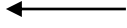


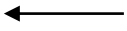
Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra eğer basılacak ise yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

METASTATİK KOLOREKTAL KANSER
HASTALARINDA BİYOBELİRTEÇLER OLARAK
EPIGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI

ELA TUĞRUL KARATAŞ

DANIŞMAN
PROF. DR. SİBEL ÖZDEN

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ela Tuğrul Karataş

İTHAF

Canım ailem ve sevgili eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Kendisini tanıma fırsatı bulabildiğim için onur duyduğum, mesleki vizyonumun gelişmesinde büyük katkısı olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve üzerimde çok fazla emeği olan değerli tez hocam Prof. Dr. Sibel Özden'e,

Doktora yolumda desteğini her zaman yanımda hissettiğim, bakış açısıyla yolumu aydınlatan değerli hocam Prof. Dr. Gül Özhan'a, tez sürecimde her daim yardımcı dokunan sevgili meslektaşım Ecz. Zeynep Rana Güler'e ve tüm İ.Ü. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı üyelerine,

Zorlu doktora sürecimde her zaman yanımda olan, desteklerini esirgemeyen çok değerli iş arkadaşlarım Prof. Dr. Sadi Konuk E.A.H. Tıbbi Sarf Birimi'ne,

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan, bu güç yolculukta her daim yanımda olan, desteklerini esirgemeyen ve üyeliğinden gurur duyduğum sevgili ailem; annem Fatma Tuğrul, babam Uzm. Dr. Necip Tuğrul ve sevgili kardeşim Dt. Erel Tuğrul'a

Anlayışı, şefkati, sevgisi ve tüm benliğiyle yolumu yoluna katan, bu süreçte elimi asla bırakmayan çok değerli sevgili eşim Uzm. Dr. Muhammet Osman Karataş'a, Saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-36935

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kolorektal Kanser (CRC)	2
2.2. Epigenetik	4
2.2.1. DNA Metilasyonu	6
2.2.2. Histon Modifikasyonları	10
2.2.3. Mikro RNA'lar.....	12
2.2.3.1. CRC'deki miRNA'lar	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	27
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	27
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	28
3.4. Hasta ve Kontrol Örneklerle ait Bilgiler	28
3.5. Çalışma Dışı Bırakma Kriteri	29
3.6. MikroRNA'ların Tayini	29
3.6.1. Total RNA İzolasyonu	29
3.6.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	30
3.6.3. cDNA Sentezi	31
3.6.4. miRNA Ekspresyonlarının miRNA PCR 'Assay'ler Kullanılarak Real-Time PCR ile Tayini.....	32
3.7. MiRNA'ların Hedef Aldığı Genlerin Ekspresyonlarının Tayini	34

3.8. İstatistiksel Değerlendirme	35
4. BULGULAR.....	37
4.1. CRC’li Hasta ve Kontrol Grubundan Alınan Örneklerle Ait Bilgiler	37
4.2. Hastalardan İzole Edilen RNA’ların Optik Dansite Sonuçları	37
4.3. MiRNA Sonuçları	39
4.4. <i>GAPDH</i> Referans Gene Göre Gen Ekspresyonu Sonuçları.....	41
4.5. <i>Beta-actin</i> Referans Gene Göre Gen Ekspresyonu Sonuçları.....	43
4.6. Kontrol ve Hastaların miRNA Sonuçları	46
4.7. <i>GAPDH</i> Referans Gene Göre Kontrol ve Hastaların Gen Ekspresyonu Sonuçları.....	47
4.8. <i>Beta-actin</i> Referans Gene Göre Kontrol ve Hastaların Gen Ekspresyonu Sonuçları	48
4.9. Demografik Koşullarına Göre Kontrol ve Hasta Gruplarının Karşılaştırılması.....	49
4.9.1. Yaşa göre kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılması.....	50
4.9.2. Cinsiyete göre hasta grubunun karşılaştırılması	52
4.9.3. Mortalite göre hasta grubunun karşılaştırılması.....	53
4.10. MiRNA ve Gen Ekspresyonları Arasında Korelasyon Varlığı.....	55
5. TARTIŞMA	59
KAYNAKLAR	66
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	96
ÖZGEÇMİŞ	97

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: CRC’de ekspresyonları değişikliğe uğrayan miRNA’lar ve hedef genleri...	16
Tablo 3-1: Ters transkripsiyon reaksiyon ürünlerinin hazırlanışı.....	31
Tablo 3-2: miRCURY LNA miRNA PCR Reaksiyon Ürünleri.....	32
Tablo 3-3: RT- PCR protokolü.....	33
Tablo 3-4: Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile tayininde kullanılan primer dizileri.....	34
Tablo 3-5: RT- PCR protokolü.....	35
Tablo 4-1: Çalışmaya alınan bireylerin demografik bilgileri	37
Tablo 4-2: Kontrol ve hasta grubundan alınan örneklerde total RNA miktarları ve saflıkları	38
Tablo 4-3: Çalışmaya alınan bireylerin miR-21, miR-31, miR-143, miR-196a sonuçları	39
Tablo 4-4: MiR-21, miR-31, miR-143, miR-196a için ortalama ve medyan değerleri..	41
Tablo 4-5: Çalışmaya alınan bireylerin GAPDH referans gene göre gen ekspresyonu sonuçları.....	41
Tablo 4-6: <i>GAPDH</i> referans genine göre <i>KRAS</i> , <i>HK2</i> , <i>BCL2</i> , <i>PTEN</i> ve <i>DNMT3A</i> için ortalama ve medyan değerleri.....	43
Tablo 4-7: Çalışmaya alınan bireylerin beta-actin referans gene göre gen ekspresyonu sonuçları.....	43
Tablo 4-8: <i>Beta-actin</i> referans genine göre <i>KRAS</i> , <i>HK2</i> , <i>BCL2</i> , <i>PTEN</i> ve <i>DNMT3A</i> için ortalama ve medyan değerleri.....	45
Tablo 4-9: Kontrol ve hasta grubunda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a ekspresyon seviyelerinin ortalama ve medyan değerleri	46
Tablo 4-10: Kontrol ve hasta grubunda <i>GAPDH</i> referans genine göre <i>KRAS</i> , <i>HK2</i> , <i>BCL2</i> , <i>PTEN</i> ve <i>DNMT3A</i> ekspresyon seviyelerinin ortalama ve medyan değerleri.....	47
Tablo 4-11: Kontrol ve hasta grubunda <i>Beta-actin</i> referans genine göre <i>KRAS</i> , <i>HK2</i> , <i>BCL2</i> , <i>PTEN</i> ve <i>DNMT3A</i> ekspresyon seviyelerinin ortalama ve medyan değerleri....	48
Tablo 4-12: Yaş, mortalite ve cinsiyete göre kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılması.....	49
Tablo 4-13: Hastalarda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a medyan değerlerinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması	50

