Z., Xiao, J., Zhang, J., & Peng, J. (2016). Programmed cell death-1 polymorphisms decrease the cancer risk: a meta-analysis involving twelve case-control studies. *PloS one*, 11(3), e0152448.

- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(2), 69-84.
- Douillard, J. Y., Hoff, P. M., Skillings, J. R., Eisenberg, P., Davidson, N., Harper, P., ... & Benner, S. E. (2002). Multicenter phase III study of uracil/tegafur and oral leucovorin versus fluorouracil and leucovorin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(17), 3605-3616.
- Douillard, J., Cunningham, D., Roth, A. D., Navarro, M., James, R. D., Karasek, P., ... & Rougier, P. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *The Lancet*, 355(9209), 1041-1047.
- Drewes, J. L., Housseau, F., & Sears, C. L. (2016). Sporadic colorectal cancer: microbial contributors to disease prevention, development and therapy. *British journal of cancer*, 115(3), 273-280.
- Droeser, R. A., Hirt, C., Viehl, C. T., Frey, D. M., Nebiker, C., Huber, X., ... & Tornillo, L. (2013). Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *European journal of cancer*, 49(9), 2233-2242.
- Du, W., Zhu, J., Chen, Y., Zeng, Y., Shen, D., Zhang, N., ... & Huang, J. A. (2017). Variant SNPs at the microRNA complementary site in the B7-H1 3'-untranslated region increase the risk of non-small cell lung cancer. *Molecular medicine reports*, 16(3), 2682-2690.
- Dumitru, C. A., Lang, S., & Brandau, S. (2013, June). Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 23, No. 3, pp. 141-148). Academic Press.
- Dvorak, H. F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of clinical oncology*, 20(21), 4368-4380.
- East, J. E., Saunders, B. P., & Jass, J. R. (2008). Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural

history, and clinical management. *Gastroenterology clinics of North America*, 37(1), 25-46.

Eelen, G., de Zeeuw, P., Simons, M., & Carmeliet, P. (2015). Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circulation research*, 116(7), 1231-1244.

Ellis, J. A., & Ong, B. (2017). The MassARRAY® system for targeted SNP genotyping. In *Genotyping* (pp. 77-94). Humana Press, New York, NY.

Ellis, L. M., Takahashi, Y., Liu, W., & Shaheen, R. M. (2000). Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *The oncologist*, 5, 11-15.

Elloul, S., Bukholt Elstrand, M., Nesland, J. M., Tropé, C. G., Kvalheim, G., Goldberg, I., ... & Davidson, B. (2005). Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 103(8), 1631-1643.

Elnatan, J., Goh, H. S., & Smith, D. R. (1996). C-KI-RAS activation and the biological behaviour of proximal and distal colonic adenocarcinomas. *European Journal of Cancer*, 32(3), 491-497.

Elraiyyah, T., Jerde, C. R., Shrestha, S., Wu, R., Nie, Q., Giama, N. H., ... & Diasio, R. B. (2017). Novel deleterious dihydropyrimidine dehydrogenase variants may contribute to 5-fluorouracil sensitivity in an East African population. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 101(3), 382-390.

EMA, Summary of Product Characteristics. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/avastin-epar-product-information_en.pdf (Şubat 2022).

Ensembl-DPYD, 2021. ENSG00000188641. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Variation_Gene/Table?db=core;g=ENSG00000188641;r=1:97077743-97921049 (Şubat 2022).

Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A., & Bluestone, J. A. (2016). CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity*, 44(5), 973-988.

- Ezzeldin, H. H., Lee, A. M., Mattison, L. K., & Diasio, R. B. (2005). Methylation of the DPYD promoter: an alternative mechanism for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in cancer patients. *Clinical cancer research*, 11(24), 8699-8705.
- Fallah, A., Sadeghinia, A., Kahroba, H., Samadi, A., Heidari, H. R., Bradaran, B., ... & Molavi, O. (2019). Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 775-785.
- Falvella, F. S., Cheli, S., Martinetti, A., Mazzali, C., Iacovelli, R., Maggi, C., ... & Pietrantonio, F. (2015). DPD and UGT1A1 deficiency in colorectal cancer patients receiving triplet chemotherapy with fluoropyrimidines, oxaliplatin and irinotecan. *British journal of clinical pharmacology*, 80(3), 581-588.
- Fan, J., Zhang, W., Lei, C., Qiao, B., Liu, Q., Chen, Q., ... & Chen, J. (2015). Vascular endothelial growth factor polymorphisms and lung cancer risk. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(4), 6406.
- Fan, T. P. D., Jagger, R., & Bicknell, R. (1995). Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *Trends in pharmacological sciences*, 16(2), 57-66.
- Fan, Y., Jin, X., Man, C., Gao, Z., & Wang, X. (2017). Meta-analysis of the association between the inflammatory potential of diet and colorectal cancer risk. *Oncotarget*, 8(35), 59592.
- Fan, Z., Zheng, W., Li, H., Wu, W., Liu, X., Sun, Z., ... & Liu, Q. (2020). LOXL2 upregulates hypoxia-inducible factor-1 α signaling through Snail-FBP1 axis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncology reports*, 43(5), 1641-1649.
- Fang, L., Jiang, Y., Yang, Y., Zheng, Y., Zheng, J., Jiang, H., ... & Zhuang, X. (2016). Determining the optimal 5-FU therapeutic dosage in the treatment of colorectal cancer patients. *Oncotarget*, 7(49), 81880.
- Fathi, F., Zamani, B., Piroozmand, A., Mozafarpour, S., Seyedhashemi, E., ArefNezhad, R., & Motedayyen, H. (2021). Programmed cell death 1 (PDCD1) gene haplotypes and susceptibility of patients to basal cell carcinoma. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2047-2052.
- FDA, AVASTIN®Prescribing Information. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_

docs/label/2009/125085s0169lbl.pdf (accessed on 20 March 2020).

Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *cell*, 61(5), 759-767.

Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., ... & Jenab, M. (2011). Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose–response meta-analysis of published studies. *Annals of oncology*, 22(9), 1958-1972.

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, 127(12), 2893-2917.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... & Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1. 0 (2013) Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase N0. 11 (Internet). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

Ferrara, N., & Adamis, A. P. (2016). Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nature reviews Drug discovery*, 15(6), 385-403.

Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*, 9(6), 669-676.

Ferroni, P., Spila, A., Martini, F., D'Alessandro, R., Mariotti, S., Del Monte, G., ... & Roselli, M. (2005). Prognostic value of vascular endothelial growth factor tumor tissue content of colorectal cancer. *Oncology*, 69(2), 145-153.

Fidai, S. S., Sharma, A. E., Johnson, D. N., Segal, J. P., & Lastra, R. R. (2018). Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency as a cause of fatal 5-Fluorouracil toxicity. *Autopsy & case reports*, 8(4).

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New england journal of medicine*, 285(21), 1182-1186.

Folkman, J. (1972). Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Annals of surgery*, 175(3), 409.

Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?. *Nature reviews Drug discovery*, 6(4), 273-286.

Folkman, J. and Shing Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267, 10931-10934.

- Francisco, L. M., Sage, P. T., & Sharpe, A. H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological reviews*, 236(1), 219-242.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., ... & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*, 192(7), 1027-1034.
- Frezzetti, D., Gallo, M., Maiello, M. R., D'Alessio, A., Esposito, C., Chicchinelli, N., ... & De Luca, A. (2017). VEGF as a potential target in lung cancer. Expert opinion on therapeutic targets, 21(10), 959-966.
- Froehlich, T. K., Amstutz, U., Aebi, S., Joerger, M., & Largiadér, C. R. (2015). Clinical importance of risk variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene for the prediction of early-onset fluoropyrimidine toxicity. *International journal of cancer*, 136(3), 730-739.
- Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., ... & Rozen, R. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature genetics*, 10(1), 111-113.
- Fu, B. H., Fu, Z. Z., Meng, W., Gu, T., Sun, X. D., & Zhang, Z. (2015). Platelet VEGF and serum TGF- β 1 levels predict chemotherapy response in non-small cell lung cancer patients. *Tumor Biology*, 36(8), 6477-6483.
- Gabriel, S., Ziaugra, L., & Tabbaa, D. (2009). SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Current protocols in human genetics*, 60(1), 2-12.
- Gaibar Alonso, M., Galán Burgos, M., Romero Lorca, A., Antón, B., Malón, D., Moreno, A., ... & Novillo Villajos, A. (2021). Genetic Variants of ANGPT1, CD39, FGF2 and MMP9 Linked to Clinical Outcome of Bevacizumab Plus Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1381.
- Gazave, E., Marqués-Bonet, T., Fernando, O., Charlesworth, B., & Navarro, A. (2007). Patterns and rates of intron divergence between humans and chimpanzees. *Genome biology*, 8(2), 1-13.
- Ge, J., Zhu, L., Zhou, J., Li, G., Li, Y., Li, S., ... & Cui, B. (2015). Association between co-inhibitory molecule gene tagging single nucleotide polymorphisms and the risk of

colorectal cancer in Chinese. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 141(9), 1533-1544.

Gentile, G., Botticelli, A., Lionetto, L., Mazzuca, F., Simmaco, M., Marchetti, P., & Borro, M. (2016). Genotype–phenotype correlations in 5-fluorouracil metabolism: a candidate DPYD haplotype to improve toxicity prediction. *Pharmacogenomics J*, 16(4), 320

Gerber, H. P., & Ferrara, N. (2005). Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer research*, 65(3), 671-680.

Ghazi, S., Lindforss, U., Lindberg, G., Berg, E., Lindblom, A., & Papadogiannakis, N. (2012). Analysis of colorectal cancer morphology in relation to sex, age, location, and family history. *Journal of gastroenterology*, 47(6), 619-634.

Gianhecchi, E., Delfino, D. V., & Fierabracci, A. (2013). Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 12(11), 1091-1100.

Gibson, R. J., & Stringer, A. M. (2009). Chemotherapy-induced diarrhoea. *Current opinion in supportive and palliative care*, 3(1), 31-35.

Glimelius, B., Garmo, H., Berglund, Å., Fredriksson, L. A., Berglund, M., Kohnke, H., ... & Wadelius, M. (2011). Prediction of irinotecan and 5-fluorouracil toxicity and response in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J*, 11(1), 61.

Gmeiner, W. H. (2005). Novel chemical strategies for thymidylate synthase inhibition. *Current medicinal chemistry*, 12(2), 191-202.

Gong, M., Dong, W., Shi, Z., Qiu, S., & Yuan, R. (2017). Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and the risk of renal cell carcinoma: Evidence from eight case-control studies. *Oncotarget*, 8(5), 8447.

Goyette, P., Sumner, J. S., Milos, R., Duncan, A. M., Rosenblatt, D. S., Matthews, R. G., & Rozen, R. (1994). Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature genetics*, 7(2), 195-200.

Grady, W. M., & Carethers, J. M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), 1079-1099.

- Graham, M. A., Lockwood, G. F., Greenslade, D., Brienza, S., Bayssas, M., & Gamelin, E. (2000). Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clinical Cancer Research*, 6(4), 1205-1218.
- Grassadonia, A., Di Marino, P., Ficorella, C., Cortellini, A., Cannita, K., Parisi, A., ... & Tinari, N. (2019). Impact of primary tumor location in patients with RAS wild-type metastatic colon cancer treated with first-line chemotherapy plus anti-EGFR or anti-VEGF monoclonal antibodies: a retrospective multicenter study. *Journal of Cancer*, 10(24), 5926.
- Gregory, A. D., & Houghton, A. M. (2011). Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer research*, 71(7), 2411-2416.
- Grenda, A., Krawczyk, P., Błach, J., Chmielewska, I., Kubiowski, T., Kieszko, S., ... & Milanowski, J. (2021b). Tissue MicroRNA Expression as a Predictor of Response to Immunotherapy in NSCLC Patients. *Frontiers in Oncology*, 10, 3267.
- Grenda, A., Krawczyk, P., Kucharczyk, T., Błach, J., Reszka, K., Chmielewska, I., ... & Milanowski, J. (2021a). Impact of copy number variant and single nucleotide polymorphism of the programmed death-ligand 1 gene, programmed death-ligand 1 protein expression and therapy regimens on overall survival in a large group of Caucasian patients with non-small cell lung carcinoma. *Oncology Letters*, 21(6), 1-12.
- Gross, E., Busse, B., Riemenschneider, M., Neubauer, S., Seck, K., Klein, H. G., ... & Meindl, A. (2008). Strong association of a common dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphism with fluoropyrimidine-related toxicity in cancer patients. *PloS one*, 3(12), e4003.
- Gross, E., Ullrich, T., Seck, K., Mueller, V., Wit, M. D., Schilling, C. V., ... & Kiechle, M. (2003). Detailed analysis of five mutations in dihydropyrimidine dehydrogenase detected in cancer patients with 5-fluorouracil-related side effects. *Human mutation*, 22(6), 498-498.
- Guenther, B. D., Sheppard, C. A., Tran, P., Rozen, R., Matthews, R. G., & Ludwig, M. L. (1999). The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nature Structural & Molecular Biology*, 6(4), 359

- Guo, Q., Dai, S. B., Shen, F., Yu, D., Shen, S. T., Zhang, Q., ... & Wu, Z. D. (2014). VEGF+ 405G/C (rs2010963) polymorphisms and digestive system cancer risk: a meta-analysis. *Tumor Biology*, 35(5), 4977-4982.
- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679-695.
- Gupta, M. K., & Qin, R. Y. (2003). Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 9(6), 1144.
- Gusella, M., Frigo, A. C., Bolzonella, C., Marinelli, R., Barile, C., Bononi, A., ... & Padrini, R. (2009). Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *British journal of cancer*, 100(10), 1549-1557.
- Hajra, K. M., Ji, X., & Fearon, E. R. (1999). Extinction of E-cadherin expression in breast cancer via a dominant repression pathway acting on proximal promoter elements. *Oncogene*, 18(51), 7274-7279.
- Half, E., Bercovich, D., & Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet journal of rare diseases*, 4(1), 1-23.
- Han, Y., Yu, Z., Wen, S., Zhang, B., Cao, X., & Wang, X. (2012). Prognostic value of chemotherapy-induced neutropenia in early-stage breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 131(2), 483-490.
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell*, 86(3), 353-364.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hansen, T. F., Spindler, K. G., Andersen, R. F., Lindebjerg, J., Brandslund, I., & Jakobsen, A. (2011). The predictive value of genetic variations in the vascular endothelial growth factor A gene in metastatic colorectal cancer. *The pharmacogenomics journal*, 11(1), 53-60.
- Hardy, L. W., Finer-Moore, J. S., Montfort, W. R., Jones, M. O., Santi, D. V., & Stroud, R. M. (1987). Atomic structure of thymidylate synthase: target for rational drug design. *Science*, 235(4787), 448-455.

- Hashemi, M., Karami, S., Sarabandi, S., Moazeni-Roodi, A., Małeck, A., Ghavami, S., & Wiechec, E. (2019). Association between PD-1 and PD-L1 polymorphisms and the risk of cancer: A meta-analysis of case-control studies. *Cancers*, 11(8), 1150.
- Hasina, R., & Lingen, M. W. (2001). Angiogenesis in oral cancer. *Journal of dental education*, 65(11), 1282-1290.
- Hay, E. D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Cells Tissues Organs*, 154(1), 8-20.
- Hearle, N. C. M., Rudd, M. F., Lim, W., Murday, V., Lim, A. G., Phillips, R. K., ... & Houlston, R. S. (2006). Exonic STK11 deletions are not a rare cause of Peutz-Jeghers syndrome. *Journal of medical genetics*, 43(4), e15-e15.
- Heggie, G. D., Sommadossi, J. P., Cross, D. S., Huster, W. J., & Diasio, R. B. (1987). Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer research*, 47(8), 2203-2206.
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., DUSCHINSKY, R., ... & Scheiner, J. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 179(4561), 663-666.
- Hemavathy, K., Ashraf, S. I., & Ip, Y. T. (2000). Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene*, 257(1), 1-12.
- Herranz, N., Dave, N., Millanes-Romero, A., Pascual-Reguant, L., Morey, L., Díaz, V. M., ... & Peiró, S. (2016). Lysyl oxidase-like 2 (LOXL 2) oxidizes trimethylated lysine 4 in histone H3. *The FEBS journal*, 283(23), 4263-4273.
- Hicklin, D. J., & Ellis, L. M. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of clinical oncology*, 23(5), 1011-1027.
- Hong, A., Fogarty, G., & Izard, M. A. (2012). The role of radiation therapy in the management of metastatic melanoma in the brain. *International journal of surgical oncology*, 2012.
- Hori, T. A., Takahashi, E. I., Ayusawa, D., Takeishi, K., Kaneda, S., & Seno, T. (1990). Regional assignment of the human thymidylate synthase (TS) gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic in situ hybridization. *Human genetics*, 85(6), 576-580.

Howell WM, Bateman AC, Turner SJ, Collins A, Theaker JM. Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immunol* 2002;3: 229—32.