Tablo 4-14: Hasta grubunda <i>GAPDH</i> referans genine göre <i>KRAS</i> , <i>HK2</i> , <i>BCL2</i> , <i>PTEN</i> ve <i>DNMT3A</i> gen değerlerinin yaş grubuna göre karşılaştırılması.....	51
Tablo 4-15: Hasta grubunda <i>Beta-actin</i> referans genine göre <i>KRAS</i> , <i>HK2</i> , <i>BCL2</i> , <i>PTEN</i> ve <i>DNMT3A</i> gen değerlerinin yaş grubuna göre karşılaştırılması.....	51
Tablo 4-16: Hastalarda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a medyan değerlerinin cinsiyete göre karşılaştırılması.....	52
Tablo 4-17: Hasta grubunda <i>GAPDH</i> referans genine göre <i>KRAS</i> , <i>HK2</i> , <i>BCL2</i> , <i>PTEN</i> ve <i>DNMT3A</i> gen değerlerinin cinsiyete göre karşılaştırılması.....	52
Tablo 4-18: Hasta grubunda <i>Beta-actin</i> referans genine göre <i>KRAS</i> , <i>HK2</i> , <i>BCL2</i> , <i>PTEN</i> ve <i>DNMT3A</i> gen değerlerinin cinsiyete göre karşılaştırılması	53
Tablo 4-19: Hastalarda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a medyan değerlerinin, mortaliteye göre karşılaştırılması.....	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: 2022 yılında görülen yeni kanser vaka sayıları.....	2
Şekil 2-2: IARC tarafından hazırlanan 2050 yılına kadar tahmini CRC vaka sayıları.....	3
Şekil 2-3: Epigenetik modifikasyonlar.....	5
Şekil 2-4: Nükleozomun yapısı.....	5
Şekil 2-5: A. Heterokromatin, B. Ökromatin.....	6
Şekil 2-6: DNA metilasyonu.....	7
Şekil 2-7: DNA metilasyonunun aracılık ettiği gen sessizleşmesi mekanizması.....	8
Şekil 2-8: Histon modifikasyonları.....	11
Şekil 2-9: miRNA biyogenezi.....	15
Şekil 4-1: Kontrole kıyasla kontrol ve hasta grubunda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a relatif ekspresyon seviyelerinin ortalama değerleri	46
Şekil 4-2: Kontrole kıyasla kontrol ve hasta <i>KRAS</i> , <i>HK2</i> , <i>BCL2</i> , <i>PTEN</i> ve <i>DNMT3A</i> relatif ekspresyon seviyelerinin (<i>GAPDH</i> 'e göre) ortalama değerleri.....	48
Şekil 4-3: Kontrole kıyasla kontrol ve hasta <i>KRAS</i> , <i>HK2</i> , <i>BCL2</i> , <i>PTEN</i> ve <i>DNMT3A</i> relatif ekspresyon seviyelerinin (<i>beta-actin</i> 'e göre) ortalama değerleri	49
Şekil 4-4: Yaşa göre kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılması.....	50
Şekil 4-5: MiR-143 ve <i>Beta-actin</i> referans genine göre genlerin ekspresyonları arasında korelasyon.....	56
Şekil 4-6: MiR-31 ve <i>beta-actin</i> referans referans genine göre <i>HK-2</i> ekspresyonları arasında korelasyon.....	57
Şekil 4-7: MiR-196 ve <i>beta-actin</i> referans referans genine göre <i>HK-2</i> ekspresyonları arasında korelasyon.....	58

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

3'-UTR: 3' çevrilmemiş bölge

5-caC: 5-karboksilsitozin

5-fC: 5-formilsitozin

5-hmC: 5-hidroksimetilsitozin

5-mC: 5-metilsitozin

APC: adenomatöz polipozis koli

BCL2: BCL2 apoptoz düzenleyici

BRCA1: meme kanseri 1

CDKN2A: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A

-CH3: Bir metil grubu

CpG: Sitozin-fosfat-guanozin

CRC: Kolorektal kanser

DKK2: 'dickkopf WNT sinyal yolu inhibitörü 2'

DNMT: DNA metiltransferaz

ECRG4: 'ECRG4 augurin precursor'

GATA4: GATA bağlayıcı protein 4

GATA5: GATA bağlayıcı protein 5

GCO: Küresel Kanser Gözlemevi, The Global Cancer Observatory

GSTP1: Glutasyon S-transferaz pi 1

H2A, H2B, H3 ve H4: Histon proteini 2A, 2B, 3,4

HAT: histon asetiltransferaz

HDAC: histon deasetilaz

HIC1: kanserde hipermetilasyon 1

HRas: HRas proto-onkogen

IARC: Uluslararası Kanser Ajansı

IGFB7: insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 7

K: Lizin

KLL: kronik lenfositik lösemi

LINE1: Uzun dağılmış nükleer eleman

MBD: Metil CpG bağlanma alanı

MGMT: metilguanin-DNA metiltransferaz

miRISC: miRNA susturma kompleksi

MiRNA: MikroRNA

MLH1: mutL homolog 1

MYC: proto-onkogen c-myc

n: Kişi sayısı

onko-miR: Onkogenik miR

onkosupresör- miR: tümör baskılayıcı miR

Ort.: Aritmetik ortalama

p2: siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A

pre-miRNA: öncü miRNA

pri-miRNA: birincil miRNA

r: Etki Büyüklüğü

RASSF1A: ‘ras association domain family member 1’

RISC: RNA kaynaklı susturma kompleksi

SAH: S-adenosil-homosisteine

SAM: S-adenosil-L-metiyonin

SFRP1/2: salgılanan apoptoz ilişkili protein ½

SS : Standart sapma

TET: On-onbir translokasyon

THBS1: trombospondin 1

TIMP3: metalloproteinazların doku inhibitörü 3

TNM: Tümör-nod-metastaz

TP53: Tümör proteini P53

ÖZET

Tuğrul Karataş, E. (2024). Metastatik Kolorektal Kanser Hastalarında Biyobelirteçler olarak Epigenetik Değişikliklerin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kolorektal kanser (CRC), en sık görülen kanserlerden biridir ve dünya çapında kansere bağlı mortalitenin ikinci önde gelen nedenidir. CRC’de erken evrelerde tespit iyi prognoz ile ilişkilidir. Kolonoskopi gibi mevcut tarama yöntemleri invaziv ve yüksek maliyetlidir. Bu nedenle, erken nüks veya kötü prognozlu hastaların tanımlanmasını kolaylaştıracak ve sistemik metastazlı hastaların daha erken teşhisine izin verecek invaziv olmayan biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Epigenetik üzerine gerçekleştirilen son araştırmalar, mikro RNA (miRNA)'ların kanda bulunması erken teşhis, risk değerlendirmesi ve kanserlerin sınıflandırılmasında yararlı biyogöstergeler olduğu bildirilmiştir. miRNA’larda epigenetik değişikliklerin incelenmesi oldukça spesifik biyobelirteçlerin ortaya çıkmasında umut vericidir. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Onkoloji Anabilim Dalı'na başvuran en az 50 gönüllü metastatik kolorektal kanser (mCRC) hastasından ve hasta olmayan control grubundan alınan periferik kan örneklerinden izole edilen mRNA'larda CRC ile ilişkili miRNA'ların regülasyonunun ve bu miRNA'ların hedef genlerin ekspresyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Elde edilen verilere göre, kolorektal kanserde miR-21, miR-31, miR-143 ve miR196a ve bu miRNA’ların hedef aldığı *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* genlerinde değişiklikler gözlenmiştir. Bu projeden elde edilen sonuçlar ışığında; miRNA’ların, mCRC hastalarında umut verici non-invaziv, prognostik ve metastaz öngörücü biyobelirteç olarak kullanılmasında katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, epigenetik, mikroRNA, kan, biyobelirteç

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-36935

ABSTRACT

Tugrul Karatas, E. (2024). Evaluation of Epigenetic Alterations as Biomarkers in Metastatic Colorectal Cancer Patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Doktora Tezi. İstanbul.