Hua, Z., Li, D., Xiang, G., Xu, F., Jie, G., Fu, Z., ... & Li, D. (2011). PD-1 polymorphisms are associated with sporadic breast cancer in Chinese Han population of Northeast China. *Breast cancer research and treatment*, 129(1), 195-201.

Huang, X., Liu, J., Mo, X., Liu, H., Wei, C., Huang, L., ... & Xie, W. (2019). Systematic profiling of alternative splicing events and splicing factors in left-and right-sided colon cancer. *Aging (Albany NY)*, 11(19), 8270.

Huez, I., Bornes, S., Bresson, D., Créancier, L., & Prats, H. (2001). New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Molecular Endocrinology*, 15(12), 2197-2210.

Hughes, L. A., Simons, C. C., van den Brandt, P. A., van Engeland, M., & Weijenberg, M. P. (2017). Lifestyle, diet, and colorectal cancer risk according to (epi) genetic instability: current evidence and future directions of molecular pathological epidemiology. *Current colorectal cancer reports*, 13(6), 455-469.

Huijian, Z. H. A. N. G., Dianwen, L. I. U., Xiaoli, Z. H. O. U., Yonggang, L. I. U., Min, L. I., & Shiju, L. I. U. (2019). The influence of PD-L1 rs2297136 polymorphism on the clinical outcomes of postoperative colorectal cancer patients receiving capecitabine-based adjuvant chemotherapy. *China Oncology*, 29(10), 795-802.

Hullar, M. A., Burnett-Hartman, A. N., & Lampe, J. W. (2014). Gut microbes, diet, and cancer. *Advances in nutrition and cancer*, 377-399..

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., ... & Kabbinavar, F. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England journal of medicine*, 350(23), 2335-2342.

Hutchinson, J. H., Rowbottom, M. W., Lonergan, D., Darlington, J., Prodanovich, P., King, C. D., ... & Bain, G. (2017). Small molecule lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) inhibitors: The identification of an inhibitor selective for LOXL2 over LOX. *ACS medicinal chemistry letters*, 8(4), 423-427.

Iacopetta, B. (2002). Are there two sides to colorectal cancer?. *International journal of cancer*, 101(5), 403-408.

- Iacopetta, B., Heyworth, J., Girschik, J., Grieu, F., Clayforth, C., & Fritschi, L. (2009). The MTHFR C677T and Δ DNMT3B C-149T polymorphisms confer different risks for right-and left-sided colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 125(1), 84-90.
- Inman, B. A., Frigola, X., Dong, H., & Kwon, E. D. (2007). Costimulation, coinhibition and cancer. *Current cancer drug targets*, 7(1), 15-30.
- Innocenti, F., Jiang, C., Sibley, A. B., Etheridge, A. S., Hatch, A. J., Denning, S., ... & Owzar, K. (2018). Genetic variation determines VEGF-A plasma levels in cancer patients. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*, 11(11), 3887-3895.
- Ishizaki, Y., Yukaya, N., Kusuhara, K., Kira, R., Torisu, H., Ihara, K., ... & Hara, T. (2010). PD1 as a common candidate susceptibility gene of subacute sclerosing panencephalitis. *Human genetics*, 127(4), 411-419.
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., & Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), 12293-12297.
- Jakubowska, A., Gronwald, J., Menkiszak, J., Górski, B., Huzarski, T., Byrski, T., ... & Hamann, U. (2008). The VEGF_936_C> T 3' UTR polymorphism reduces BRCA1-associated breast cancer risk in Polish women. *Cancer letters*, 262(1), 71-76.
- James, R., Ramesh, G., Krishnamoorthy, L., Bhagat, R., Chadaga, S., Deshmane, V., & Ramaswamy, G. (2014). Prevalence of + 405G> C, - 1154G> A vascular endothelial growth factor polymorphism in breast cancer. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(1), 21-28.
- Jang, M. J., Jeon, Y. J., Kim, J. W., Cho, Y. K., Lee, S. K., Hwang, S. G., ... & Kim, N. K. (2013a). Association of VEGF and KDR single nucleotide polymorphisms with colorectal cancer susceptibility in Koreans. *Molecular carcinogenesis*, 52(S1), 60-69.

- Jang, M. J., Kim, J. W., Jeon, Y. J., Chong, S. Y., Hong, S. P., Hwang, S. G., ... & Kim, N. K. (2014). Polymorphisms of folate metabolism-related genes and survival of patients with colorectal cancer in the Korean population. *Gene*, 533(2), 558-564.
- Jang, M. J., Kim, J. W., Jeon, Y. J., Chong, S. Y., Oh, D., & Kim, N. K. (2013b). Prognostic significance of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in patients with colorectal cancer. *International journal of clinical oncology*, 18(6), 1032-1041.
- Jannuzzi, A. T., Özhan, G., Yanar, H. T., & Alpertunga, B. (2015). VEGF gene polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 19(3), 133-137.
- Jass, J. R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50(1), 113-130.
- Jaxel, C., Kohn, K. W., Wani, M. C., Wall, M. E., & Pommier, Y. (1989). Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity. *Cancer research*, 49(6), 1465-1469.
- Jayasekara, H., English, D. R., Haydon, A., Hodge, A. M., Lynch, B. M., Rosty, C., ... & MacInnis, R. J. (2018). Associations of alcohol intake, smoking, physical activity and obesity with survival following colorectal cancer diagnosis by stage, anatomic site and tumor molecular subtype. *International journal of cancer*, 142(2), 238-250.
- Jenkins, M. A., Hayashi, S., O'shea, A. M., Burgart, L. J., Smyrk, T. C., Shimizu, D., ... & Colon Cancer Family Registry. (2007). Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology*, 133(1), 48-56.
- Jennings, B. A., Loke, Y. K., Skinner, J., Keane, M., Chu, G. S., Turner, R., ... & Willis, G. (2013). Evaluating predictive pharmacogenetic signatures of adverse events in colorectal cancer patients treated with fluoropyrimidines. *PloS one*, 8(10), e78053.
- Ji, X., Woodard, A. S., Rimm, D. L., & Fearon, E. R. (1997). Transcriptional defects underlie loss of E-cadherin expression in breast cancer. *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*, 8(7), 773-778.

- Jiang, D., Xu, Y. Y., Li, F., Xu, B., & Zhang, X. G. (2014). The role of B7-H1 in gastric carcinoma: clinical significance and related mechanism. *Medical Oncology*, 31(11), 268.
- Joerger, M., Huitema, A. D. R., Boot, H., Cats, A., Doodeman, V. D., Smits, P. H. M., ... & Schellens, J. H. M. (2015). Germline TYMS genotype is highly predictive in patients with metastatic gastrointestinal malignancies receiving capecitabine-based chemotherapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 75(4), 763-772.
- Jones, J. A., Avritscher, E. B., Cooksley, C. D., Michelet, M., Bekele, B. N., & Elting, L. S. (2006). Epidemiology of treatment-associated mucosal injury after treatment with newer regimens for lymphoma, breast, lung, or colorectal cancer. *Supportive care in cancer*, 14(6), 505-515.
- Jourdan-Le Saux, C., Le Saux, O., Donlon, T., Boyd, C. D., & Csiszar, K. (1998). The human lysyl oxidase-related gene (LOXL2) maps between markers D8S280 and D8S278 on chromosome 8p21. 2–p21. 3. *Genomics*, 51(2), 305-307.
- Jourdan-Le Saux, C., Tronecker, H., Bogic, L., Bryant-Greenwood, G. D., Boyd, C. D., & Csiszar, K. (1999). The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 274(18), 12939-12944.
- Jung, M. K., Shin, U. S., Ki, Y. J., Kim, Y. B., Moon, S. M., & Sung, S. J. (2017). Is the location of the tumor another prognostic factor for patients with colon cancer?. *Annals of coloproctology*, 33(6), 210.
- Kajita, M., McClinic, K. N., & Wade, P. A. (2004). Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Molecular and cellular biology*, 24(17), 7559-7566.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2010). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 120(5), 1786-1786.
- Kanat, O., & Ertas, H. (2019). Existing anti-angiogenic therapeutic strategies for patients with metastatic colorectal cancer progressing following first-line bevacizumab-based therapy. *World journal of clinical oncology*, 10(2), 52.

- Kasamatsu, T., Awata, M., Ishihara, R., Murakami, Y., Gotoh, N., Matsumoto, M., ... & Murakami, H. (2020). PDCD1 and PDCD1LG1 polymorphisms affect the susceptibility to multiple myeloma. *Clinical and experimental medicine*, 20(1), 51-62.
- Kashani-Sabet, M. (2010). Tumor progression by immune evasion in melanoma: role of the programmed cell death-1/programmed cell death-1 ligand 1 interaction.
- Kastrinos, F., & Stoffel, E. M. (2014). History, genetics, and strategies for cancer prevention in Lynch syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 12(5), 715-727.
- Kato, M., Kurozumi, A., Goto, Y., Matsushita, R., Okato, A., Nishikawa, R., ... & Seki, N. (2017). Regulation of metastasis-promoting LOXL2 gene expression by antitumor microRNAs in prostate cancer. *Journal of human genetics*, 62(1), 123-132.
- Katsuya, Y., Fujita, Y., Horinouchi, H., Ohe, Y., Watanabe, S. I., & Tsuta, K. (2015). Immunohistochemical status of PD-L1 in thymoma and thymic carcinoma. *Lung Cancer*, 88(2), 154-159.
- Kawato, Y., Aonuma, M., Hirota, Y., Kuga, H., & Sato, K. (1991). Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer research*, 51(16), 4187-4191.
- Kellogg, D. E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P. D., & Chenchik, A. (1994). TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques*, 16(6), 1134-1137.
- Kerbel, R. S. (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*, 21(3), 505-515.
- Kerkar, S. P., & Restifo, N. P. (2012). Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer research*, 72(13), 3125-3130.
- Keskin, M., Sivriköz, E., Yeğen, G., Bayraktar, A., Külle, C. B., Buğra, D., ... & Balık, E. (2019). Right vs Left Colon Cancers Have Comparable Survival: a Decade's Experience. *Indian Journal of Surgery*, 1-8.

- Khan, K., Cunningham, D., & Chau, I. (2017). Targeting angiogenic pathways in colorectal cancer: complexities, challenges and future directions. *Current drug targets*, 18(1), 56-71.
- Kim, J. G., Chae, Y. S., Sohn, S. K., Cho, Y. Y., Moon, J. H., Park, J. Y., ... & Jun, S. H. (2008). Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(1), 62-66.
- Kim, Y. N., Koo, K. H., Sung, J. Y., Yun, U. J., & Kim, H. (2012). Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *International journal of cell biology*, 2012.
- Kim, Y., Je, Y., & Giovannucci, E. L. (2019). Association between alcohol consumption and survival in colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 28(11), 1891-1901.
- Kim, Y., Roh, S., Park, J. Y., Kim, Y., Cho, D. H., & Kim, J. C. (2009). Differential expression of the LOX family genes in human colorectal adenocarcinomas. *Oncology reports*, 22(4), 799-804.
- Kirstein, M. M., Lange, A., Prenzler, A., Manns, M. P., Kubicka, S., & Vogel, A. (2014). Targeted therapies in metastatic colorectal cancer: a systematic review and assessment of currently available data. *The oncologist*, 19(11), 1156.
- Kleibl, Z., Fidlerova, J., Kleiblova, P., Kormunda, S., Bilek, M., Bouskova, K., ... & Novotny, J. (2009). Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Neoplasma*, 56(4), 303.
- Kloor, M., Michel, S., & von Knebel Doeberitz, M. (2010). Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. *International journal of cancer*, 127(5), 1001-1010.
- Knock, E., Deng, L., Wu, Q., Leclerc, D., Wang, X. L., & Rozen, R. (2006). Low dietary folate initiates intestinal tumors in mice, with altered expression of G2-M checkpoint regulators polo-like kinase 1 and cell division cycle 25c. *Cancer Research*, 66(21), 10349-10356.

Koch, A. E., & Distler, O. (2007). Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis research & therapy*, 9(2), 1-9.

Kolonel, L.N., Wilkens, L.R., Migrant studies. In D Schottenfeld, J.F., Fraumeni (eds) *Cancer Epidemiology and Prevention*, 3rd edition. New York, NY: Oxford University Press 2006; 189–201.

Komatsu, H., Oishi, T., Itamochi, H., Shimada, M., Sato, S., Chikumi, J., ... & Harada, T. (2017). Serum vascular endothelial growth factor-A as a prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 27(7).

Koukourakis, M. I., Papazoglou, D., Giatromanolaki, A., Bougioukas, G., Maltezos, E., & Siviridis, E. (2004). VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung cancer*, 46(3), 293-298.

Koutras, A. K., Antonacopoulou, A. G., Eleftheraki, A. G., Dimitrakopoulos, F. I., Koumarianou, A., Varthalitis, I., ... & Kalofonos, H. P. (2012). Vascular endothelial growth factor polymorphisms and clinical outcome in colorectal cancer patients treated with irinotecan-based chemotherapy and bevacizumab. *The pharmacogenomics journal*, 12(6), 468-475.

Koutras, A., Kotoula, V., & Fountzilias, G. (2015). Prognostic and predictive role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in breast cancer. *Pharmacogenomics*, 16(1), 79-94.

Krawczyk, P., Grenda, A., Wojas-Krawczyk, K., Nicoś, M., Kucharczyk, T., Jarosz, B., ... & Milanowski, J. (2019). PD-L1 gene copy number and promoter polymorphisms regulate PD-L1 expression in tumor cells of non-small cell lung cancer patients. *Cancer genetics*, 237, 10-18.

Kristensen, M. H., Pedersen, P. L., Melsen, G. V., Ellehauge, J., & Mejer, J. (2010). Variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes predict early toxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *J Int Med Res*, 38(3), 870-883.

Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2021). Immune checkpoint inhibitors. *Journal of Experimental Medicine*, 218(3).

- Kuderer, N. M., Dale, D. C., Crawford, J., & Lyman, G. H. (2007). Impact of primary prophylaxis with granulocyte colony-stimulating factor on febrile neutropenia and mortality in adult cancer patients receiving chemotherapy: a systematic review. *Journal of Clinical Oncology*, 25:3158-67.
- Kuismanen, S. A., Holmberg, M. T., Salovaara, R., de la Chapelle, A., & Peltomäki, P. (2000). Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *The American journal of pathology*, 156(5), 1773-1779.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. R., & Aster, J. R. (2004). *Cotran pathologic basis of disease*. Philadelphia. PA: Saunders.
- Kune, G., & Watson, L. (2006). Colorectal cancer protective effects and the dietary micronutrients folate, methionine, vitamins B6, B12, C, E, selenium, and lycopene. *Nutrition and cancer*, 56(1), 11-21.
- Kunkel, T. A., & Erie, D. A. (2005). DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 681-710.
- Kunz, C., Focke, F., Saito, Y., Schuermann, D., Lettieri, T., Selfridge, J., & Schär, P. (2009). Base excision by thymine DNA glycosylase mediates DNA-directed cytotoxicity of 5-fluorouracil. *PLoS biology*, 7(4), e1000091.
- Kuramochi, H., Hayashi, K., Uchida, K., Miyakura, S., Shimizu, D., Vallböhmer, D., ... & Danenberg, P. V. (2006). Vascular endothelial growth factor messenger RNA expression level is preserved in liver metastases compared with corresponding primary colorectal cancer. *Clinical cancer research*, 12(1), 29-33.
- Kythreotou, A., Siddique, A., Mauri, F. A., Bower, M., & Pinato, D. J. (2018). PD-L1. *Journal of clinical pathology*, 71(3), 189-194.
- La-Beck, N. M., Jean, G. W., Huynh, C., Alzghari, S. K., & Lowe, D. B. (2015). Immune checkpoint inhibitors: new insights and current place in cancer therapy. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35(10), 963-976.
- Lacin, S., & Yalcin, S. (2020). The Prognostic Value of Circulating VEGF-A Level in Patients With Hepatocellular Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 19, 1533033820971677.

- Lai, E., Liscia, N., Donisi, C., Mariani, S., Tolu, S., Pretta, A., ... & Scartozzi, M. (2020). Molecular-biology-driven treatment for metastatic colorectal cancer. *Cancers*, 12(5), 1214.
- Lao, V. V., & Grady, W. M. (2011). Epigenetics and colorectal cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 8(12), 686-700.
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., ... & Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*, 2(3), 261-268.
- Lauro, S., Onesti, C. E., Righini, R., & Marchetti, P. (2014). The use of bevacizumab in non-small cell lung cancer: an update. *Anticancer research*, 34(4), 1537-1545.
- Lecomte, T., Ferraz, J. M., Zinzindhoué, F., Lorient, M. A., Tregouet, D. A., Landi, B., ... & Laurent-Puig, P. (2004). Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 10(17), 5880-5888.
- Lee, A. M., Shi, Q., Alberts, S. R., Sargent, D. J., Sinicrope, F. A., Berenberg, J. L., ... & Diasio, R. B. (2016a). Association between DPYD c. 1129-5923 C> G/hapB3 and severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in stage III colon cancer patients: NCCTG N0147 (Alliance). *Pharmacogenetics and genomics*, 26(3), 133.
- Lee, A. M., Shi, Q., Pavey, E., Alberts, S. R., Sargent, D. J., Sinicrope, F. A., ... & Diasio, R. B. (2014b). DPYD variants as predictors of 5-fluorouracil toxicity in adjuvant colon cancer treatment (NCCTG N0147). *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 106(12).
- Lee, C. S., Ryan, E. J., & Doherty, G. A. (2014a). Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(14), 3751.
- Lee, G. H., Malietzis, G., Askari, A., Bernardo, D., Al-Hassi, H. O., & Clark, S. K. (2015). Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer?—a systematic review. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 41(3), 300-308.
- Lee, J. C., Chow, N. H., Wang, S. T., & Huang, S. M. (2000). Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *European journal of cancer*, 36(6), 748-753.