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequent cancers, and the second leading cause of cancer-related mortality worldwide, but early detection is associated with good prognosis. Current screening methods such as colonoscopy are invasive and costly. Therefore, there is a need for non-invasive biomarkers that will facilitate the identification of patients with early recurrence or poor prognosis, and permit earlier diagnosis of the patients with systemic metastases. Recent studies have reported that the presence of micro RNAs (miRNAs) in the blood are useful biomarkers for early diagnosis, risk assessment and classification of cancers. Investigation of epigenetic changes in miRNAs is promising in the emergence of highly specific biomarkers due to their ease of obtaining. Regulation of CRC-related miRNAs in mRNAs isolated from peripheral blood samples taken from the non-patient control group and at least 50 volunteer metastatic colorectal cancer (mCRC) patients who applied to the Department of Internal Medicine, Department of Oncology, Istanbul University Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Faculty of Medicine, and it was aimed to investigate the effects of these miRNAs on the expression of target genes. According to the data obtained, changes in miR-21, miR-31, miR-143 and miR196a and in the *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* genes targeted by these miRNAs were observed in colorectal cancer. In light of the results to be obtained from the project; It is thought that miRNAs will contribute to the use of promising non-invasive, prognostic and metastasis predictive biomarkers in mCRC patients.

Key Words: Colorectal cancer, Epigenetic, microRNA, blood, biomarker

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDK-2021-36935

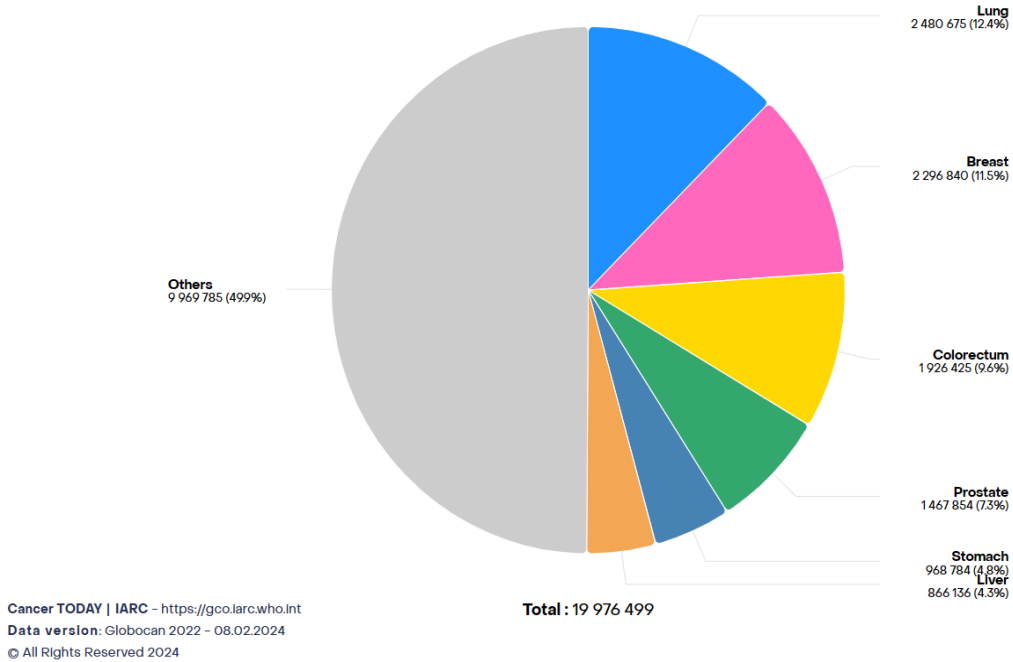
1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser (CRC), kanserle ilişkili ölümlerin başında gelmektedir. CRC, dünya çapında görülme sıklığının artması ve sağkalım oranlarının düşük olması sebebiyle endişe vericidir. CRC, sağlıklı yaşam tarzına sahip olan kişilerde özellikle sigara ve alkol kullanımı, hareketsizlik, artmış kırmızı et tüketimi ve obezite gibi risk etmenleri ile ilişkilendirilmiş (Siegel ve ark., 2023), düzenli fiziksel aktiviteye ve beslenmeye sahip bireylerde ise CRC'ye karşı korumanın gözlendiği bildirilmiştir (WCRF/AICR, 2018). CRC'nin yavaş ilerleyen seyri ve prekanseröz lezyonlara rezeksiyon uygulanabilmesi hastalığı erken dönemde önleyebilme şansı vermektedir. Ancak, hastalarda geç evreye kadar semptomların ortaya çıkmaması sağkalım oranlarının düşmesine sebep olmaktadır (Rawson ve Bapat, 2012). CRC vakalarının %90-95'i adenokarsinomdur. CRC'nin birincil lezyonu olan adenomların lokalize olması, asemptomatik özellikleri geç tanıya sebebiyet vermektedir. Birincil tanıda rezeksiyonla tedavi edilen hastaların %45'i nüks yaşamaktadır. Bu nedenle erken tanı için rutin tarama yapılması ve CRC belirteçlerinin geliştirilmesi önem kazanmıştır (Wang ve ark., 2014). Günümüzde kullanılan tanı yöntemlerinin invaziv olması, yüksek maliyeti ve komplikasyon geliştirme riski daha kolay kullanımı olan, maliyeti düşük ve hasta uyumunu arttıran spesifik biyobelirteçlerin tespitini hızlandırmıştır (Rawson ve Bapat, 2012; Ionescu ve ark., 2023). Özellikle, son yıllarda yapılmış çalışmalarda önemli epigenetik regülasyonlardan olan mikroRNA (miRNA)'ların anormal ekspresyonunun CRC'nin oluşumu ve ilerlemesi üzerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Lin ve ark., 2017). Epigenetik çalışmalar; hastalığın erken evrelerde tespiti, metastazın önlenmesi ve sağkalım oranını artırma ile umut vaat etmektedir. Geçmişten günümüze kanser epigenetiği çalışmaları kanser türleri için yeni biyobelirteçler geliştirmeye olanak sağlamıştır. Son kanıtlar dolaşımdaki miRNA'lar ile CRC'de görülen fizyolojik ve patolojik değişiklikleri invaziv bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Wang ve ark., 2014). Doktora tez çalışmasında kolorektal kanserin erken tanı ve prognozuna yarar sağlayacak biyobelirteçlerin daha iyi anlaşılacak gelecekte kullanımı kolay, maliyeti düşük ve hasta uyumunu kolaylaştıran biyobelirteçlerin geliştirilmesinde miRNA'ların rolünün araştırılması hedeflenmiştir.