- Lee, K. H., Chang, H. J., Han, S. W., Oh, D. Y., Im, S. A., Bang, Y. J., ... & Kim, T. W. (2013). Pharmacogenetic analysis of adjuvant FOLFOX for Korean patients with colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71(4), 843-851.
- Lee, M. S., Menter, D. G., & Kopetz, S. (2017b). Right versus left colon cancer biology: integrating the consensus molecular subtypes. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 15(3), 411-419.
- Lee, S. Y., Jung, D. K., Choi, J. E., Jin, C. C., Hong, M. J., Do, S. K., ... & Park, J. Y. (2016b). PD-L1 polymorphism can predict clinical outcomes of non-small cell lung cancer patients treated with first-line paclitaxel-cisplatin chemotherapy. *Scientific reports*, 6(1), 1-8.
- Lee, S. Y., Jung, D. K., Choi, J. E., Jin, C. C., Hong, M. J., Do, S. K., ... & Park, J. Y. (2017a). Functional polymorphisms in PD-L1 gene are associated with the prognosis of patients with early stage non-small cell lung cancer. *Gene*, 599, 28-35.
- Leichman, C. G., Lenz, H. J., Leichman, L., Danenberg, K., Baranda, J., Groshen, S., ... & Danenberg, P. V. (1997). Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *Journal of clinical oncology*, 15(10), 3223-3229.
- Lenz, H. J., Zhang, W., Zahedy, S., Gil, J., Yu, M., & Stoehlmacher, J. A. (2002, April). A 6 base-pair deletion in the 3' UTR of the thymidylate synthase (TS) gene predicts TS mRNA expression in colorectal tumors. A possible candidate gene for colorectal cancer risk. In *Proc Am Assoc Cancer Res* (Vol. 43, p. 660).
- Leo, S., Tatulli, C., Taveri, R., Campanella, G. A., Carrieri, G., & Colucci, G. (1994). Dermatological toxicity from chemotherapy containing 5-fluorouracil. *Journal of chemotherapy*, 6(6), 423-426.
- Leung, L., Niculescu-Duvaz, D., Smithen, D., Lopes, F., Callens, C., McLeary, R., ... & Springer, C. (2019). Anti-metastatic inhibitors of lysyl oxidase (LOX): design and structure–activity relationships. *Journal of medicinal chemistry*, 62(12), 5863-5884.
- Levin, B., Lieberman, D. A., McFarland, B., Andrews, K. S., Brooks, D., Bond, J., ... & American College of Radiology Colon Cancer Committee. (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. *Gastroenterology*, 134(5), 1570-1595.

Li, G. Y., Duan, J. F., Li, W. J., & Liu, T. (2016). DPYD* 2A/* 5A/* 9A and UGT1A1* 6/* 28 polymorphisms in Chinese colorectal cancer patients. *Journal of cancer research and therapeutics*, 12(2), 782.

Li, S., Wang, L., Meng, Y., Chang, Y., Xu, J., & Zhang, Q. (2017a). Increased levels of LAPTM4B, VEGF and survivin are correlated with tumor progression and poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*, 8(25), 41282.

Li, T., Kang, G., Wang, T., & Huang, H. E. (2018a). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncology letters*, 16(1), 687-702.

Li, T., Yu, J., Luo, X., Ren, W., Zhang, Y., & Cao, B. (2018b). VEGFR-2 as a novel predictor of survival in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Pathology-Research and Practice*, 214(4), 560-564.

Li, Y., Zhang, H. L., Kang, S., Zhou, R. M., & Wang, N. (2017b). The effect of polymorphisms in PD-1 gene on the risk of epithelial ovarian cancer and patients' outcomes. *Gynecologic oncology*, 144(1), 140-145.

Lijuan, Y., Yinhang, W., Yangyanqiu, W., Xiaohui, H., Yunhai, W., & Shuwen, H. (2021). Differences in T cell immune-related lncRNA and mRNA expression patterns between right-and left-sided colorectal cancers. *Human Immunology*.

Lima, A., Azevedo, R., Sousa, H., Seabra, V., & Medeiros, R. (2013). Current approaches for TYMS polymorphisms and their importance in molecular epidemiology and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*, 14(11), 1337-1351.

Lin, D. Y. W., Tanaka, Y., Iwasaki, M., Gittis, A. G., Su, H. P., Mikami, B., ... & Garboczi, D. N. (2008). The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 3011-3016.

Liu, C., Jiang, J., Gao, L., Hu, X., Wang, F., Shen, Y., ... & Zhang, X. (2014). A promoter region polymorphism in PDCD-1 gene is associated with risk of rheumatoid arthritis in the Han Chinese population of southeastern China. *International journal of genomics*, 2014.

- Liu, W., Dong, Z., Hu, R., & Wang, C. (2018). Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms with gastric cancer and its development, prognosis, and survival. *Technology in cancer research & treatment*, 17, 1533034617753810.
- Liu, X., Hu, L. H., Li, Y. R., Chen, F. H., Ning, Y., & Yao, Q. F. (2011). Programmed cell death 1 gene polymorphisms is associated with ankylosing spondylitis in Chinese Han population. *Rheumatology international*, 31(2), 209-213.
- Lockshin, A., & Danenberg, P. V. (1981). Biochemical factors affecting the tightness of 5-fluorodeoxyuridylate binding to human thymidylate synthetase. *Biochemical pharmacology*, 30(3), 247-257.
- Logan, R. M., Gibson, R. J., Bowen, J. M., Stringer, A. M., Sonis, S. T., & Keefe, D. M. (2008). Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 62(1), 33-41.
- Logan, R. M., Stringer, A. M., Bowen, J. M., Gibson, R. J., Sonis, S. T., & Keefe, D. M. (2009). Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered?. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 63(2), 239-251.
- Loganayagam, A., Hernandez, M. A., Corrigan, A., Fairbanks, L., Lewis, C. M., Harper, P., ... & Marinaki, A. M. (2013). Pharmacogenetic variants in the DPYD, TYMS, CDA and MTHFR genes are clinically significant predictors of fluoropyrimidine toxicity. *British journal of cancer*, 108(12), 2505-2515.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews cancer*, 3(5), 330-338.
- López-Novoa, J. M., & Nieto, M. A. (2009). Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO molecular medicine*, 1(6-7), 303-314.
- Loupakis, F., Cremolini, C., Fioravanti, A., Orlandi, P., Salvatore, L., Masi, G., ... & Bocci, G. (2011a). Pharmacodynamic and pharmacogenetic angiogenesis-related markers of first-line FOLFOXIRI plus bevacizumab schedule in metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer*, 104(8), 1262-1269.

- Loupakis, F., Cremolini, C., Yang, D., Salvatore, L., Zhang, W., Wakatsuki, T., ... & Lenz, H. J. (2013). Prospective validation of candidate SNPs of VEGF/VEGFR pathway in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFIRI plus bevacizumab. *PloS one*, 8(7), e66774.
- Loupakis, F., Ruzzo, A., Salvatore, L., Cremolini, C., Masi, G., Frumento, P., ... & Graziano, F. (2011b). Retrospective exploratory analysis of VEGF polymorphisms in the prediction of benefit from first-line FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *BMC cancer*, 11(1), 1-9.
- Lu, H., Shu, X. O., Cui, Y., Kataoka, N., Wen, W., Cai, Q., ... & Zheng, W. (2005). Association of genetic polymorphisms in the VEGF gene with breast cancer survival. *Cancer research*, 65(12), 5015-5019.
- Lucas, A. S., O'Neil, B. H., & Goldberg, R. M. (2011). A decade of advances in cytotoxic chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*, 10(4), 238-244.
- Lugano, R., Ramachandran, M., & Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(9), 1745-1770.
- Lunenburg, C. A., van der Wouden, C. H., Nijenhuis, M., Crommentuijn-van Rhenen, M. H., de Boer-Veger, N. J., Buunk, A. M., ... & Guchelaar, H. J. (2020). Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) guideline for the gene–drug interaction of DPYD and fluoropyrimidines. *European Journal of Human Genetics*, 28(4), 508-517.
- Luo, C., Hu, C., Li, B., Liu, J., Hu, L., Dong, R., ... & Yan, J. (2021). Polymorphisms in lysyl oxidase family genes are associated with intracranial aneurysm susceptibility in a Chinese population. *Frontiers in endocrinology*, 12.
- Lurje, G., Zhang, W., Yang, D., Groshen, S., Hendifar, A. E., Husain, H., ... & Lenz, H. J. (2008). Thymidylate synthase haplotype is associated with tumor recurrence in stage II and stage III colon cancer. *Pharmacogenetics and genomics*, 18(2), 161-168.
- Lynch, H. T., & De la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(10), 919-932.
- Ma, Y., Liu, X., Zhu, J., Li, W., Guo, L., Han, X., ... & Jie, L. (2015). Polymorphisms of co-inhibitory molecules (CTLA-4/PD-1/PD-L1) and the risk of non-small cell lung

cancer in a Chinese population. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(9), 16585.

Macarulla, T., Montagut, C., Sánchez-Martin, F. J., Granja, M., Verdaguer, H., Sastre, J., & Tabernero, J. (2020). The role of PIGF blockade in the treatment of colorectal cancer: overcoming the pitfalls. *Expert opinion on biological therapy*, 20(1), 15-22.

Macdonald, J. S. (1999). Toxicity of 5-fluorouracil. *Oncology (Williston Park, NY)*, 13(7 Suppl 3), 33-34.

Machado-Rugolo, J., Prieto, T. G., Fabro, A. T., Cuentas, E. R. P., Sá, V. K., Baldavira, C. M., ... & Capellozzi, V. L. (2021). Relevance of PD-L1 Non-Coding Polymorphisms on the Prognosis of a Genetically Admixed NSCLC Cohort. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 14, 239.

Macrae FA (2015) Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and protective factors. Wolters Kluwer, UpToDate. <http://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factorsand-protective-factors>. November 2021.

Magalhães, B., Peleteiro, B., & Lunet, N. (2012). Dietary patterns and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *European journal of cancer prevention*, 21(1), 15-23.

Maharjan, A. S., McMillin, G. A., Patel, G. K., Awan, S., Taylor, W. R., Pai, S., ... & Singh, A. P. (2019). The Prevalence of DPYD* 9A (c. 85T> C) Genotype and the Genotype-Phenotype Correlation in Patients with Gastrointestinal Malignancies Treated With Fluoropyrimidines: Updated Analysis. *Clin*

Mahmoudi, M., Rezaieanesh, A., Salmaninejad, A., Harsini, S., Poursani, S., Bahrami, T., ... & Rezaei, N. (2015). PDCD1 single nucleotide genes polymorphisms confer susceptibility to juvenile-onset systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 48(7), 488-493.

Majewski, J., & Ott, J. (2002). Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome research*, 12(12), 1827-1836.

Maltese, P., Canestrari, E., Ruzzo, A., Graziano, F., Falcone, A., Loupakis, F., ... & Magnani, M. (2009). VEGF gene polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer disease in Italian population. *International journal of colorectal disease*, 24(2), 165-170.

- Mandola, M. V., Stoehlmacher, J., Zhang, W., Groshen, S., Mimi, C. Y., Iqbal, S., ... & Ladner, R. D. (2004). A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics and Genomics*, 14(5), 319-327.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... & Campbell, L. L. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704-715.
- Marin-Acevedo, J. A., Dholaria, B., Soyano, A. E., Knutson, K. L., Chumsri, S., & Lou, Y. (2018). Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 1-20.
- Martin, T. A., Goyal, A., Watkins, G., & Jiang, W. G. (2005). Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Annals of surgical oncology*, 12(6), 488-496.
- Martinez-Balibrea, E., Abad, A., Martínez-Cardús, A., Ginés, A., Valladares, M., Navarro, M., ... & Carrato, A. (2010). UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *British journal of cancer*, 103(4), 581.
- Martín-López, J. V., & Fishel, R. (2013). The mechanism of mismatch repair and the functional analysis of mismatch repair defects in Lynch syndrome. *Familial cancer*, 12(2), 159-168.
- Martins, R. P., Leach, R. E., & Krawetz, S. A. (2001). Whole-body gene expression by data mining. *Genomics*, 72(1), 34-42.
- Mashima, T., Wakatsuki, T., Kawata, N., Jang, M. K., Nagamori, A., Yoshida, H., ... & Yamaguchi, K. (2021). Neutralization of the induced VEGF-A potentiates the therapeutic effect of an anti-VEGFR2 antibody on gastric cancer in vivo. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12.
- Masi, G., Salvatore, L., Boni, L., Loupakis, F., Cremolini, C., Fornaro, L., ... & BEBYP Study Investigators. (2015). Continuation or reintroduction of bevacizumab beyond progression to first-line therapy in metastatic colorectal cancer: final results of the randomized BEBYP trial. *Annals of Oncology*, 26(4), 724-730.

- Matherly, L. H., Czajkowski, C. A., Muench, S. P., & Psiakis, J. T. (1990). Role for cytosolic folate-binding proteins in the compartmentation of endogenous tetrahydrofolates and the 5-formyl tetrahydrofolate-mediated enhancement of 5-fluoro-2'-deoxyuridine antitumor activity in vitro. *Cancer research*, 50(11), 3262-3269.
- Matsumoto, K., & Ema, M. (2014). Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. *The Journal of Biochemistry*, 156(1), 1-10.
- Mauhin, V., Lutz, Y., Dennefeld, C., & Alberga, A. (1993). Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL. *Nucleic acids research*, 21(17), 3951-3957.
- Mazzuca, F., Borro, M., Botticelli, A., Mazzotti, E., Marchetti, L., Gentile, G., ... & Marchetti, P. (2016). Pre-treatment evaluation of 5-fluorouracil degradation rate: association of poor and ultra-rapid metabolism with severe toxicity in a colorectal cancer patients cohort. *Oncotarget*, 7(15), 20612.
- McPherson, R. C., Konkel, J. E., Prendergast, C. T., Thomson, J. P., Ottaviano, R., Leech, M. D., ... & Anderton, S. M. (2014). Epigenetic modification of the PD-1 (Pdc1) promoter in effector CD4⁺ T cells tolerized by peptide immunotherapy. *elife*, 3, e03416.
- Meguid, R. A., Slidell, M. B., Wolfgang, C. L., Chang, D. C., & Ahuja, N. (2008). Is there a difference in survival between right-versus left-sided colon cancers?. *Annals of surgical oncology*, 15(9), 2388.
- Mehmood, R. K. (2014). Review of Cisplatin and oxaliplatin in current immunogenic and monoclonal antibody treatments. *Oncology reviews*, 8(2).
- Meissner, H. I., Breen, N., Klabunde, C. N., & Vernon, S. W. (2006). Patterns of colorectal cancer screening uptake among men and women in the United States. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 15(2), 389-394.
- Metzger, C. S., Koutsimpelas, D., & Brieger, J. (2015). Transcriptional regulation of the VEGF gene in dependence of individual genomic variations. *Cytokine*, 76(2), 519-526.
- Meulendijks, D., Henricks, L. M., Sonke, G. S., Deenen, M. J., Froehlich, T. K., Amstutz, U., ... & Kleibl, Z. (2015). Clinical relevance of DPYD variants c. 1679T> G, c. 1236G> A/HapB3, and c. 1601G> A as predictors of severe fluoropyrimidine-

associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*, 16(16), 1639-1650

Milano, G., Etienne-Grimaldi, M. C., Mari, M., Lassalle, S., Formento, J. L., Francoual, M., ... & Hofman, P. (2008). Candidate mechanisms for capecitabine-related hand-foot syndrome. *British journal of clinical pharmacology*, 66(1), 88-95.

Millanes-Romero, A., Herranz, N., Perrera, V., Iturbide, A., Loubat-Casanovas, J., Gil, J., ... & Peiró, S. (2013). Regulation of heterochromatin transcription by Snail1/LOXL2 during epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular cell*, 52(5), 746-757.

Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., ... & Sasaki, I. (2010). 5-fu metabolism in cancer and orally-administrable 5-fu drugs. *Cancers*, 2(3), 1717-1730.

Miwa, M., Ura, M., Nishida, M., Sawada, N., Ishikawa, T., Mori, K., ... & Ishitsuka, H. (1998). Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *European journal of cancer*, 34(8), 1274-1281.

Miyoshi, A., Kitajima, Y., Kido, S., Shimonishi, T., Matsuyama, S., Kitahara, K., & Miyazaki, K. (2005). Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer*, 92(2), 252-258.

Mizuno, K., Seki, N., Mataka, H., Matsushita, R., Kamikawaji, K., Kumamoto, T., ... & Inoue, H. (2016). Tumor-suppressive microRNA-29 family inhibits cancer cell migration and invasion directly targeting LOXL2 in lung squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*, 48(2), 450-460.

Moertel, C. G., Fleming, T. R., Macdonald, J. S., Haller, D. G., Laurie, J. A., Tangen, C. M., ... & Mailliard, J. A. (1995). Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Annals of internal medicine*, 122(5), 321-326.

Moes, M., Le Béhec, A., Crespo, I., Laurini, C., Halavatyi, A., Vetter, G., ... & Friederich, E. (2012). A novel network integrating a miRNA-203/SNAI1 feedback loop which regulates epithelial to mesenchymal transition. *PloS one*, 7(4), e35440.

- Moh'd Khushman, G. K. P., Hosein, P. J., Laurini, J. A., Cameron, D., Clarkson, D. R., Butler, T. W., ... & Taylor, W. R. (2018). Germline pharmacogenomics of DPYD* 9A (c. 85T> C) variant in patients with gastrointestinal malignancies treated with fluoropyrimidines. *Journal of gastrointestinal oncology*, 9(3), 416.
- Mojtahedi, Z., Mohmedi, M., Rahimifar, S., Erfani, N., Hosseini, S. V., & Ghaderi, A. (2012). Programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with colon cancer. *Gene*, 508(2), 229-232.
- Momtaz, P., & Postow, M. A. (2014). Immunologic checkpoints in cancer therapy: focus on the programmed death-1 (PD-1) receptor pathway. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 7, 357.
- Moody, S. E., Perez, D., Pan, T. C., Sarkisian, C. J., Portocarrero, C. P., Sterner, C. J., ... & Chodosh, L. A. (2005). The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer cell*, 8(3), 197-209.
- Mortezaee, K. (2020). Immune escape: A critical hallmark in solid tumors. *Life Sciences*, 118110.
- Moschetta, M., Mishima, Y., Sahin, I., Manier, S., Glavey, S., Vacca, A., ... & Ghobrial, I. M. (2014). Role of endothelial progenitor cells in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1846(1), 26-39.
- Mountzios, G., Pentheroudakis, G., & Carmeliet, P. (2014). Bevacizumab and micrometastases: revisiting the preclinical and clinical rollercoaster. *Pharmacology & therapeutics*, 141(2), 117-124.
- Mousa, S. A., Lin, H. Y., Tang, H. Y., Hercbergs, A., Luidens, M. K., & Davis, P. J. (2014). Modulation of angiogenesis by thyroid hormone and hormone analogues: implications for cancer management. *Angiogenesis*, 17(3), 463-469.
- Murphy, G., Devesa, S. S., Cross, A. J., Inskip, P. D., McGlynn, K. A., & Cook, M. B. (2011). Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *International journal of cancer*, 128(7), 1668-1675.
- Musso, G., Cassader, M., & Gambino, R. (2016). Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies. *Nature reviews Drug discovery*, 15(4), 249-274.

Nagore, E., Insa, A., & Sanmartín, O. (2000). Antineoplastic therapy—induced palmar plantar Erythrodysesthesia ('Hand-Foot') syndrome. *American journal of clinical dermatology*, 1(4), 225-234.

Nahid, N. A., Apu, M. N. H., Islam, M. R., Shabnaz, S., Chowdhury, S. M., Ahmed, M. U., ... & Hasnat, A. (2018). DPYD* 2A and MTHFR C677T predict toxicity and efficacy, respectively, in patients on chemotherapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 81(1), 119-129.

Nakano, T., Takizawa, K., Uezato, A., Taguchi, K., Toh, S., & Masuda, M. (2019). Prognostic value of programmed death ligand-1 and ligand-2 co-expression in salivary gland carcinomas. *Oral oncology*, 90, 30-37.

Nakaya, Y., & Sheng, G. (2008). Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view. *Development, growth & differentiation*, 50(9), 755-766.

Nakaya, Y., & Sheng, G. (2009). An amicable separation: chick's way of doing EMT. *Cell adhesion & migration*, 3(2), 160-163.

NCBI, *PDCDL1*, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(pdl1\[gene\]\)%20AND%20\(Homo%20sapiens\[orgn\]\)%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(pdl1[gene])%20AND%20(Homo%20sapiens[orgn])%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight) (Şubat 2022).

NCBI, rs140125782. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs140125782>. (Şubat 2022)

NCBI, rs6125849. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs6125849> (Şubat 2022)

NCBI, rs6999447. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs6999447> (Şubat 2021)

NCCN, 2014. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal. version 2. https://www.nccn.org/store/login/login.aspx?ReturnURL=http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_colon.pdf (2014).

NCCN, 2017. National Comprehensive Cancer Network. clinical practice guidelines in oncology. Colon cancer. Fort Wathington (PA): National Comprehensive Cancer Network; c2017

- Nguyen, D. X., Bos, P. D., & Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 274-284.
- Nie, Q., Guo, X., Liu, H., Zeng, L., Wang, X., Wen, S., ... & Peng, W. (2019). Effects of DPYD and TS gene polymorphisms on chemosensitivity of 5-FU in advanced colorectal cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 12(7), 9380-9386.
- Nie, Q., Shrestha, S., Tapper, E. E., Trogstad-Isaacson, C. S., Bouchonville, K. J., Lee, A. M., ... & Diasio, R. B. (2017). Quantitative contribution of rs75017182 to dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA splicing and enzyme activity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 102(4), 662-670.
- Nielsen, M., de Miranda, N. F., van Puijenbroek, M., Jordanova, E. S., Middeldorp, A., van Wezel, T., ... & Morreau, H. (2009). Colorectal carcinomas in MUTYH-associated polyposis display histopathological similarities to microsatellite unstable carcinomas. *BMC cancer*, 9(1), 1-15.
- Nielsen, M., Morreau, H., Vasen, H. F., & Hes, F. J. (2011). MUTYH-associated polyposis (MAP). *Critical reviews in oncology/hematology*, 79(1), 1-16.
- Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(3), 155-166.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y. J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21-45.
- Nitsche, U., Stögbauer, F., Späth, C., Haller, B., Wilhelm, D., Friess, H., & Bader, F. G. (2016). Right sided colon cancer as a distinct histopathological subtype with reduced prognosis. *Digestive surgery*, 33(2), 157-163.
- Nomizo, T., Ozasa, H., Tsuji, T., Funazo, T., Yasuda, Y., Yoshida, H., ... & Kim, Y. H. (2017). Clinical impact of single nucleotide polymorphism in PD-L1 on response to nivolumab for advanced non-small-cell lung cancer patients. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
- Novillo, A., Gaibar, M., Romero-Lorca, A., Gilsanz, M. F., Beltrán, L., Galán, M., ... & Fernández-Santander, A. (2020). Efficacy of bevacizumab-containing chemotherapy in metastatic colorectal cancer and CXCL5 expression: Six case reports. *World journal of gastroenterology*, 26(16), 1979.

- O'Doherty, C., Favorov, A., Heggarty, S., Graham, C., Favorova, O., Ochs, M., ... & Vandenbroeck, K. (2009). Genetic polymorphisms, their allele combinations and IFN- β treatment response in Irish multiple sclerosis patients. *Pharmacogenomics*, 10(7), 1177-1186.
- O-Charoenrat P (2014). Vascular endothelial growth factor polymorphisms affect gene expression and tumor aggressiveness in patients with breast cancer. *Mol Med Rep* 9(3):1044–1048
- Offer, S. M., Fossum, C. C., Wegner, N. J., Stuflesser, A. J., Butterfield, G. L., & Diasio, R. B. (2014). Comparative functional analysis of DPYD variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Cancer research*, 74(9), 2545-2554.
- Offer, S. M., Wegner, N. J., Fossum, C., Wang, K., & Diasio, R. B. (2013). Phenotypic profiling of DPYD variations relevant to 5-fluorouracil sensitivity using real-time cellular analysis and in vitro measurement of enzyme activity. *Cancer research*, 73(6), 1958-1968.
- Okazaki, S., Loupakis, F., Stintzing, S., Cao, S., Zhang, W., Yang, D., ... & Lenz, H. J. (2016). Clinical significance of TLR1 I602S polymorphism for patients with metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI plus bevacizumab. *Molecular cancer therapeutics*, 15(7), 1740-1745.
- Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T., & Honjo, T. (2001). PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13866-13871.
- Olmeda, D., Jordá, M., Peinado, H., Fabra, A., & Cano, A. (2007a). Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene*, 26(13), 1862-1874.
- Olmeda, D., Moreno-Bueno, G., Flores, J. M., Fabra, A., Portillo, F., & Cano, A. (2007b). SNAIL1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *Cancer research*, 67(24), 11721-11731.
- Paduch, R. (2016). The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cellular Oncology*, 39(5), 397-410.

- Páez, D., Paré, L., Altés, A., Sancho-Poch, F. J., Petriz, L., Garriga, J., ... & Baiget, M. (2010). Thymidylate synthase germline polymorphisms in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy based on 5-fluorouracil. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 136(11), 1681-1689.
- Pagès, G., & Pouyssegur, J. (2005). Transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene—a concert of activating factors. *Cardiovascular research*, 65(3), 564-573.
- Pálmer, H. G., Larriba, M. J., García, J. M., Ordóñez-Morán, P., Peña, C., Peiró, S., ... & Pollán, M. (2004). The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nature medicine*, 10(9), 917-919.
- Palmirotta, R., Carella, C., Silvestris, E., Cives, M., Stucci, S. L., Tucci, M., ... & Silvestris, F. (2018). SNPs in predicting clinical efficacy and toxicity of chemotherapy: walking through the quicksand. *Oncotarget*, 9(38), 25355.
- Palmirotta, R., Lovero, D., Silvestris, E., Carella, C., Felici, C., Quaresmini, D., ... & Silvestris, F. (2017). Characterization of a rare nonpathogenic sequence variant (c. 1905C> T) of the dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD). *The International journal of biological markers*, 32(3), 357-360.
- Palomaki, G. E., McClain, M. R., Melillo, S., Hampel, H. L., & Thibodeau, S. N. (2009). EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genetics in Medicine*, 11(1), 42-65.
- Pander, J., Wessels, J. A., Gelderblom, H., van der Straaten, T., Punt, C. J., & Guchelaar, H. J. (2011). Pharmacogenetic interaction analysis for the efficacy of systemic treatment in metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology*, 22(5), 1147-1153.
- Papachristos, A., Kemos, P., Katsila, T., Panoilia, E., Patrinos, G. P., Kalofonos, H., & Sivolapenko, G. B. (2019). VEGF-A and ICAM-1 Gene Polymorphisms as Predictors of Clinical Outcome to First-Line Bevacizumab-Based Treatment in Metastatic Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5791.
- Papagiorgis, P., Oikonomakis, I., Karapanagiotou, I., Wexner, S. D., & Nikiteas, N. (2006). The impact of tumor location on the histopathologic expression of colorectal

cancer. *Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 11(3), 317-321.

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252-264.

Paré-Brunet, L., Sebio, A., Salazar, J., Berenguer-Llergo, A., Río, E., Barnadas, A., ... & Páez, D. (2015). Genetic variations in the VEGF pathway as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy. *The pharmacogenomics journal*, 15(5), 397-404.

Park, J. G., Collins, J. M., Gazdar, A. F., Allegra, C. J., Steinberg, S. M., Greene, R. F., & Kramer, B. S. (1988). Enhancement of fluorinated pyrimidine-induced cytotoxicity by leucovorin in human colorectal carcinoma cell lines. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 80(19), 1560-1564.

Park, J. J., Omiya, R., Matsumura, Y., Sakoda, Y., Kuramasu, A., Augustine, M. M., ... & Tamada, K. (2010). B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 116(8), 1291-1298.

Park, J. S., Lee, J. H., Lee, Y. S., Kim, J. K., Dong, S. M., & Yoon, D. S. (2016). Emerging role of LOXL2 in the promotion of pancreas cancer metastasis. *Oncotarget*, 7(27), 42539.

Park, P. G., Jo, S. J., Kim, M. J., Kim, H. J., Lee, J. H., Park, C. K., ... & Lee, J. M. (2017). Role of LOXL2 in the epithelial-mesenchymal transition and colorectal cancer metastasis. *Oncotarget*, 8(46), 80325.

Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., ... & Riley, J. L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and cellular biology*, 25(21), 9543-9553.

Patsoukis, N., Wang, Q., Strauss, L., & Boussiotis, V. A. (2020). Revisiting the PD-1 pathway. *Science Advances*, 6(38), eabd2712.

Pavlakovic, H., Havers, W., & Schweigerer, L. (2001). Multiple angiogenesis stimulators in a single malignancy: implications for anti-angiogenic tumour therapy. *Angiogenesis*, 4(4), 259-262.

- Pavlovic-Calic, N., Muminhodzic, K., Zildzic, M., Smajic, M., Gegic, A., Alibegovic, E., ... & Iljazovic, S. (2007). Genetics, clinical manifestations and management of FAP and HNPCC. *Medicinski arhiv*, 61(4), 256-259.
- Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M., & Cano, A. (2004). Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Molecular and cellular biology*, 24(1), 306-319.
- Peinado, H., del Carmen Iglesias-de la Cruz, M., Olmeda, D., Csiszar, K., Fong, K. S., Vega, S., ... & Portillo, F. (2005a). A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *The EMBO journal*, 24(19), 3446-3458.
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature reviews cancer*, 7(6), 415-428.
- Peinado, H., Portillo, F., & Cano, A. (2005b). Switching on-off snail: LOXL2 versus GSK3?. *Cell Cycle*, 4(12), 1749-1752.
- Pellicer, M., García-González, X., García, M. I., Blanco, C., García-Alfonso, P., Robles, L., ... & Longo, F. (2017). Use of exome sequencing to determine the full profile of genetic variants in the fluoropyrimidine pathway in colorectal cancer patients affected by severe toxicity. *Pharmacogenomics*, 18(13), 1215-1223.
- Pena, C., Garcia, J. M., Larriba, M. J., Barderas, R., Gomez, I., Herrera, M., ... & Cuevas, J. (2009). SNAI1 expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue. *Oncogene*, 28(49), 4375-4385.
- Peng, Q., Lin, K., Chang, T., Zou, L., Xing, P., Shen, Y., & Zhu, Y. (2018). Identification of genomic expression differences between right-sided and left-sided colon cancer based on bioinformatics analysis. *OncoTargets and therapy*, 11, 609.
- Peng, T., Deng, X., Tian, F., Li, Z., Jiang, P., Zhao, X., ... & Wang, S. (2019). The interaction of LOXL2 with GATA6 induces VEGFA expression and angiogenesis in cholangiocarcinoma. *International journal of oncology*, 55(3), 657-670.
- Pentheroudakis, G., & Twelves, C. (2002). The rational development of capecitabine from the laboratory to the clinic. *Anticancer research*, 22(6B), 3589-3596.

- Pereira, V. B., Melo, A. T., Assis-Júnior, E. M., Wong, D. V., Brito, G. A., Almeida, P. R., ... & Lima-Júnior, R. C. (2016). A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 77(2), 323-332.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C., & Fuchs, E. (2003). Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*, 112(4), 535-548.
- Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., & Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 392(6672), 190-193.
- Peske, J. D., Woods, A. B., & Engelhard, V. H. (2015). Control of CD8 T-cell infiltration into tumors by vasculature and microenvironment. *Advances in cancer research*, 128, 263-307.
- Petrelli, F., Tomasello, G., Borgonovo, K., Ghidini, M., Turati, L., Dallera, P., ... & Barni, S. (2017). Prognostic survival associated with left-sided vs right-sided colon cancer: a systematic review and meta-analysis. *JAMA oncology*, 3(2), 211-219.
- Pfeiffer, P., Yilmaz, M., Möller, S., Zitnjak, D., Krogh, M., Petersen, L. N., ... & Qvortrup, C. (2020). TAS-102 with or without bevacizumab in patients with chemorefractory metastatic colorectal cancer: an investigator-initiated, open-label, randomised, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 21(3), 412-420.
- PharmGKB, VEGF Signaling Pathway, <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA2032>(Şubat 2022).
- PharmGKB, Floropirimidin metabolizması. <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA150653776> (2022).
- Phipps, A. I., Robinson, J. R., Campbell, P. T., Win, A. K., Figueiredo, J. C., Lindor, N. M., & Newcomb, P. A. (2017). Prediagnostic alcohol consumption and colorectal cancer survival: The Colon Cancer Family Registry. *Cancer*, 123(6), 1035-1043.
- Piedbois, P., Buyse, M., Rustum, Y., Machover, D., Erlichman, C., Carlson, R. W., ... & Petrelli, N. (1992). Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate by the advanced colorectal cancer meta-analysis project. *Journal of Clinical Oncology*, 10(6), 896-903.

- Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2059-2072.
- Pirozzi, F., Poto, R., Aran, L., Cuomo, A., Galdiero, M. R., Spadaro, G., ... & Mercurio, V. (2021). Cardiovascular toxicity of immune checkpoint inhibitors: clinical risk factors. *Current Oncology Reports*, 23(2), 1-8.
- Plastiras, A., Iosif, E., Georgiou, G., Haji, A., Haq, A., Papagrigoriadis, S., & Nunoo-Mensah, J. (2019). Right versus left Colon cancer: Is there a difference in outcomes?. *World Journal of Colorectal Surgery*, 8(1), 14-14.
- Poole, R. M., & Vaidya, A. (2014). Ramucirumab: first global approval. *Drugs*, 74(9), 1047-1058.
- Poschke, I., Mougiakakos, D., & Kiessling, R. (2011). Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(8), 1161-1171.
- Poynter, J. N., Siegmund, K. D., Weisenberger, D. J., Long, T. I., Thibodeau, S. N., Lindor, N., ... & Laird, P. W. (2008). Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLHI promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 17(11), 3208-3215.
- Pulito, C., Cristaudo, A., La Porta, C., Zapperi, S., Blandino, G., Morrone, A., & Strano, S. (2020). Oral mucositis: the hidden side of cancer therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), 1-15.
- Qiu, H., Zheng, L., Tang, W., Yin, P., Cheng, F., & Wang, L. (2014). Programmed death-1 (PD-1) polymorphisms in Chinese patients with esophageal cancer. *Clinical biochemistry*, 47(7-8), 612-617.
- Radparvar, S., Houghton, P. J., & Houghton, J. A. (1989). Effect of polyglutamylation of 5, 10-methylenetetrahydrofolate on the binding of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate to thymidylate synthase purified from a human colon adenocarcinoma xenograft. *Biochemical pharmacology*, 38(2), 335-342.
- Rahoui, J., Laraqui, A., Sbitti, Y., Touil, N., Ibrahimi, A., Ghrab, B., ... & Mrani, S. (2014). Investigating the association of vascular endothelial growth factor

polymorphisms with breast cancer: a Moroccan case-control study. *Medical Oncology*, 31(9), 193.

Rajabi, M., & Mousa, S. A. (2017). The role of angiogenesis in cancer treatment. *Biomedicines*, 5(2), 34.

Rajagopalan, H., Nowak, M. A., Vogelstein, B., & Lengauer, C. (2003). The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nature reviews cancer*, 3(9), 695-701.

Rani, K., Datt, S., & Rana, R. (2012). Brief review on alkaline phosphatases: An overview. *International Journal of Microbiology and Bioinformatics*, 2(1), 1-4.

Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd gastroenterologiczny*, 14(2), 89.

Redd, P. S., Lu, C., Klement, J. D., Ibrahim, M. L., Zhou, G., Kumai, T., ... & Liu, K. (2018). H3K4me3 mediates the NF- κ B p50 homodimer binding to the pdcd1 promoter to activate PD-1 transcription in T cells. *Oncoimmunology*, 7(9), e1483302.

Refae, S., Gal, J., Brest, P., Giaccherio, D., Borchellini, D., Ebran, N., ... & Saada-Bouid, E. (2020). Hyperprogression under Immune Checkpoint Inhibitor: A potential role for germinal immunogenetics. *Scientific reports*, 10(1), 1-8.

Ren, H. T., Li, Y. M., Wang, X. J., Kang, H. F., Jin, T. B., Ma, X. B., ... & Dai, Z. J. (2016). PD-1 rs2227982 polymorphism is associated with the decreased risk of breast cancer in Northwest Chinese women: a hospital-based observational study. *Medicine*, 95(21).

Rezzola, S., Belleri, M., Gariano, G., Ribatti, D., Costagliola, C., Semeraro, F., & Presta, M. (2014). In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays. *Angiogenesis*, 17(3), 429-442.

Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., Roccaro, A. M., & Vacca, A. (2007). The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*, 21(1), 44-52.

Ribeiro, R. A., Wanderley, C. W., Wong, D. V., Mota, J. M. S., Leite, C. A., Souza, M. H., ... & Lima-Junior, R. C. (2016). Irinotecan-and 5-fluorouracil-induced intestinal

mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 78(5), 881-893.

Ridge, S. A., Sludden, J., Wei, X., Sapone, A., Brown, O., Hardy, S., ... & McLeod, H. L. (1998). Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in patients with colorectal cancer. *British journal of cancer*, 77(3), 497

Riera, P., Virgili, A. C., Salazar, J., Sebio, A., Tobeña, M., Sullivan, I., & Páez, D. (2018). Genetic variants in the VEGF pathway as prognostic factors in stages II and III colon cancer. *The pharmacogenomics journal*, 18(4), 556-564.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *nature*, 386(6626), 671-674.

Robien, K., & Ulrich, C. M. (2003). 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. *American journal of epidemiology*, 157(7), 571-582.

Rodig, N., Ryan, T., Allen, J. A., Pang, H., Grabie, N., Chernova, T., ... & Freeman, G. J. (2003). Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8⁺ T cell activation and cytotoxicity. *European journal of immunology*, 33(11), 3117-3126.

Rosenblatt, D. S. (2001). Methylenetetrahydrofolate reductase. *Clinical and Investigative Medicine*, 24, 6–59

Rosivatz, E., Becker, I., Specht, K., Fricke, E., Lubber, B., Busch, R., ... & Becker, K. F. (2002). Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *The American journal of pathology*, 161(5), 1881-1891.

Rosmarin, D., Palles, C., Church, D., Domingo, E., Jones, A., Johnstone, E., ... & Tomlinson, I. (2014). Genetic markers of toxicity from capecitabine and other fluorouracil-based regimens: investigation in the QUASAR2 study, systematic review, and meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 32(10), 1031.

Rostami-Nejad, M., Ishaq, S., Al Dulaimi, D., Zali, M. R., & Rostami, K. (2015). The role of infectious mediators and gut microbiome in the pathogenesis of celiac disease. *Archives of Iranian Medicine*, 18(4), 244-49

Roy, H., Bhardwaj, S., & Ylä-Herttuala, S. (2006). Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS letters*, 580(12), 2879-2887.

- Rozali, E. N., Hato, S. V., Robinson, B. W., Lake, R. A., & Lesterhuis, W. J. (2012). Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
- Ruan, W. C., Che, Y. P., Ding, L., & Li, H. F. (2018). Efficacy and toxicity of addition of bevacizumab to chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 21(10), 718-724.
- Rutkowski, M. R., Svoronos, N., Perales-Puchalt, A., & Conejo-Garcia, J. R. (2015). The tumor macroenvironment: cancer-promoting networks beyond tumor beds. *Advances in cancer research*, 128, 235-262.
- Ruzzo, A., Graziano, F., Galli, F., Galli, F., Rulli, E., Lonardi, S., ... & Magnani, M. (2017). Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics for predicting fluoropyrimidine-related toxicity in the randomised, phase III adjuvant TOSCA trial in high-risk colon cancer patients. *British journal of cancer*, 117(9), 1269-1277.
- Saif, M. W., Syrigos, K. N., & Katirtzoglou, N. A. (2009). S-1: a promising new oral fluoropyrimidine derivative. *Expert opinion on investigational drugs*, 18(3), 335-348.
- Sakai, H., Sagara, A., Matsumoto, K., Hasegawa, S., Sato, K., Nishizaki, M., ... & Narita, M. (2013). 5-Fluorouracil induces diarrhea with changes in the expression of inflammatory cytokines and aquaporins in mouse intestines. *PloS one*, 8(1), e54788.
- Salem, M. E., Weinberg, B. A., Xiu, J., El-Deiry, W. S., Hwang, J. J., Gatalica, Z., ... & Marshall, J. L. (2017). Comparative molecular analyses of left-sided colon, right-sided colon, and rectal cancers. *Oncotarget*, 8(49), 86356.
- Salmaninejad, A., Khoramshahi, V., Azani, A., Soltaninejad, E., Aslani, S., Zamani, M. R., ... & Hosseini, S. M. (2018). PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. *Immunogenetics*, 70(2), 73-86.
- Salmaninejad, A., Valilou, S. F., Shabgah, A. G., Aslani, S., Alimardani, M., Pasdar, A., & Sahebkar, A. (2019). PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *Journal of cellular physiology*, 234(10), 16824-16837.
- Saltz, L. B., Cox, J. V., Blanke, C., Rosen, L. S., Fehrenbacher, L., Moore, M. J., ... & Miller, L. L. (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 343(13), 905-914.

- Salvador, F., Martin, A., López-Menéndez, C., Moreno-Bueno, G., Santos, V., Vázquez-Naharro, A., ... & Cano, A. (2017). Lysyl oxidase-like protein LOXL2 promotes lung metastasis of breast cancer. *Cancer research*, 77(21), 5846-5859.
- Sameer, A. S. S. (2013). Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms. *Frontiers in oncology*, 3, 114.
- Sameer, A. S., Nissar, S., & Fatima, K. (2014). Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *European journal of cancer prevention*, 23(4), 246-257.
- Samowitz, W. S., Albertsen, H., Herrick, J., Levin, T. R., Sweeney, C., Murtaugh, M. A., ... & Slattery, M. L. (2005). Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology*, 129(3), 837-845.
- Sampson, J. R., & Jones, N. (2009). MUTYH-associated polyposis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 23(2), 209-218.
- San Roman, A. K., & Shivdasani, R. A. (2011). Boundaries, junctions and transitions in the gastrointestinal tract. *Experimental cell research*, 317(19), 2711-2718.
- Sa-Nguanraksa D, Chuangsuwanich T, Pongpruttipan T, Kummalue T, Rojananin S, Ratanawichhitrasin A, Prasartong-Osoth P, Chuthatisith S, Pisarnaturakit P, Aeumrithaicharoenchok W et al (2013) Vascular endothelial growth factor 634G/C polymorphism is associated with increased breast cancer risk and aggressiveness. *Mol Med Rep* 8(4):1242–1250
- Sanmamed, M. F., & Chen, L. (2014). Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 20(4), 256.
- Santi, D. V., McHenry, C. S., & Sommer, H. (1974). Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry*, 13(3), 471-481.
- Sasaki, H., Tatemaysu, T., Okuda, K., Moriyama, S., Yano, M., & Fujii, Y. (2014). PD-1 gene promoter polymorphisms correlate with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Molecular and clinical oncology*, 2(6), 1035-1042.

- Savabkar, S., Azimzadeh, P., Chaleshi, V., Mojarad, E. N., & Aghdaei, H. A. (2013). Programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with gastric cancer. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 6(4), 178.
- Schietke, R., Warnecke, C., Wacker, I., Schödel, J., Mole, D. R., Campean, V., ... & Wiesener, M. S. (2010). The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(9), 6658-6669.
- Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2016). Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family. *Immunity*, 44(5), 955-972.
- Schneider, B. P., Radovich, M., & Miller, K. D. (2009). The role of vascular endothelial growth factor genetic variability in cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(17), 5297-5302.
- Scully, C., Sonis, S., & Diz, P. D. (2006). Oral mucositis. *Oral diseases*, 12(3), 229-241.
- Seliger, B. (2019). Basis of PD1/PD-L1 therapies. *Journal of clinical medicine*, 8(12), 2168.
- Shamsdin, S. A., Karimi, M. H., Hosseini, S. V., Geramizadeh, B., Fattahi, M. R., Mehrabani, D., & Moravej, A. (2018). Associations of ICOS and PD. 1 gene variants with colon cancer risk in the iranian population. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 19(3), 693.
- Shao, B., Zhao, X., Liu, T., Zhang, Y., Sun, R., Dong, X., ... & Sun, B. (2019). LOXL 2 promotes vasculogenic mimicry and tumour aggressiveness in hepatocellular carcinoma. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(2), 1363-1374.
- Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R., & Freeman, G. J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature immunology*, 8(3), 239-245.
- Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., ... & Issa, J. P. J. (2007). Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18654-18659.

Shibuya, M. (2013). VEGFR and type-V RTK activation and signaling. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 5(10), a009092.

Shiotani, T., & Weber, G. (1981). Purification and properties of dihydrothymine dehydrogenase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 256(1), 219-224.

Shitara, K., Matsuo, K., Takahari, D., Yokota, T., Inaba, Y., Yamaura, H., ... & Muro, K. (2009). Neutropaenia as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients undergoing chemotherapy with first-line FOLFOX. *European journal of cancer*, 45(10), 1757-1763.

Shitara, K., Matsuo, K., Takahari, D., Yokota, T., Shibata, T., Ura, T., ... & Muro, K. (2010). Neutropenia as a prognostic factor in advanced gastric cancer patients undergoing second-line chemotherapy with weekly paclitaxel. *Annals of oncology*, 21(12), 2403-2409.

Shukla, S. D., & Lim, R. W. (2013). Epigenetic effects of ethanol on the liver and gastrointestinal system. *Alcohol research: current reviews*, 35(1), 47.

Sinicrope, F. A., Foster, N. R., Thibodeau, S. N., Marsoni, S., Monges, G., Labianca, R., ... & Sargent, D. J. (2011). DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(11), 863-875.

Sinicrope, F. A., Shi, Q., Smyrk, T. C., Thibodeau, S. N., Dienstmann, R., Guinney, J., ... & Alberts, S. R. (2015). Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology*, 148(1), 88-99.

Sistonen, J., Büchel, B., Froehlich, T. K., Kummer, D., Fontana, S., Joerger, M., ... & Largiadèr, C. R. (2014). Predicting 5-fluorouracil toxicity: DPD genotype and 5, 6-dihydrouracil: uracil ratio. *Pharmacogenomics*, 15(13), 1653-1666.

Slattery, M. L., Lundgreen, A., & Wolff, R. K. (2014). VEGFA, FLT1, KDR and colorectal cancer: assessment of disease risk, tumor molecular phenotype, and survival. *Molecular carcinogenesis*, 53(S1), E140-E150.

Smith, G., Carey, F. A., Beattie, J., Wilkie, M. J., Lightfoot, T. J., Coxhead, J., ... & Wolf, C. R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9433-9438.

- Smith, K. C., Bateman, A. C., Fussell, H. M., & Howell, W. M. (2004). Cytokine gene polymorphisms and breast cancer susceptibility and prognosis. *European journal of immunogenetics*, 31(4), 167-173.
- Smithen, D. A., Leung, L. M., Challinor, M., Lawrence, R., Tang, H., Niculescu-Duvaz, D., ... & Springer, C. (2019). 2-Aminomethylene-5-sulfonylthiazole Inhibitors of lysyl oxidase (LOX) and LOXL2 show significant efficacy in delaying tumor growth. *Journal of medicinal chemistry*, 63(5), 2308-2324.
- Snaebjornsson, P., Jonasson, L., Jonsson, T., Möller, P. H., Theodors, A., & Jonasson, J. G. (2010). Colon cancer in Iceland—a nationwide comparative study on various pathology parameters with respect to right and left tumor location and patients age. *International journal of cancer*, 127(11), 2645-2653.
- Soares, P. M., Mota, J. M. S., Gomes, A. S., Oliveira, R. B., Assreuy, A. M. S., Brito, G. A. C., ... & Souza, M. H. (2008). Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 63(1), 91-98.
- Sobrero, A., Guglielmi, A., Grossi, F., Puglisi, F., & Aschele, C. (2000). Mechanism of action of fluoropyrimidines: relevance to the new developments in colorectal cancer chemotherapy. In *Seminars in oncology* (Vol. 27, No. 5, pp. 72-77).
- Sohn, B. S., Park, S. J., Kim, J. E., Kim, K. P., Hong, Y. S., Suh, C., ... & Kim, T. W. (2014). Single-nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor pathway and outcomes of patients treated with first-line cytotoxic chemotherapy combined with bevacizumab for advanced colorectal cancer. *Oncology*, 87(5), 280-292.
- Sohn, K. J., Croxford, R., Yates, Z., Lucock, M., & Kim, Y. I. (2004). Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(2), 134-144.
- Soong, R., Powell, B., Elsaleh, H., Gnanasampanthan, G., Smith, D. R., Goh, H. S., ... & Iacopetta, B. (2000). Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma: influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation. *European journal of cancer*, 36(16), 2053-2060.