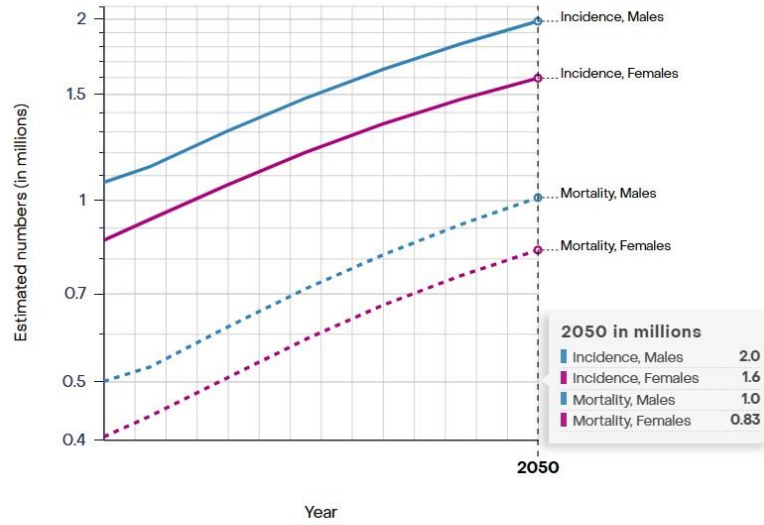
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser (CRC)

CRC, gastrointestinal sistemde kolon veya rektumdan köken alan malignitelerdir (Arnold ve ark., 2017). CRC, genetik ve epigenetik değişikliklerin kademeli olarak birikimi sonucunda normal kolon mukozasının invaziv kansere dönüşümü ile meydana gelir (Binefa ve ark., 2014). Dünya çapında kanser istatistiklerini web tabanlı bir platformda sunan Küresel Kanser Gözlemevi (The Global Cancer Observatory, GCO)'nin projesi olan GLOBOCAN verilerine göre 2022 yılı yeni kanser vakaları arasında CRC 1.926.425 vaka (%9.6) ile üçüncü, malignitelerle ilişkili ölümler arasında 904.019 vaka (%9.3) ile ikinci sıradadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2022 yılında görülen yeni kanser vaka sayıları Şekil 2-1'de verilmiştir. GCO verilerine göre yaşa göre standardize edilmiş insidans ve mortalite oranları sırasıyla Avrupa'da %27,9 ve %27,4, Kuzey Amerika'da %9,5 ve %7,3 ve Asya'da %50,2 ve %51,1'dir. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) 2050 yılına kadar yeni CRC vakalarının 3,6 milyona, CRC'ye bağlı ölüm oranlarının ise 1,83 milyona ulaşacağını öngörmektedir (Şekil 2-2) (WHO, 2024).



Şekil 2-1: 2022 yılında görülen yeni kanser vaka sayıları (WHO, 2024).



Cancer Tomorrow | IARC - <https://gco.iarc.who.int>
 Data version: Globocan 2022 (version 11) - 08.02.2024
 © All Rights Reserved 2024

Şekil 2-2: IARC tarafından hazırlanan 2050 yılına kadar tahmini CRC vaka sayıları (WHO, 2024).

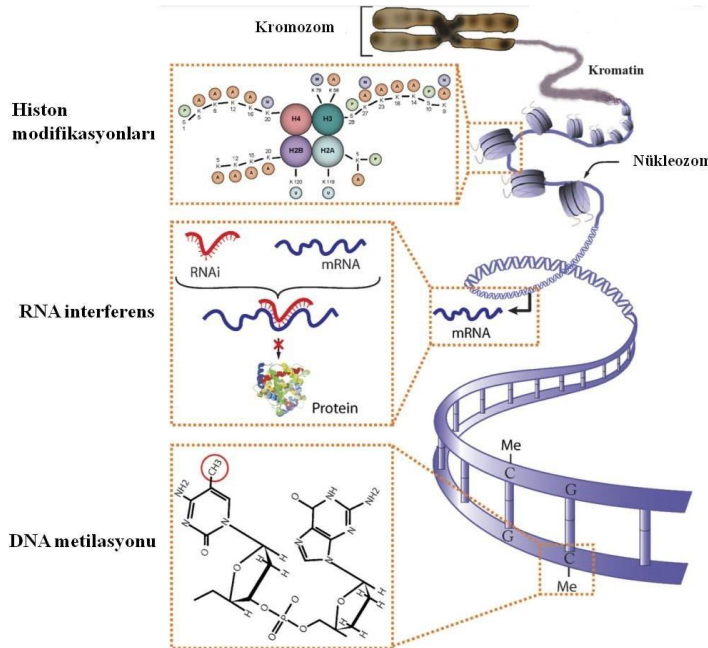
Epidemiyolojik çalışmalar CRC'yle ilgili değiştirilebilir ve değiştirilemeyen risk faktörlerini tanımlamıştır. Yaş, cinsiyet, boy, lynch sendromu, adenomatöz polipozis ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarına sahip aile öyküsü değiştirilemeyen risk faktörleri; obezite, alkol ve sigara kullanımı, işlenmiş et ve kırmızı et tüketimi gibi değiştirilebilir risk faktörleri olarak kategorize edilmiştir (Fadaka ve ark., 2019; Wang ve ark., 2019). CRC, 50 yaş üstü kişilerin yanı sıra günümüzde 50 yaş altında da görülmekle birlikte erkeklerde daha baskındır (Brenner ve ark., 2010; Siegel ve ark., 2023). 2015 yılında Thrift ve ark. tarafından yapılan çalışmada artan boy uzunluğu kadınlarda CRC riskindeki artışla ilişkilendirilmiştir (Thrift ve ark., 2015). Fiziksel aktivite (Harriss ve ark., 2009), aspirin veya diğer non-steroidal antienflamatuvar ilaç kullanımı (Rothwell ve ark., 2010; Wang ve ark., 2018), kadınlarda postmenopozal hormon kullanımı (Lin ve ark., 2012), kalsiyum (Huncharek ve ark., 2008), folat (Bouras ve ark., 2023), meyve, sebze ve lifli gıdaların tüketimi (Park ve ark., 2005) düşük CRC riski ile ilişkili bulunmuştur.

Tümör-nod-metastaz (TNM) evreleme sisteminde tümör lokalizasyonu, hücre tipi, tümör tipi, metastaz derecesi ve tümör derecesine göre sınıflandırma yapılmaktadır (Fadaka ve ark., 2019). TNM evrelemesi CRC için terapötik kararları yönlendirmeye

yardımcı olan önemli bir prognostik sınıflandırma aracı olarak kullanılmaktadır (Schetter ve ark., 2012). Metastatik CRC (Evre IV) yaklaşık %14'lük 5 yıllık sağkalım oranına sahiptir ve mortalite oranı yüksek bir hastalık olmaya devam etmektedir (Rumpold ve ark., 2020; Shin ve ark., 2023).

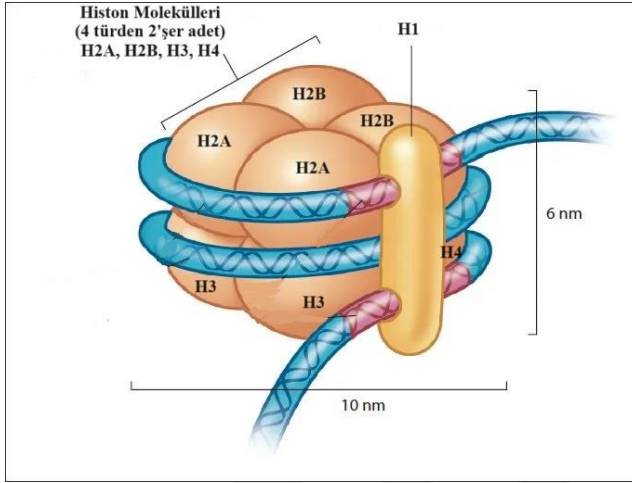
2.2. Epigenetik

'Epigenetik', DNA dizisini etkilemeden kromatin yapısındaki kalıtsal değişiklikler sonucunda gen ekspresyonlarında gözlenen değişiklikleri inceleyen bilim dalıdır (Delcuve ve ark., 2009). Conrad Waddington, "epigenetik" terimini ilk kez, DNA dizisinde değişiklik meydana gelmeden hücre fenotipde görülen kalıtsal değişiklikler olarak tanımlamıştır (Dawson ve Kouzarides, 2012). Epigenetik mekanizmalar kromatinin yapısında değişikliğe sebep olur, ancak hücre büyümesi esnasında stabil olan DNA dizisinde değişiklik göstermeden gen ekspresyonunun düzenlenmesini sağlar (Miranda Furtado ve ark., 2019). Kromatin bazlı olayların DNA şablonu üzerindeki süreçlerini düzenleyen epigenetik modifikasyonların kanserin gelişimi ve ilerlemesindeki rolü ve tersine çevrilebilir özellikleriyle günümüzde genomik araştırmaların odağı haline gelmiştir (Dawson ve Kouzarides, 2012). Kanserle ilişkili başlıca epigenetik modifikasyonlar; DNA metilasyonu, histonların post-translasyonel modifikasyonları ve miRNA'lardaki değişikliklerdir (Şekil 2-3) (Sawan ve ark., 2008).



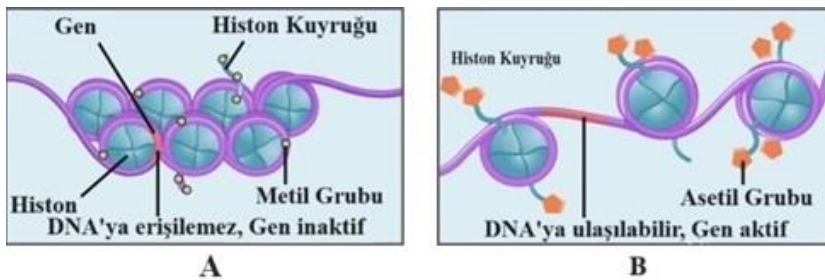
Şekil 2-3: Epigenetik modifikasyonlar (Sawan ve ark., 2008).

Kromatin, çekirdekteki proteinlerle ilintili kromozomal DNA kompleksidir (Rezapour ve ark., 2019). Kromatinin temel birimi olan nükleozom çekirdeği 147 bp'lik DNA ipliğini dört çekirdek histon proteininden (H2A, H2B, H3 ve H4) meydana gelen bir oktomerin etrafına sarar (Şekil 2-4) (Biswas ve Rao, 2017; Mescher, 2018).



Şekil 2-4: Nükleozomun yapısı (Mescher, 2018).

Kromatin, ökromatin ve heterokromatin olmak üzere ikiye ayrılır. Ökromatin daha az yoğunlaşmanın görüldüğü aktif; heterokromatin ise daha fazla yoğunlaşmış inaktif DNA bölgesidir. Epigenetik mekanizmalar heterokromatin ve ökromatin durumunu düzenleyerek genlerin transkripsiyonel olarak aktif veya inaktif olmasını sağlamaktadır (Şekil 2-5) (Mobley, 2019; Castro-Muñoz ve ark., 2023).

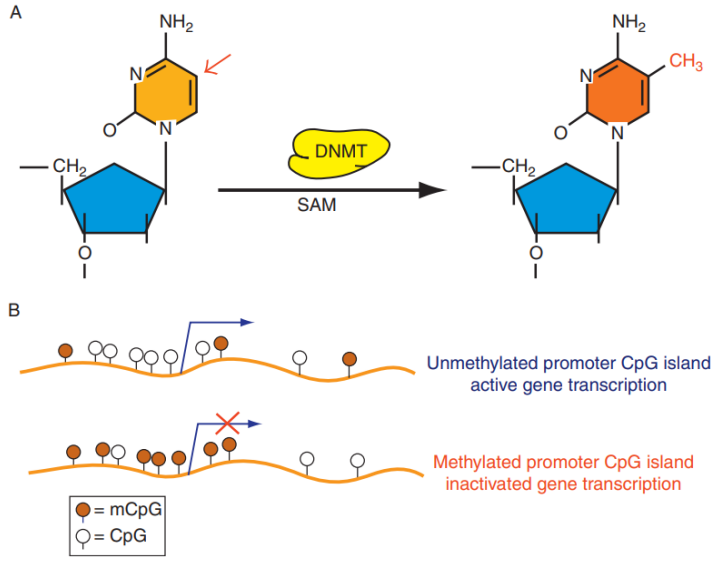


Şekil 2-5: A. Heterokromatin, B. Ökromatin (Mobley, 2019).

Birbirini güçlendiren bu üç mekanizmadan birinde veya birkaçında görülen değişiklikler gen ekspresyonunun aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olarak kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır (Liu ve ark., 2014).