- Sopo, M., Anttila, M., Hämäläinen, K., Kivelä, A., Ylä-Herttuala, S., Kosma, V. M., ... & Sallinen, H. (2019). Expression profiles of VEGF-A, VEGF-D and VEGFR1 are higher in distant metastases than in matched primary high grade epithelial ovarian cancer. *BMC cancer*, 19(1), 1-12.
- Starzyńska, A., Sejda, A., Adamski, Ł., Adamska, P., Pęksa, R., Sakowicz-Burkiewicz, M., ... & Jereczek-Fossa, B. A. (2020). The B7 family molecules in oral squamous cell carcinoma: a systematic review. Part I: B7-H1 (PD-L1) and B7-DC (PD-L2). *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 37(1).
- Steffensen, K. D., Waldstrøm, M., Brandslund, I., & Jakobsen, A. (2010). The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 117(1), 109-116.
- Stintzing, S., Tejpar, S., Gibbs, P., Thiebach, L., & Lenz, H. J. (2017). Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes. *European Journal of Cancer*, 84, 69-80.
- Su, J., Dai, B., Yuan, W., Wang, G., Zhang, Z., Li, Z., ... & Song, J. (2020). The influence of PD-L1 genetic variation on the prognosis of R0 resection colorectal cancer patients received capecitabine-based adjuvant chemotherapy: a long-term follow-up, real-world retrospective study. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 85(5), 969-978.
- Su, M. W., Chang, C. K., Lin, C. W., Chu, H. W., Tsai, T. N., Su, W. C., ... & Wang, J. Y. (2022). Genomic and Metabolomic Landscape of Right-Sided and Left-Sided Colorectal Cancer: Potential Preventive Biomarkers. *Cells*, 11(3), 527.
- Sugai, T., Habano, W., Jiao, Y. F., Tsukahara, M., Takeda, Y., Otsuka, K., & Nakamura, S. I. (2006). Analysis of molecular alterations in left-and right-sided colorectal carcinomas reveals distinct pathways of carcinogenesis: proposal for new molecular profile of colorectal carcinomas. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 8(2), 193-201.
- Sugimachi, K., Tanaka, S., Kameyama, T., Taguchi, K. I., Aishima, S. I., Shimada, M., ... & Tsuneyoshi, M. (2003). Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 9(7), 2657-2664.

- Sun, C., Mezzadra, R., & Schumacher, T. N. (2018). Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. *Immunity*, 48(3), 434-452.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Suttie, S. A., Shaikh, I., Mullen, R., Amin, A. I., Daniel, T., & Yalamarthi, S. (2011). Outcome of right-and left-sided colonic and rectal cancer following surgical resection. *Colorectal Disease*, 13(8), 884-889.
- Szajewski, M., Kruszeński, W. J., Lakomy, J., Ciesielski, M., Kawecki, K., Jankun, J., ... & Szefer, J. (2014). VEGF-C and VEGF-D overexpression is more common in left-sided and well-differentiated colon adenocarcinoma. *Oncology reports*, 31(1), 125-130.
- Tan, D., Sheng, L., & Yi, Q. H. (2018). Correlation of PD-1/PD-L1 polymorphisms and expressions with clinicopathologic features and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Biomarkers*, 21(2), 287-297.
- Tanaka, N., Yamada, S., Sonohara, F., Suenaga, M., Hayashi, M., Takami, H., ... & Kodera, Y. (2018). Clinical implications of lysyl oxidase-like protein 2 expression in pancreatic cancer. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
- Tang, W., Chen, S., Chen, Y., Lin, J., Lin, J., Wang, Y., ... & Kang, M. (2017). Programmed death-1 polymorphisms is associated with risk of esophagogastric junction adenocarcinoma in the Chinese Han population: A case-control study involving 2,740 subjects. *Oncotarget*, 8(24), 39198.
- Tang, W., Chen, Y., Chen, S., Sun, B., Gu, H., & Kang, M. (2015). Programmed death-1 (PD-1) polymorphism is associated with gastric cardia adenocarcinoma. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(5), 8086.
- Tao, L. H., Zhou, X. R., Li, F. C., Chen, Q., Meng, F. Y., Mao, Y., ... & Chen, W. C. (2017). A polymorphism in the promoter region of PD-L1 serves as a binding-site for SP1 and is associated with PD-L1 overexpression and increased occurrence of gastric cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(3), 309-318.

- Teleanu, R. I., Chircov, C., Grumezescu, A. M., & Teleanu, D. M. (2020). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic strategies for cancer treatment. *Journal of clinical medicine*, 9(1), 84.
- Terrazzino, S., Cargnin, S., Del Re, M., Danesi, R., Canonico, P. L., & Genazzani, A. A. (2013). DPYD IVS14+ 1G> A and 2846A> T genotyping for the prediction of severe fluoropyrimidine-related toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenomics*, 14(11), 1255-1272.
- Theodoratou, E., Campbell, H., Tenesa, A., Houlston, R., Webb, E., Lubbe, S., ... & Farrington, S. M. (2010). A large-scale meta-analysis to refine colorectal cancer risk estimates associated with MUTYH variants. *British journal of cancer*, 103(12), 1875-1884.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442-454.
- Thomas, F., Motsinger-Reif, A. A., Hoskins, J. M., Dvorak, A., Roy, S., Aliasiri, A., ... & McLeod, H. L. (2011). Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms and toxicity to 5-FU-based chemoradiation in rectal cancer. *British journal of cancer*, 105(11), 1654-1662.
- Thorn, C. F., Marsh, S., Carrillo, M. W., McLeod, H. L., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(4), 237.
- Tian, J., Sun, H. X., Li, Y. C., Jiang, L., Zhang, S. L., & Hao, Q. (2019). LOXL 2 Promotes The Epithelial–Mesenchymal Transition And Malignant Progression Of Cervical Cancer. *OncoTargets and therapy*, 12, 8947.
- Toffoli, G., & De Mattia, E. (2008). Pharmacogenetic relevance of MTHFR polymorphisms. *Pharmacogenomics*, 9(9), 1195-1206.
- Toffoli, G., Giodini, L., Buonadonna, A., Berretta, M., De Paoli, A., Scalone, S., ... & Cecchin, E. (2015). Clinical validity of a DPYD-based pharmacogenetic test to predict severe toxicity to fluoropyrimidines. *International journal of cancer*, 137(12), 2971-2980.
- Tokunaga, R., Xiu, J., Johnston, C., Goldberg, R. M., Philip, P. A., Seeber, A., ... & Puccini, A. (2019). Molecular profiling of appendiceal adenocarcinoma and comparison

with right-sided and left-sided colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 25(10), 3096-3103.

Tong, C. C., Lam, C. W., Lam, K. O., Lee, V. H., & Luk, M. Y. (2018). A novel dpyd variant associated with severe toxicity of fluoropyrimidines: role of pre-emptive DPYD genotype screening. *Frontiers in oncology*, 8, 279.

Toor, S. M., Nair, V. S., Decock, J., & Elkord, E. (2020, October). Immune checkpoints in the tumor microenvironment. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 65, pp. 1-12). Academic Press.

Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current opinion in immunology*, 24(2), 207-212.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.

Torres, S., Garcia-Palmero, I., Herrera, M., Bartolomé, R. A., Pena, C., Fernandez-Aceñero, M. J., ... & Casal, J. I. (2015). LOXL2 is highly expressed in cancer-associated fibroblasts and associates to poor colon cancer survival. *Clinical Cancer Research*, 21(21), 4892-4902.

Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., & Issa, J. P. J. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8681-8686.

Turner, M. C., Becerra, D., Sun, Z., Watson, J., Leung, K., Migaly, J., ... & Blazer, D. G. (2019). The side of the primary tumor affects overall survival in colon adenocarcinoma: an analysis of the national cancer database. *Techniques in coloproctology*, 23(6), 537-544.

Twelves, C., Wong, A., Nowacki, M. P., Abt, M., Burris III, H., Carrato, A., ... & Scheithauer, W. (2005). Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *New England Journal of Medicine*, 352(26), 2696-2704.

Ulrich, C. M., Bigler, J., Velicer, C. M., Greene, E. A., Farin, F. M., & Potter, J. D. (2000). Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 9(12), 1381-1385.

- Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., Chapelle, A. D. L., Rüschoff, J., ... & Srivastava, S. (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(4), 261-268.
- Ungerback, J., Elander, N., Dimberg, J., & Söderkvist, P. (2009). Analysis of VEGF polymorphisms, tumor expression of VEGF mRNA and colorectal cancer susceptibility in a Swedish population. *Molecular medicine reports*, 2(3), 435-439.
- Van Cutsem, E., Hoff, P. M., Harper, P., Bukowski, R. M., Cunningham, D., Dufour, P., ... & Schilsky, R. L. (2004). Oral capecitabine vs intravenous 5-fluorouracil and leucovorin: integrated efficacy data and novel analyses from two large, randomised, phase III trials. *British journal of cancer*, 90(6), 1190-1197.
- Van Cutsem, E., Paccard, C., Chiron, M., & Tabernero, J. (2020). Impact of prior bevacizumab treatment on VEGF-A and PlGF levels and outcome following second-line aflibercept treatment: Biomarker post hoc analysis of the VELOUR trial. *Clinical Cancer Research*, 26(3), 717-725.
- Van Cutsem, E., Twelves, C., Cassidy, J., Allman, D., Bajetta, E., Boyer, M., ... & Harper, P. (2001). Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *Journal of Clinical Oncology*, 19(21), 4097-4106.
- van der Put, N. M., Gabreëls, F., Stevens, E. M., Smeitink, J. A., Trijbels, F. J., Eskes, T. K., ... & Blom, H. J. (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?. *The American Journal of Human Genetics*, 62(5), 1044-1051.
- Van Kuilenburg, A. B. P., Vreken, P., Beex, L. V. A. M., Meinsma, R., Van Lenthe, H., De Abreu, R. A., & Van Gennip, A. H. (1997). Heterozygosity for a point mutation in an invariant splice donor site of dihydropyrimidine dehydrogenase and severe 5-fluorouracil related toxicity. *European Journal of Cancer*, 33(13), 2258-2264.
- van Kuilenburg, A. B., Dobritzsch, D., Meinsma, R., Haasjes, J., Waterham, H. R., Nowaczyk, M. J., ... & van Gennip, A. H. (2002). Novel disease-causing mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene interpreted by analysis of the three-dimensional protein structure. *Biochemical Journal*, 364(1), 157-163.

- van Kuilenburg, A. B., Haasjes, J., Richel, D. J., Zoetekouw, L., Van Lenthe, H., De Abreu, R. A., ... & van Gennip, A. H. (2000). Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clinical Cancer Research*, 6(12), 4705-4712.
- van Kuilenburg, A. B., Meijer, J., Mul, A. N., Meinsma, R., Schmid, V., Dobritzsch, D., ... & Gross, E. (2010). Intragenic deletions and a deep intronic mutation affecting pre-mRNA splicing in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene as novel mechanisms causing 5-fluorouracil toxicity. *Human genetics*, 128(5), 529-538.
- Varma, A., Jayanthi, M., Dubashi, B., & Shewade, D. G. (2019). Influence of DPYD* 9A, DPYD* 6 and GSTP1 ile105val genetic polymorphisms on capecitabine and oxaliplatin (CAPOX) associated toxicities in colorectal cancer (CRC) patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 20(10), 3093.
- Vasen, H. F. A., Nagengast, F. M., & Meera Khan, P. (1995). Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet* 345, 1183–1184.
- Vega, S., Morales, A. V., Ocaña, O. H., Valdés, F., Fabregat, I., & Nieto, M. A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & development*, 18(10), 1131-1143.
- Venook, A. P., Niedzwiecki, D., Innocenti, F., Fruth, B., Greene, C., O'Neil, B. H., ... & Lenz, H. J. (2016). Impact of primary (1°) tumor location on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance).
- Vibhakkar, R., Juan, G., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., & Finger, L. R. (1997). Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes. *Experimental cell research*, 232(1), 25-28.
- Villa, A., & Sonis, S. T. (2015). Mucositis: pathobiology and management. *Current opinion in oncology*, 27(3), 159-164.
- Vincenzi, B., Schiavon, G., Pantano, F., Santini, D., & Tonini, G. (2008). Predictive factors for chemotherapy-related toxic effects in patients with colorectal cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, 5(8), 455-465.

- Vleminckx, K., Vakaet Jr, L., Mareel, M., Fiers, W., & Van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, 66(1), 107-119.
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology & therapeutics*, 206, 107447.
- Vreken P., Van Kuilenburg, A. B., Meinsma, R., Smit, G. P., Bakker, H. D., De Abreu, R. A., van Gennip, A. H. (1996). A point mutation in an invariant splice donor site leads to exon skipping in two unrelated Dutch patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Journal of inherited metabolic disease*, 19(5), 645-654.
- Vreken, P., Meinsma, R., De Abreu, R. A., Van Gennip, A. H., & Van Kuilenburg, A. B. P. (1997). Identification of a four-base deletion (delTCAT 296–299) in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene with variable clinical expression. *Human genetics*, 100(2), 263-265.
- Wagner, M., Jasek, M., & Karabon, L. (2021). Immune Checkpoint Molecules—Inherited Variations as Markers for Cancer Risk. *Frontiers in immunology*, 11.
- Wagner, M., Tupikowski, K., Jasek, M., Tomkiewicz, A., Witkowicz, A., Ptaszkowski, K., ... & Karabon, L. (2020). SNP-SNP Interaction in Genes Encoding PD-1/PD-L1 Axis as a Potential Risk Factor for Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancers*, 12(12), 3521.
- Walko, C. M., & Lindley, C. (2005). Capecitabine: a review. *Clinical therapeutics*, 27(1), 23-44.
- Wang, B., Walsh, S. J., & Saif, M. W. (2016). Pancytopenia and severe gastrointestinal toxicities associated with 5-fluorouracil in a patient with thymidylate synthase (TYMS) polymorphism. *Cureus*, 8(9).
- Wang, C., Xu, S., Tian, Y., Ju, A., Hou, Q., Liu, J., ... & Luo, Y. (2019). Lysyl oxidase-like protein 2 promotes tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis in breast cancer. *Neoplasia*, 21(4), 413-427.
- Wang, H., & Hartnett, M. E. (2016). Regulation of signaling events involved in the pathophysiology of neovascular AMD. *Molecular vision*, 22, 189-202.

- Wang, H., Zhao, L., Liu, H., Luo, S., Akinyemiju, T., Hwang, S., & Wei, Q. (2020). Variants in SNAI1, AMDHD1 and CUBN in vitamin D pathway genes are associated with breast cancer risk: a large-scale analysis of 14 GWASs in the DRIVE study. *American journal of cancer research*, 10(7), 2160.
- Wang, W., Liao, P., & He, Y. (2017). A gene polymorphism in PD-L1 promoter region is not associated with PD-L1 expression and patients' survival in gastric cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(10), 1379-1381.
- Wang, Y. J., Zheng, L. Y., Wang, Z. F., Song, R., Yang, L., Geng, Y. H., ... & Li, X. H. (2018). Associations of gene-wide SNPs in SNAI1 and TWIST1 with breast cancer and ovarian cancer susceptibility among Chinese Han women. *Oncology reports*, 40(6), 3573-3584.
- Warschkow, R., Sulz, M. C., Marti, L., Tarantino, I., Schmied, B. M., Cerny, T., & Güller, U. (2016). Better survival in right-sided versus left-sided stage I-III colon cancer patients. *BMC cancer*, 16(1), 554.
- Watson, C. J., Webb, N. J., Bottomley, M. J., & Brenchley, P. E. (2000). Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*, 12(8), 1232-1235.
- Wei, E. K., Giovannucci, E., Wu, K., Rosner, B., Fuchs, C. S., Willett, W. C., & Colditz, G. A. (2004). Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *International journal of cancer*, 108(3), 433-442.
- Weijenberg, M. P., Lüchtenborg, M., De Goeij, A. F., Brink, M., Van Muijen, G. N., De Bruïne, A. P., ... & Van Den Brandt, P. A. (2007). Dietary fat and risk of colon and rectal cancer with aberrant MLH1 expression, APC or KRAS genes. *Cancer causes & control*, 18(8), 865-879.
- Weisberg, I. S., Jacques, P. F., Selhub, J., Bostom, A. G., Chen, Z., Ellison, R. C., ... & Rozen, R. (2001). The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis*, 156(2), 409-415.
- Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S., & Rozen, R. (1998). A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Molecular genetics and metabolism*, 64(3), 169-172.

- Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., ... & Laird, P. W. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature genetics*, 38(7), 787-793.
- Weiss, J. M., Pfau, P. R., O'Connor, E. S., King, J., LoConte, N., Kennedy, G., & Smith, M. A. (2011). Mortality by stage for right-versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results–Medicare data. *Journal of Clinical Oncology*, 29(33), 4401.
- Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S., & Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *The Journal of clinical investigation*, 123(8), 3190-3200.
- Wen, B., Xu, L. Y., & Li, E. M. (2020). LOXL2 in cancer: Regulation, downstream effectors and novel roles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 188435.
- Wheeler, H. E., Gonzalez-Neira, A., Pita, G., de la Torre-Montero, J. C., Alonso, R., Lopez-Fernandez, L. A., ... & Dolan, M. E. (2014). Identification of genetic variants associated with capecitabine-induced hand-foot syndrome through integration of patient and cell-line genomic analyses. *Pharmacogenetics and genomics*, 24(5), 231.
- Whiteside, T. L. (2015). The role of regulatory T cells in cancer immunology. *ImmunoTargets and therapy*, 4, 159.
- Wilhelm, S. M., Dumas, J., Adnane, L., Lynch, M., Carter, C. A., Schütz, G., ... & Zopf, D. (2011). Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *International journal of cancer*, 129(1), 245-255.
- Wimberly, A. L., Forsyth, C. B., Khan, M. W., Pemberton, A., Khazaie, K., & Keshavarzian, A. (2013). Ethanol-Induced Mast Cell-Mediated Inflammation Leads to Increased Susceptibility of Intestinal Tumorigenesis in the APC Δ 468 Min Mouse Model of Colon Cancer. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37, E199-E208.
- Witt, D. A., Donson, A. M., Amani, V., Moreira, D. C., Sanford, B., Hoffman, L. M., ... & Griesinger, A. M. (2018). Specific expression of PD-L1 in RELA-fusion

supratentorial ependymoma: Implications for PD-1-targeted therapy. *Pediatric blood & cancer*, 65(5), e26960.