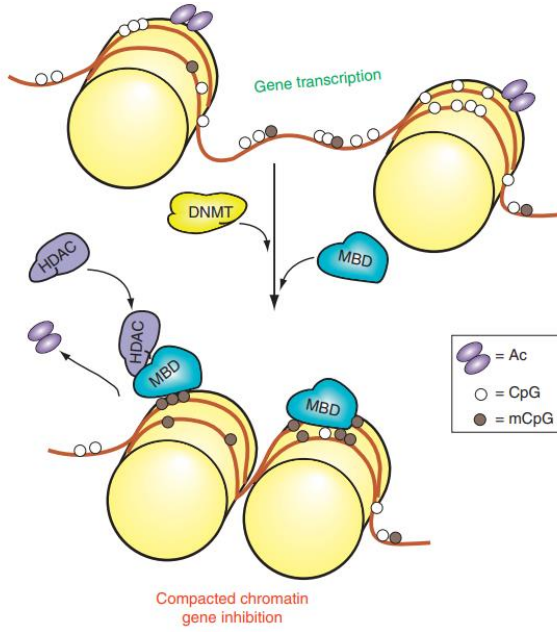
2.2.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu en fazla çalışılan epigenetik modifikasyon olmasının yanı sıra iyi bilinen epigenetik belirteçlerden biridir (Miranda Furtado ve ark., 2019). DNA metilasyonu; bir metil grubunun ($-CH_3$), DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri ile sitozin-fosfat-guanozin (CpG) dinükleotidlerindeki sitozinin 5 numaralı karbonuna kovalent bağlanması ve 5-metilsitozin (5-mC) oluşumu ile görülen tersine çevrilebilir ana epigenetik mekanizmadır (Jones ve Baylin, 2002; Kulis ve Esteller, 2010; Park ve Han, 2019). Kanserde; 5-mC'in genel kaybı (global hipometilasyon) ve gen promotörleriyle ilişkili CpG adalarında görülen hipermetilasyon olmak üzere iki farklı anormal DNA metilasyonu görülmektedir (Gokul ve Khosla, 2012). Bu epigenetik modifikasyon, metil sağlayıcı S-adenosil-L-metiyonin (SAM) kullanılarak DNMT enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2-6) (Biswas ve Rao, 2017). Besin takviyesi olarak yaygın bir şekilde kullanılan SAM, metiyonin ve ATP'den oluşmaktadır (Fandy ve Gore, 2010). SAM, DNMT'ler tarafından metil grubu bağlanmasından sonra S-adenosil-homosisteine (SAH) çevrilir (Fandy ve Gore, 2010; Biswas ve Rao, 2017). Memelilerde 5 farklı DNMT gözlenmiştir. Bunlar DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve izoformu DNMT3L'dir (Han, 2010; Castro-Muñoz ve ark., 2023). DNA metilasyonunun büyük bir kısmında yer alan DNMT1 tanımlanan ilk metiltransferazdır. Yapılan çalışmalarda 5-mC içeren DNA'ya sahip ökaryotların neredeyse tamamında DNMT1 homologları tespit edilirken, 5-mC içermeyenlerde bulunmamıştır (Gokul ve Khosla, 2012). DNMT1 yarı metillenmiş CPG bölgelerini, de novo metil transferazlardan DNMT3A ve DNMT3B ise metillenmemiş CPG'leri hedefleyerek metil grubu bağlarlar (Kanwal ve Gupta, 2010).



Şekil 2-6: DNA metilasyonu. A. SAM varlığında DNMT tarafından katalize edilen sitozinin 5 pozisyonundaki metilasyon, B. Promotör bölgedeki metillenmemiş CpG'ler transkripsiyonu ortadan kaldırmaz, gen eksprese edilir; promotör bölgedeki metillenmiş CpG'ler transkripsiyonu ortadan kaldırır, gen ekspresyonu inhibe edilir (Kulis ve Esteller, 2010).

DNA metilasyonu; transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını engelleyerek doğrudan, metil CpG bağlama alanı (MBD) proteinleri ile birlikte dolaylı yoldan gen ekspresyonunu inhibe eder (Şekil 2-7). CpG metilasyonunda oluşan 5-mC, metil CpG bağlama alanı (MBD) proteinleri için bir alan haline gelir (Biswas ve Rao, 2017). MBD'ler gen promotörlerine karşı oldukça yüksek spesifikliğe sahiptir ve hipermetilasyon ile transkripsiyonu baskılanarak susturulmuş kanserle ilişkili genlerin lokuslarında bulunmuştur (Gokul ve Khosla, 2012). MBD ailesi beş çekirdek protein MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 ve metil CpG bağlayıcı protein 2 (MeCP2) den oluşur (Biswas ve Rao, 2017). MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 ve MeCP2 5-mC bölgesinde kromatin yeniden modelleme kompleksi veya histon modifiye edici enzimlerdeki proteinlerle birlikte transkripsiyonel baskılamayı kolaylaştırır (Grady, 2005; Park ve Han, 2019). MBD2'nin kolon kanseri ile ilişkili tümör baskılayıcı genlerden *siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A* (*CDKN2A*, *p14^{ARF}*, *p16^{INK4A}* gibi) hipermetilasyona uğramış promotörlerine bağlanarak bunların ekspresyonlarını inhibe ettiği tespit edilmiştir (Gokul ve Khosla, 2012).



Şekil 2-7: DNA metilasyonunun aracılık ettiği gen sessizleşmesi mekanizması. DNA metilasyonunu MBD ve histon deasetilaz (HDAC)'ların birleşimi takip eder. Sonucunda kromatin yoğunlaşması ve gen inaktivasyonu görülür (Kulis ve Esteller, 2010).

DNA metilasyonunun tersine çevrilebilirliği birkaç yolla gerçekleşir (Park ve Han, 2019). On-onbir translokasyon (TET) enzimleri kromatin yapısını düzenleyerek gen ifadesinde değişikliklere sebep olur (Castro-Muñoz ve ark., 2023). TET1, TET2 ve TET3 sıralı oksidasyonlarla 5-mC'yi 5-hidroksimetilsitozine (5-hmC) çevirerek 5-karboksilsitozin (5-caC) ve 5-formilsitozin (5-fC) ara ürünlerini oluşturur. 5-caC ve 5-fC, baz eksizyon onarımı yoluyla DNA onarım proteini timin glikozilazlar tarafından uzaklaştırılarak TET hedef bölgelerde metillenmemiş sitozinler oluşturur. Bir diğer yolu ise hücre bölünmesi esnasında 5-hmC kaybı ile pasif olarak demetilasyon gerçekleşir (Park ve Han, 2019; Castro-Muñoz ve ark., 2023). 5-hmC bir epigenetik belirteç olarak kabul edilmiştir. DNA demetilasyon ara ürünü olarak bilinen 5-hmC, DNA'ya bağlı belirli proteinleri iterek veya çekerek transkripsiyonel olarak etkili olmaktadır. En önemli örneği Chapman ve ark. (2015), 5-hmC'nin CRC'de kolonosit farklılaşmasında ve CRC'deki gen ifadesinde spesifik bir rolü olduğunu kanıtlamıştır (Rezapour ve ark., 2019). Kanser türlerinde azalmış TET gen ekspresyonu ve sonucunda daha düşük hidroksimetilasyon düzeyleri tespit edilmiştir (Miranda Furtado ve ark., 2019).

Genom Çapında (Global) Hipometilasyon

DNA metilasyonunu kanserle ilişkilendiren önemli biyogöstergelerden biri genom çapında global hipometilasyondur (Gokul ve Khosla, 2012). İnsanda CPG bölgelerinin (dinükleotidlerinin) yaklaşık %70'i metillenmiştir (Kanwal ve Gupta, 2010; Rezapour ve ark., 2019;). Kanserdeki ilk epigenetik modifikasyon normal dokularda, tümörlere göre DNA metilasyon düzeyinin daha düşük bulunmasıyla tespit edilmiştir. Bu metilasyon kaybı tekrarlayan bölgelerdeki hipometilasyondan kaynaklanarak onkogenlerin transkripsiyonunu arttırarak onkogenezin oluşumuna sebep olmuştur (Das ve Singal, 2004; Esteller, 2008).

Yüksek verimli genom çapında DNA metilasyon çalışmaları hipometilasyona uğrayan bölgelerin sıklığının tümörde daha fazla görüldüğünü tespit etmiştir (Adorján ve ark., 2002; Iacobuzio-Donahue ve ark., 2003). CRC'de genomik hipometilasyon tüm evrelerde ilk görülen anormal metilasyondur. *HRas proto-onkogen (HRas)*, *proto-onkogen c-myc (MYC)* gibi onkogenlerin hipometilasyonu ve tekrarlayan elementler (LINE1-uzun dağılmış nükleer eleman ve makrosatellitler gibi) genomik stabiliteyi bozarak tümör gelişimine neden olur (Moreta-Moraleda ve ark., 2023). Global hipometilasyonun en ünlü örneği LINE1 tekrar dizisi CRC'de zayıf sağkalıma sebep olmuştur (Rezapour ve ark., 2019).

Gene Özgü Hipermetilasyon

CpG adaları, daha yüksek oranda CpG dinükleotidleri içeren promotör bölgelerdir (Grady, 2005). Tüm gen promotörlerinin %60'ı CpG adacıkları içermektedir. Bunların büyük bir kısmı normal gelişimde veya yetişkin hücrelerin yenilenmesinde DNA metilasyonuna uğramamıştır (Baylin ve Jones, 2016). Genellikle genler arasında ve intragenik bölgede bulunan metillenmemiş Cpg dinükleotidleri gen sessizleştirme ve kromozomal stabilitenin kontrolünde kritik bir role sahiptir (Kanwal ve Gupta, 2010; Rezapour ve ark., 2019). Promoter bölgedeki Cpg adalarının hipermetilasyonu, DNA onarım genlerinin ve tümör baskılayıcı genlerinin transkripsiyonel inaktivasyonuna neden olur.(Moreta-Moraleda ve ark., 2023). Genlerin transkripsiyonel olarak baskılanması kanser türlerinde en çok çalışılan epigenetik modifikasyonlardan biridir (Gokul ve Khosla, 2012). CpG adalarındaki promotör hipermetilasyon kanser gelişiminde rol oynayan hücre döngüsü, apoptoz, hücre-hücre

etkileşimi, anjiyogenez, DNA onarımı mekanizmalarında rol oynayan genleri etkiler (Esteller, 2008).

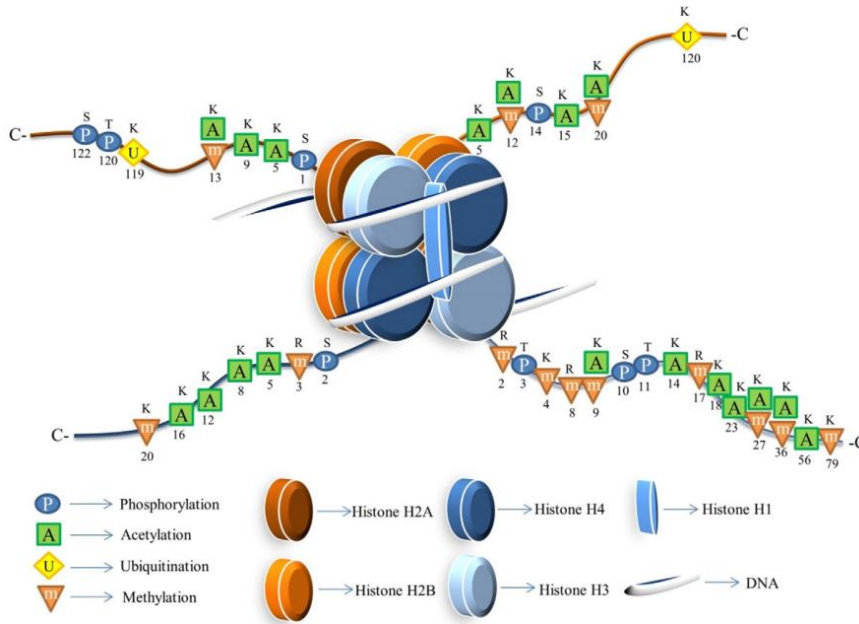
Günümüze dek farklı kanser türlerinde *siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A* (CDKN2A), *tümör proteini P53* (TP53), *siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A* (p21), *metalloproteinazların doku inhibitörü 3* (TIMP3), *'ras association domain family member 1'* (RASSF1A), *kanserde hipermetilasyon 1* (HIC1), *BCL2 apoptoz düzenleyici* (BCL2), *'ECRG4 augurin precursor'* (ECRG4) ve *e-cadherin* dahil olmak üzere birçok tümör baskılayıcı genin DNA hipermetilasyonuna uğradığı tespit edilmiştir (Gokul ve Khosla, 2012). DNA onarım genlerinden *mutL homolog 1* (MLH1), *metilguanin-DNA metiltransferaz* (MGMT), *meme kanseri 1* (BRCA1) ve Werner sendromu ile ilgili genlerin promotöründe hipermetilasyona rastlanmıştır (Esteller, 2008; Gokul ve Khosla, 2012). CRC hastalarında ise *adenomatöz poliposis koli* (APC), *MLH1*, *TIMP3*, *GATA bağlayıcı protein 4* (GATA4), *GATA bağlayıcı protein 5* (GATA5), *CDKN2A*, *p16^{INK4}*, *RASSF1A*, *glutasyon S-transferaz pi 1* (GSTP1), *trombospondin 1* (THBS1), *salgılanan apoptoz ilişkili protein 1/2* (SFRP1/2) ve *'dickkopf WNT sinyal yolu inhibitörü 2'* (DKK2) promotör bölgelerinin hipermetilasyonu sonucunda gen ekspresyonlarının azalarak sağ kalım oranını azalttığı tespit edilmiştir (Grady, 2005; Biswas ve Rao, 2017; Rezapour ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda *MLH1*'in inaktivasyonu CRC'de karsinogenezin bir sonucu değil nedeni olduğu saptanmıştır (Grady, 2005). Tümör baskılayıcı genlerden *p16*, *insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 7* (IGFB7) promotör hipermetilasyonunun CRC'de polipin ilerlemesine, lenf düğümlerine ve uzak organ metastazına sebep olduğuna ilişkin veriler bulunmaktadır (Rezapour ve ark., 2019).