Wong, C. C. L., Tse, A. P. W., Huang, Y. P., Zhu, Y. T., Chiu, D. K. C., Lai, R. K. H., ... & Ng, I. O. L. (2014). Lysyl oxidase-like 2 is critical to tumor microenvironment and metastatic niche formation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 60(5), 1645-1658.

Wood, L. D., Parsons, D. W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R. J., ... & Vogelstein, B. (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*, 318(5853), 1108-1113.

Wu, K., Willett, W. C., Fuchs, C. S., Colditz, G. A., & Giovannucci, E. L. (2002). Calcium intake and risk of colon cancer in women and men. *Journal of the national cancer institute*, 94(6), 437-446.

Wu, L., Zhang, Y., Zhu, Y., Cong, Q., Xiang, Y., & Fu, L. (2016). The effect of LOXL2 in hepatocellular carcinoma. *Molecular medicine reports*, 14(3), 1923-1932.

Wu, S., Zheng, Q., Xing, X., Dong, Y., Wang, Y., You, Y., ... & Cui, J. (2018a). Matrix stiffness-upregulated LOXL2 promotes fibronectin production, MMP9 and CXCL12 expression and BMDCs recruitment to assist pre-metastatic niche formation. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 1-12.

Wu, X., & Schauss, A. G. (2012). Mitigation of inflammation with foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(27), 6703-6717.

Wu, Y., Li, Z., Shi, Y., Chen, L., Tan, H., Wang, Z., ... & Hu, J. (2018b). Exome sequencing identifies LOXL2 mutation as a cause of familial intracranial aneurysm. *World neurosurgery*, 109, e812-e818.

Wu, Y., Zhao, T., Jia, Z., Cao, D., Cao, X., Pan, Y., ... & Jiang, J. (2019). Polymorphism of the programmed death-ligand 1 gene is associated with its protein expression and prognosis in gastric cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 34(7), 1201-1207.

Wu, Z. Q., Han, X. D., Wang, Y., Yuan, K. L., Jin, Z. M., Di, J. Z., ... & Zheng, Q. (2011). Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 68(1), 87-96.

Wulaningsih, W., Wardhana, A., Watkins, J., Yoshuantari, N., Repana, D., & Van Hemelrijck, M. (2016). Irinotecan chemotherapy combined with fluoropyrimidines versus irinotecan alone for overall survival and progression-free survival in patients with advanced and/or metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).

Xiao, Y., & Freeman, G. J. (2015). A new B7: CD28 family checkpoint target for cancer immunotherapy: HHLA2. *Clinical Cancer Research*, 21(10), 2201-2203.

Xie, P., Yu, H., Wang, F., Yan, F., & He, X. (2019). Inhibition of LOXL2 enhances the radiosensitivity of castration-resistant prostate cancer cells associated with the reversal of the EMT process. *BioMed research international*, 2019.

Xie, Q., Chen, Z., Xia, L., Zhao, Q., Yu, H., & Yang, Z. (2018). Correlations of PD-L1 gene polymorphisms with susceptibility and prognosis in hepatocellular carcinoma in a Chinese Han population. *Gene*, 674, 188-194.

Yamamori, M., Sakaeda, T., Nakamura, T., Okamura, N., Tamura, T., Aoyama, N., ... & Okumura, K. (2004). Association of VEGF genotype with mRNA level in colorectal adenocarcinomas. *Biochemical and biophysical research communications*, 325(1), 144-150.

Yamamoto, M., Kobayashi, T., Mashima, H., Miki, D., Kuroda, S., Hamaoka, M., ... & Ohdan, H. (2020). PD1 gene polymorphism is associated with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma following liver resection, cohort study. *International Journal of Surgery*, 80, 84-90.

Yamanaka, T., Matsumoto, S., Teramukai, S., Ishiwata, R., Nagai, Y., & Fukushima, M. (2007). Predictive value of chemotherapy-induced neutropenia for the efficacy of oral fluoropyrimidine S-1 in advanced gastric carcinoma. *British journal of cancer*, 97(1), 37-42.

Yang, B., Gapstur, S. M., Newton, C. C., Jacobs, E. J., & Campbell, P. T. (2017). Alcohol intake and mortality among survivors of colorectal cancer: The Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer*, 123(11), 2006-2013.

Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., ... & Dedhar, S. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-12.

- Yang, L., Yang, X., Ji, W., Deng, J., Qiu, F., Yang, R., ... & Zhang, H. (2014). Effects of a functional variant c. 353T> C in *snai1* on risk of two contextual diseases. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 189(2), 139-148.
- Yang, M. H., Chang, S. Y., Chiou, S. H., Liu, C. J., Chi, C. W., Chen, P. M., ... & Wu, K. J. (2007). Overexpression of NBS1 induces epithelial–mesenchymal transition and co-expression of NBS1 and Snail predicts metastasis of head and neck cancer. *Oncogene*, 26(10), 1459-1467.
- Yang, L., Wang, Y. J., Zheng, L. Y., Jia, Y. M., Chen, Y. L., Chen, L., ... & Fang, W. G. (2016). Genetic polymorphisms of TGFB1, TGFBR1, SNAI1 and TWIST1 are associated with endometrial cancer susceptibility in Chinese Han women. *PloS one*, 11(5), e0155270.
- Yasuda, M., Kato, S., Yamanaka, N., Iimori, M., Utsumi, D., Kitahara, Y., ... & Takeuchi, K. (2012). Potential role of the NADPH oxidase NOX1 in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(10), G1133-G1142.
- Yeh, C. C., Lai, C. Y., Chang, S. N., Hsieh, L. L., Tang, R., Sung, F. C., & Lin, Y. K. (2017). Polymorphisms of MTHFR C677T and A1298C associated with survival in patients with colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy. *International journal of clinical oncology*, 22(3), 484-493.
- Yeo, M. K., Choi, S. Y., Seong, I. O., Suh, K. S., Kim, J. M., & Kim, K. H. (2017). Association of PD-L1 expression and PD-L1 gene polymorphism with poor prognosis in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Human pathology*, 68, 103-111.
- Yeung, S. C. J. (2021). Diarrhea. In *Oncologic Emergency Medicine* (pp. 357-365). Springer, Cham..
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2), 15-33.
- Yin, M., Liao, Z., Yuan, X., Guan, X., O'Reilly, M. S., Welsh, J., ... & Wei, Q. (2012). Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene and severe radiation pneumonitis in non-small cell lung cancer patients treated with definitive radiotherapy. *Cancer science*, 103(5), 945-950.

- Yoshida, Y., Hoshino, S., Aisu, N., Mogi, A., Yamada, T., Kojima, D., ... & Yamashita, Y. (2015). Can grade 2 neutropenia predict the risk of grade 3 neutropenia in metastatic colorectal cancer patients treated with chemotherapy?. *Supportive Care in Cancer*, 23(6), 1623-1627.
- Yousef, A. M., Zawiah, M., Al-Yacoub, S., Kadi, T., Tantawi, D. A., & Al-Ramadhani, H. (2018). The association of polymorphisms in folate-metabolizing genes with response to adjuvant chemotherapy of colorectal cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 82(2), 237-243.
- Yuan, H., Kajiyama, H., Ito, S., Yoshikawa, N., Hyodo, T., Asano, E., ... & Kikkawa, F. (2013). ALX1 induces snail expression to promote epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer research*, 73(5), 1581-1590.
- Zamani, M. R., Asbagh, F. A., Massoud, A. H., Salmaninejad, A., Massoud, A., & Rezaei, N. (2015). Association between a PD-1 gene polymorphism and antisperm antibody-related infertility in Iranian men. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(1), 103-106.
- Zamani, M. R., Aslani, S., Salmaninejad, A., Javan, M. R., & Rezaei, N. (2016). PD-1/PD-L and autoimmunity: a growing relationship. *Cellular immunology*, 310, 27-41.
- Zeichner, S. B., Raj, N., Cusnir, M., Francavilla, M., & Hirzel, A. (2012). A de novo germline APC mutation (3927del5) in a patient with familial adenomatous polyposis: case report and literature review. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 6, CMO-S10178.
- Zhan, P., Lv, X. J., Ji, Y. N., Xie, H., & Yu, L. K. (2018). Increased lysyl oxidase-like 2 associates with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *The clinical respiratory journal*, 12(2), 712-720.
- Zhang, J., Zhao, T., Xu, C., Huang, J., & Yu, H. (2016). The association between polymorphisms in the PDCD1 gene and the risk of cancer: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine*, 95(40).
- Zhao, J., Li, W., Zhu, D., Yu, Q., Zhang, Z., Sun, M., ... & Zhang, W. (2014). Association of single nucleotide polymorphisms in MTHFR and ABCG2 with the different efficacy of first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Medical Oncology*, 31(1), 1-7.

- Zhao, M., Zhang, J., Chen, S., Wang, Y., & Tian, Q. (2020a). Influence of Programmed Death Ligand-1-Gene Polymorphism rs822336 on the Prognosis and Safety of Postoperative Patients with NSCLC Who Received Platinum-Based Adjuvant Chemotherapy. *Cancer Management and Research*, 12, 6755.
- Zhao, X., Peng, Y., Li, X., Zhang, S., Peng, Y., Shan, J., ... & Wang, D. (2020b). The association of PD-L1 gene polymorphisms with non-small-cell lung cancer susceptibility and clinical outcomes in a Chinese population. *International journal of clinical and experimental pathology*, 13(8), 2130.
- Zhao, Z., Ba, C., Wang, W., Wang, X., Xue, R., & Wu, X. (2012). Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms and colorectal cancer: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 16(12), 1390-1394.
- Zheng, B., Ren, T., Huang, Y., Sun, K., Wang, S., Bao, X., ... & Guo, W. (2018). PD-1 axis expression in musculoskeletal tumors and antitumor effect of nivolumab in osteosarcoma model of humanized mouse. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 1-13.
- Zheng, M., Jiang, Y. P., Chen, W., Li, K. D., Liu, X., Gao, S. Y., ... & Cen, X. (2015). Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 6(9), 6794.
- Zhou, B. P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y. M., Gunduz, M., & Hung, M. C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nature cell biology*, 6(10), 931-940.
- Zhu, L., Wang, F., Hu, F., Wang, Y., Li, D., Dong, X., ... & Zhao, Y. (2013). Association between MTHFR polymorphisms and overall survival of colorectal cancer patients in Northeast China. *Medical Oncology*, 30(1), 467.
- Zou, D., Lou, J., Ke, J., Mei, S., Li, J., Gong, Y., ... & Miao, X. (2018). Integrative expression quantitative trait locus-based analysis of colorectal cancer identified a functional polymorphism regulating SLC22A5 expression. *European Journal of Cancer*, 93, 1-9.

6. EKLER



Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	09.2018.174
	PROJE ADI	Kolorektal Adenokarsinom Hastalarında Metastaz Oluşumu Ve Terapiye Yanıt Farklılıklarındaki Moleküler Alt Yapının Araştırılması
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

KARAR BİLGİLERİ	Tarih	02.02.2018
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.	

ÜYELER					
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof.Dr. Haner DİRESKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Prof. Dr. Şefik GÖRKEY	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Prof.Dr. Atila KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Prof.Dr. Semra SARDAŞ	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Prof. Dr. Beste Melek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Doç. Dr. Elif KARAKOÇ AYDINER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Doç.Dr. Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır
Gözde Aynur MİRZA	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	Var	Yok	☐ Evet ☒ Hayır

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad: Mehtap ÇEVİK

Eğitim

2010-2014 Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

2014-2016 Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü
(Yüksek Lisans)

Farklı Gelişim Evrelerindeki Yağ Hücrelerinde Niban Geninin Antiapoptotik ve Lipogenik Etkilerinin Araştırılması, Danışman: Prof. Dr. Belgin SUSLEYİCİ

2016-2022 Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü
(Doktora Programı)

Kolorektal Adenokarsinom Hastalarında Metastaz Oluşumu ve Terapiye Yanıt Farklılıklarındaki Moleküler Alt Yapının Araştırılması, Danışman: Prof. Dr. Belgin SUSLEYİCİ

Bilimsel Yayınlar

1.1 SCI, SSCI ve AHCI'de Taranan Uluslararası Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Kayhan, F. E., Susleyici, B., Kaymak, G., Koldemir Gunduz, M., Tartar, Ş., Esmer, H. E., Akbulut, C., Cevik, M., Yon Ertuğ, N. D. (2017). The sublethal disrupting effects of fluoxetine-HCl (FLX) on catalase (CAT) activity and malondialdehyde (MDA) levels in zebrafish *Danio rerio*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(6), 3768-3772.

2. Cevik, M., Dartan, G., Ulker, M., Bezci, K., Deliorman, G., Cagatay, P., ... & Susleyici, B. (2020). Evaluation of cytotoxicity and mutagenicity of wastewater from Istanbul: data from hospitals and advanced wastewater treatment plant. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 104(6), 852-857.

3. Akdeniz, C. S., Cevik, M., Canbolat, I. P., Yurdakul, S., Cagatay, P., Ciftci, C., ... & Susleyici, B. (2020). The effects of CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms on

warfarin maintenance dose in Turkish cardiac patients. *Future Cardiology*, 16(6), 645-654.

4. Bezci, K., Cevik, M., Akdeniz, C. S., Canbolat, I. P., Yurdakul, S., Sunbul, M., ... & Susleyici, B. (2020). Warfarin pharmacogenetics in patients with heart valve replacement. *Gene Reports*, 20, 100769.

5. Cevik, M., Gunduz, M. K., Deliorman, G., & Susleyici, B. (2020). Alterations in niban gene expression as a response to stress conditions in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Biology Reports*, 47:9399–9408. doi:10.1007/s11033-020-05992-5

6. Cevik, M., Namal E., Dinc-Sener N., Iner-Koksal U., Deliorman G., Ciftci C., Susleyici B. (2021). The Effects of SNAI1 rs6125849 Gene Polymorphism on Metastasis and Survival in Colorectal Cancer. *Gene Reports*, 24: 101279.

7. Bayar, E., Cevik, M., Caker, S., Cagatay, P., & Susleyici, B. (2021). DNA Damage in AML-12 Hepatocytes and 3T3-L1 Adipocytes Treated with Clopidogrel. *Current Drug Safety*. 2021;16(3):252-258. doi: 10.2174/1574886315666210106141936

8. Gezer, E., Cevik, M., Akdeniz, C. S., Canbolat, I. P., Yurdakul, S., Sunbul, M., ... & Susleyici, B. (2021). CYP3A4 1B Gene Polymorphism in Coronary Artery Disease Patients with Obesity Undergoing Statin Treatment. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 18(1), 18-23.

9. Susleyici, B., Ciftci, C., Yurdakul, S., Cevik, M., Selcan-Akdeniz, C., Canbolat, IP., Deliorman, G., Karaalp, A., (2021). Prevalence of CYP2C19 Polymorphisms in Turkish Clopidogrel Treated Patients. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 18(2), 116 –122. doi:10.2174/1875692118666210810092755

10. Cevik, M., Caker, S., Deliorman, G., Cagatay, P., Koldemir-Gunduz, M., Susleyici B. (2022). The Effects of Glipizide on DNA Damage and Nuclear Transport in Differentiated 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular Biology Reports*. 49:1151–1159. doi: 10.1007/s11033-021-06942-5

11. Cevik, M., Namal, E., Iner-Koksal, U., Dinc-Sener, N., Karaalp, A., Ciftci, C., & Susleyici, B. (2022). Association of PD-1 and PDL-1 gene polymorphisms with

colorectal cancer risk and prognosis. Molecular Biology Reports, 1-10. doi: 10.1007/s11033-021-06992-9

12. Cevik, M., Namal, E., Dinc-Sener N., Iner-Koksal, U., Cagatay, P., Deliorman, G., Ciftci, C., Karaalp, A., Susleyici, B. Investigation of DPYD, MTHFR and TYMS Polymorphisms on 5-Fluorouracil Related Toxicities in Colorectal Cancer. (1st Revision-Under Consideration, Personalized Medicine).

13. Cevik, M., Namal, E., Dinc-Sener N., Iner-Koksal, U., Ciftci, C., Susleyici, B. Investigation of Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms on Risk, Metastasis, Laterality and Prognosis of Colorectal Cancer in Turkish Subjects. (Under Consideration, Genetic Testing and Molecular Biomarkers).

14. Dartan, G., Cevik, M., Aksu, B., Can, ZS., Keskin, Y., Yurdun, T., Deliorman, G., Susleyici B. From Wastewater to Aquatic Life: Mutagenicity and Heavy Metals. (Under Consideration, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology).

1.2 SCI, SSCI ve AHCI’de Taranmayan, Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Atmaca, H., Gündüz, M. K., Çağatay, P., Cevik, M., & Duman, B. S. (2015). Investigation of the preventative roles of manganese superoxide dismutase Ala16Val gene polymorphism in coronary artery events. İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi, 1(3), 134-144.

2. Demir, S.B., Gündüz, M. K., Cevik, M., Ciftci, C., & Süssleyici, B. (2016). Investigation of Ras-related nuclear protein gene expression in obesity in relation with adipogenesis. FNG & Bilim Tıp Dergisi, 2(3), 201-207.

3. Gunduz, M. K., Cevik, M., Cagatay, P., & Susleyici, B. (2022). The effects of oral antidiabetics on adipogenesis related gene expressions in 3T3-L1, AML12 cell lines and their co-cultures. Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences, (2019) 2(1), 29-37.

4. Esma Ulusoy, Mehtap Cevik, Belgin Susleyici. (2021). DRD2 Geni TaqI A Polimorfizminin Sigara Bağımlılığı İle İlişkisinin Araştırılması. İstanbul Bilim

University Florence Nightingale Journal of Medicine. 7 (1). doi: 10.5606/fng.btd.2021.25039

5. Gündüz, M. K., Çevik, M., Çağatay, P., Çiftçi, Ç., & Süşleyici, B. (2022). Oral Antidiyabetik Kullanımının, Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Adipogenez Metabolizmasında Görev Alan VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 Gen Anlatım Seviyelerine Etkileri. Dicle Tıp Dergisi, 49(1), 142-150.

6. Melike Ulker, Ozge Catmaz, Mehtap Cevik, Kıvanc Bezci, Elifcan Gezer, Selen Yurdakul, Betül Cengiz Elcioglu, İsmail Polat Canbolat, Cavlanc Ciftci, Belgin Susleyici. Association of CYP2C19 *2 and *3 Gene Polymorphisms with Clinical Cardiovascular Events in Patients Using Clopidogrel. (Under Consideration/EMU Journal of Pharmaceutical Sciences).

1.3 Atıflar

1. Cevik, M., Dartan, G., Ulker, M., Bezci, K., Deliorman, G., Cagatay, P., ... & Susleyici, B. (2020). Evaluation of cytotoxicity and mutagenicity of wastewater from Istanbul: data from hospitals and advanced wastewater treatment plant. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 104(6), 852-857.

1.1. Al-Quraan, N. A., Abu-Rub, L. I., & Sallal, A. K. (2020). Evaluation of bacterial contamination and mutagenic potential of treated wastewater from Al-Samra wastewater treatment plant in Jordan. Journal of Water and Health, 18(6), 1124-1138.

1.4 Uluslararası Kongreler

1.4.1 Poster Sunumlar

1. The Effects of Oxidative Stress Agents on FTO and CD68 gene expressions and free radical production in 3T3-L1 Adipocytes. Koldemir-Gunduz M, Cevik M, Cagatay P, Aydın A, Susleyici Duman B. International Symposium on Advances in Predictive and Personalized Medicine “Bridging Nations in Istanbul: Personalized and Predictive Medicine in Turkey”, 2-3 April 2015, Istanbul, Turkey.

2. Effects of Fluoxetine HCl on Oxidative Stress Parameters in Zebrafish. Kaymak G, Koldemir-Gunduz M, Cevik M, Esmer HE, Tartar S, Kayhan FE, Susleyici-Duman B.

The 3rd International Gen-Arel Molecular Biology and Genetics Student Congress. 24-25 April 2015, Istanbul, Turkey.

3. The effects of cytotoxic agents over NIBAN gene expression and 3T3-L1 adipocyte proliferation. Cevik M, Koldemir-Gunduz M, Susleyici-duman B. 3rd ESPT Conference. Integration of Pharmacogenomics in Clinical Desicion Support 7-9 October 2015, Budapest, Hungary.

4. “Oxidative Stress Parameters in Zebrafish Brain Tissue After Exposed to Prozac”, Kaymak G, Koldemir Gunduz M, Tartar S, Esmer HE, Cevik M, Kayhan FE, Susleyici Duman B. 2nd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, Istanbul, Turkey, November 27-29, 2015.

5. Effects of Fluoxetine HCl on AML-12 Hepatocytes Proliferation by iCELLigence System. Koldemir Gunduz M, Cevik M, Kaymak G, Esmer HE, Tartar S, Esin Kayhan F, Susleyici Duman B. IVEK 2nd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies. Istanbul, Turkey 27-29 November 2015.

6. The Role Of Apolipoprotein B Polymorphisms In Essential Hypertension. Cevik M, Koldemir Gunduz G, Cagatay P, Ciftci C, Susleyici-Duman B. 1st Pharmacogenomics Istanbul Summit, Increasing the Safety and Effectiveness of Personalized Therapy for Metabolic Disorders. Istanbul on November 27-28, 2015.

7. The Effects of Glipizide and Acarbose on Obesity and Glucose Metabolism in 3T3-L1, AML-12 Cell Lines and Their Co-culture. Koldemir-Gunduz M, Cevik M, Cagatay P, Susleyici-Duman B. 8th Santorini Conference “Systems medicine and Personalised Health and Therapy”. 3-5 October 2016, Santorini, Greece.

8. Association of CYP2C19 gene rs4986893 polymorphism with clinical cardiovascular events in patients using Clopidogrel. Ulker M, Cevik M, Bezci K, Gezer E, Catmaz O, Yurdakul S, Cengiz-Elcioglu B, Canbolat IP, Karaalp A, Ciftci C, Susleyici B. 4th ESPT Conference Integration of Pharmacogenomics in Clinical Decision Support 4-7 October 2017, Catania, Italy.

9. Genetic Polymorphisms of CYP3A4*1B In Patients With Coronary Artery Disease Using Statin. Gezer E, Cevik M, Bezci K, Ulkerm, Catmaz O, Yurdakul S, Cengiz

Elcioglu B, Canbolat IP, Karaalp A, Ciftci C, Susleyici B. 4th ESPT Conference. Integration of Pharmacogenomics in Clinical Decision Support 4-7 October 2017. Catania, Italy.

10. Association Of CYP2C19 Gene rs4244285 Polymorphism With Clinical Cardiovascular Events In Patients Using Clopidogrel. Catmaz O, Cevik M, Gezer E, Bezci K, Ulker M, Yurdakul S, Elcioglu- Cengiz B, Canbolat- Polat İ, Karaalp A, Ciftci C, Susleyici B. 4 th ESPT Conference. Pharmacogenomics and Personalised Medicine: research progress and clinical implementation 4-7 October 2017, Catania, Italy.

11. Investigation Of CYP2C9*2 Polymorphism In Patients With Cardiovascular Disease Using Warfarin. Bezci K, Cevik M, Gezer E, Ulker M, Catmaz O, Yurdakul S, Elcioglu-Cengiz B, Canbolat IP, Karaalp A, Ciftci C, Susleyici B. 4th ESPT Conference. Pharmacogenomics and Personalised Medicine: Research Progress and Clinical Implementation 4-7 October 2017, Catania, Italy.

12. Pharmacogenetic Prediction of Metoprolol Effectiveness in Turkish Patients with Coronary Artery Disease. Susleyici B, Karaalp A, Cevik M, Yurdakul S, Cengiz Elcioglu B, Canbolat IP, Ciftci C, Van Schaik R. 4th ESPT Conference Integration of Pharmacogenomics in Clinical Decision Support 4-7 October 2017, Catania, Italy.

13. The Effects of Clopidogrel on DNA damage in Adipocyte and Hepatocyte Cell Lines. Bayar E, Cevik M, Caker S, Susleyici B. 4th ESPT Conference. Integration of Pharmacogenomics in Clinical Decision Support 4-7 October 2017. Catania, Italy.

14. Investigation Of The Effects Of Clopidogrel In AML12 Hepatocyte Cell Line Over Mitochondrial Activity. Mitochondrial Activity. Karabay CM, Kutlu D, Carpar E, Cevik M, Susleyici B. 5th National & 3 rd Mediterranean Congress for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders. 12-15 October 2017, Antalya, Turkey

15. Investigation Of The Effects Of Clopidogrel In AML12 Hepatocyte Cell Line Over Lysosomal Activity. Carpar E, Karabay MC, Kutlu D, Carpar E, Cevik M, Susleyici B. 5th National & 3 rd Mediterranean Congress for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders. 12-15 October 2017, Antalya, Turkey

16. Investigation of the Effects of Clopidogrel in AML Hepatocyte Cell Line Over Membrane Integrity. Kutlu D, Karabay MC, Carpar E, Cevik M, Susleyici B. 5th National & 3rd Mediterranean Congress for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders. 12-15 October 2017, Antalya, Turkey.
17. The Effects of Clopidogrel on CD68 Gene Expression in Adipocyte, Hepatocyte Cell Lines and Co-cultures. Bayar E, Cevik M, Caker S, Susleyici B. 5th National 3rd Mediterranean Congress for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders, 12-15 October 2017, Antalya-Turkey.
18. Effects of metformin on oxidative stress parameters in 3T3-L1 adipocytes by iCELLigence system. Koldemir Gunduz M, Cevik M, Cagatay P, Susleyici B. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies. 26-29 April 2017. Istanbul-Turkey
19. The Effects of Glipizide and Acarbose on Obesity and Glucose Metabolism in 3T3-L1, AML12 cell lines and their co-cultures. Koldemir Gunduz M, Cevik M, Cagatay P, Susleyici B. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies. 26-29 April 2017. Istanbul-Turkey
20. Pharmacogenetics Of Clopidogrel In Coronary Artery Disease Patients: Results From Turkish Clinical Practice. Susleyici B, Ciftci C, Karaalp A, Cevik M, Yurdakul S, Canbolat IP, Gezer E, Bezci K, Cagatay P, Van Schaik R. The 9th Santorini Conference Systems Medicine and Personalised Health & Therapy « The Odyssey From Hope To Practice » 30 September - 3 October 2018, Thira-Santorini, Greece.
21. The Efficiency of PPI Use in Turkish Patients: CYP2C19 Pharmacogenetic Testing. Susleyici B, Cevik M, Karaalp M, Yurdakul S, Canbolat IP, Gunduz H, Yazici G, Ceyhan B, Cagatay P, Ciftci C. 5th ESPT Congress Precision Medicine and Personalised Health, 16-18 October 2019, Seville, Spain
22. Tramadol: From CYP2D6 Pharmacogenetic Testing To Clinical Data. Cevik M, Karaalp A, Gunduz H, Yazici G, Cagatay P, Susleyici B. 5th ESPT Congress Precision Medicine and Personalised Health, 16-18 October 2019, Seville, Spain

23. Relationship of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Adverse Drug Responses In Patients With Colorectal Cancer. Tosun M, Cevik M, Sonmez O, Er O, Demir G, Oyan Uluc B, Guven Mert A, Deliorman G, Karaalp A, Susleyici B. 9th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 06-10 December 2020 Kars Turkey

1.4.2 Sözlü Sunumlar

1. The Effects Of Stem Cell Therapy On Cd68, Fto And Ran Expression In Fructose-Induced Metabolic Syndrome Rat Model For Personalized Therapy. Koldemir Gunduz M, Cevik M, Akın D, Beyhan Ozdas S, Demircan G, Ciftci C, Susleyici Duman B. 1st Pharmacogenomics Istanbul Summit, Increasing the Safety and Effectiveness of Personalized Therapy for Metabolic Disorders. Istanbul on November 27-28, 2015.

2. Is Mesenchymal Stem Cell Therapy Suitable For Reducing Insulin Resistance In Fructose-Induced Metabolic Syndrome Rat Model? Beyhan Ozdas S, Akin D, Demircan G, Yapıslar H, Ketenci S, Koldemir Gunduz M, Cevik M, Ciftci C, Susleyici Duman B. 1st Pharmacogenomics Istanbul Summit, Increasing the Safety and Effectiveness of Personalized Therapy for Metabolic Disorders. Istanbul on November 27-28, 2015.

3. Investigation of Gain Loss Deletion of Genomic Copy Number Variant in Children with Non syndromic Supernumerary Teeth. Menten AR, Peker B, Cevik M, Koldemir Gunduz M, Susleyici Duman B. Tooth Morphogenesis & Differentiation 2016 - Road to Finland. 13.06.2016-18.06.2016

4. BARX1 is down regulated in children with non syndromic supernumerary teeth. Menten AR, Pekel B, Cevik M, Koldemir Gunduz M, Susleyici Duman B. the Ninth International Symposium on Dental Enamel: "Enamel 9". 30.10.2016- 03.11.2016

5. Glipizidin Adipositlerde Glikoz Hemostazı ve Programlı Hucre Olumune Etkilerinin Molekuler Seviyede Araştırılması. Caker S, Cevik M, Koldemir Gunduz M, Bayar E, Susleyici B. IVEK IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies / 26-29 April 2017, Istanbul-Turkey

6. Effects of antidiabetics on oxidative stress parameters in liver metabolism. Koldemir Gunduz M, Kaymak G, Cevik M, Cagatay P, Susleyici B. 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 28-29 June 2019, Ankara, Turkey

7. The effects of oral antidiabetics on adipogenesis related gene expressions in 3T3-L1, AML12 cell lines and their co-cultures Koldemir-Gündüz M, Cevik M, Cagatay P, Süssleyici B. 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 28-29 June 2019, Ankara, Turkey

1.5 Ulusal Kongreler

1.5.1 Poster Sunumlar

1. Gerçek zamanlı iCELLigence sistem analiziyle 3T3-L1 adipositlerde akarboz sitotoksitesinin incelenmesi, Koldemir Gunduz M, Cevik M, Susleyici Duman B. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2015, Fethiye, Turkey

1.5.2 Sözlü Sunumlar

1. Sitotoksik Ajanların Niban Gen Anlatımı Ve 3t3-L1 Adipositlerinin Cogalmaları Uzerine Etkileri, Cevik M, Koldemir Gunduz M, Susleyici Duman B. 4. Ulusal, 1. Akdeniz Metabolik Hastalıklar ve Morbid Obezite Cerrahisi Kongresi, 2015 Antalya, Turkey

Projeler

1. Zebra Balığı Dokularında Antidepresan Etken Madde Fluoksetin HCl'nin Belirlenmesi. (Marmara Üniversitesi BAP/FEN-A-111115-0511), Araştırmacı

2. İstanbul Kalkınma Ajansı, Yenilikçi ve Yaratıcı İstanbul Mali Destek Programı, Bireye Özel Akılcı İlaç Kullanımına Yönelik Farmakogenetik Projesi, (TR10/16/YN/0030), Araştırmacı

3. Marmara Üniversitesi Sağlık Birimlerinin Atık Sularındaki Sitotoksik, Mutajenik, Genotoksik Kirleticilerin Saptanması ve Kaynağında Azaltılması (Marmara Üniversitesi BAP/FEN-B-200716-0375), Araştırmacı

4. Göztepe ve Haydarpaşa Kampüsleri Atık Sularında Kimyasal ve Biyolojik Kirlenmelerin Belirlenmesi: Kaynağında Azaltılması Yönünde Çözümlerin Sunulması, (FEN-B-200716-0380), Araştırmacı

Ödüller ve Burslar

1. The Effects Of Stem Cell Therapy On Cd68, Fto And Ran Expression In Fructose-Induced Metabolic Syndrome Rat Model For Personalized Therapy. En İyi Sözlü Sunum Üçüncülük Ödülü. 1st Pharmacogenomics Istanbul Summit, Increasing the Safety and Effectiveness of Personalized Therapy for Metabolic Disorders, 27-28 Kasım, 2015.

2. TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, 2015.

3. The Role Of Apolipoprotein B Polymorphisms In Essential Hypertension. En iyi poster sunum ikinciliği. 1st Pharmacogenomics Istanbul Summit: Increasing the Safety and Effectiveness of Personalized therapy for Metabolic Disorders, 27-28 Kasım, 2015.

4. TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı, 2017-2020.

Üyelikler

Farmakogenomik ve Bireyselleştirilmiş Tedavi Derneği (Kurucu Üye, Denetim Kurulu Asil Üye)

Uluslararası Dergilerde Hakemlik

Toxicology Mechanisms and Methods dergisinde “The mechanism of miR-363-3p/DUSP10 signaling pathway involved in the gastric mucosal injury induced by clopidogrel” başlıklı makalenin hakemliğini yaptım. Makale No: UTXM-2020-0283.R1