2.2.2. Histon Modifikasyonları

Kromatin yapısı, DNA metilasyonunun yanı sıra gen regülasyonunda ve karsinogenezde rol oynayan histon modifikasyonlarından da etkilenmektedir (Kanwal ve Gupta, 2010). Histonların posttranslasyonel modifikasyonları sonucunda nükleozomların üç boyutlu yapıları değişir ve DNA'ya ulaşılabilirlik etkilenir (Han, 2010).

En iyi bilinen histon modifikasyonları; metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ADP-ribosilasyon ve ubiquitinasyondur (Şekil 2-8). Bu modifikasyonlar, gen ekspresyon seviyelerini değiştirir ve kromatin bağımlı süreçlerin düzenlenmesinde etkili

olmaktadır (Moreta-Moraleda ve ark., 2023). Histon modifikasyonları çeşitli histon proteinleri, varyantları ve kalıntılarında meydana gelmektedir. Farklı kimyasal gruplar (metil, asetil, fosfat gibi) ve farklı seviyeleri (mono-, di-, tri-metilasyon gibi) içermektedir (Biswas ve Rao, 2017; Castro-Muñoz ve ark., 2023). Bu modifikasyonlar tersine çevrilebilir olup büyük bir kısmı H3, H4 çekirdek proteininin histon kuyruğunda ve lizin, arginin, serin kalıntılarında gerçekleşmektedir (Kanwal ve Gupta, 2010). Histonların asetilasyon ve metilasyonu gen transkripsiyonu sonucunda gen ifadesinin düzenlenmesinde, DNA onarımı ve replikasyonunda, kromozomların organizasyonu gibi nükleer süreçlerle doğrudan ilişkilidir (Esteller, 2008).



Şekil 2-8: Histon modifikasyonları. Histon N-terminal kuyruğu nükleozom yapısını ve fonksiyonunu modüle etmede çok önemli bir rol oynar. Histon kuyruğunun farklı kalıntıları üzerindeki çeşitli modifikasyonlar burada gösterilmektedir; S, T, K ve R, sırasıyla serin, treonin, lizin ve arginini temsil eder (Biswas ve Rao, 2017).

Histon Asetilasyonu

Lizin (K) kalıntılarında görülen histon asetilasyonunun histonlar ve DNA'nın etkileşiminin üzerinde üzerinde kritik bir rolü vardır (Biswas ve Rao, 2017). Bu modifikasyonda lizin kalıntıları negatif yüklenir ve negatif yüke sahip DNA'nın itilmesine sebep olmaktadır. Bunun sonucunda kromatin yoğunlaşmasını azaltır ve enzimatik aktivitelerin gerçekleşmesi için bağlanma bölgeleri oluşturur (Moreta-Moraleda ve ark., 2023). Histon lizinlerinde görülen asetilasyon transkripsiyonel aktivasyonla ilgilidir (Esteller, 2008). Histonların asetilasyonu ve deasetilasyonu

sırasıyla histon asetiltransferaz (HAT)'lar ve histon deasetilaz (HDAC)'lar tarafından katalize edilir (Jung ve ark., 2020). HAT'ler ve HDAC'ler tarafından meydana gelen histon asetilasyonundaki epigenetik değişikliklerin karsinogeneze önemli etkileri bulunmaktadır (Moreta-Moraleda ve ark., 2023). Histon asetilasyon durumunun karsinogenезin gelişimi ve ilerlemesinde önemli iki rolü bulunmaktadır. Proto-onkogenlerle ilişkili histonların hiperasetilasyonu, gen ekspresyonunu aktive ederken, tümör baskılayıcı genlerle ilişkili histonların hipoasetilasyonu, ilgili genleri susturur (Jones ve Baylin, 2002; Jung ve ark., 2020; Castro-Muñoz ve ark., 2023; Moreta-Moraleda ve ark., 2023).

Histon Metilasyonu

Histon kuyrukları K, arginin ve histidin gibi kalıntılarda metilasyona uğramaktadır. Bu epigenetik modifikasyonda asetilasyonun tersine DNA yoğunlaşması üzerinde doğrudan etkili değildir. Farklı protein komplekslerine spesifik alanlar açarak gen ifadesinde değişikliklere sebep olur (Moreta-Moraleda ve ark., 2023). Histon metilasyonu ile görülen fonksiyonel farklılıklar kalıntının türü ile metilasyonun değiştirdiği spesifik alanla ilgilidir (Esteller, 2008) Histon metiltransferaz ve histon demetilazlar tarafından katalize edilir (Park ve Han, 2019). Onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonu ile tümör gelişimine katkı sağlamaktadır (Moreta-Moraleda ve ark., 2023).

Arginin kalıntılarındaki metilasyon transkripsiyonel aktivasyonu artırırken, K kalıntılarında görülen metilasyon gerçekleştiği bölgeye bağlı olarak transkripsiyonel aktivasyon veya inhibisyona sebep olabilir. Örneğin, histon 3 (H3)' ün K4 trimetilasyonu (H3K4me3) transkripsiyonel aktivasyonla ilişkiliyken; H3K9me3 transkripsiyonel inhibisyonla ilişkili bulunmuştur. Yine, H3K27 ve H4K27 metilasyonunun da transkripsiyonel inhibisyonla ilişkili olduğuna dair veriler mevcuttur (Esteller, 2008; Biswas ve Rao, 2017).

2.2.3. Mikro RNA'lar

Kodlayıcı olmayan RNA (ncRNA)'lar son yıllarda gen ekspresyonunu kontrol eden çeşitli mekanizmalardaki etkileri sebebiyle ilgi odağıdır. ncRNA'lar uzunluklarına göre temelde ikiye ayrılır. Bunlar miRNA (19-31 nükleotid) ve uzun ncRNA (lncRNA>200 nükleotid)'dir (Miranda Furtado ve ark., 2019). MiRNA'lar küçük kodlanmayan RNA'lardır ve mRNA'nın transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde kritik

bir role sahiptir (Hussen ve ark., 2021). “Ulusal İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü” tarafından oluşturulan GENCODE gen setleri Kanser Genom Atlası dahil olmak üzere birçok proje tarafından kullanılmaktadır. GENCODE (v.45) verilerinde, insan genomunda toplam 20.424 lncRNA kodlayan gen ve 1879 miRNA kodlayan gen listelenmiştir (GENCODE v45., 2024)

MiRNA’lar gen ifadesindeki değişiklikler ile oksidatif stres, hipoksi, DNA hasarına hücrel yanıt ve karsinogeneze sebep olur (Ali Syeda ve ark., 2020). Onkogenik miR (onko-miR) ve tümör baskılayıcı miR (onkösüpresör- miR) olarak işlev görürler. Karsinogeneizde onko-miR’lerin ekspresyonu artarken onkösüpresör-miR’lerin ekspresyonu azalmaktadır (Fandy ve Gore, 2010; Hussen ve ark., 2021).

Spesifik miRNA’ların kanserdeki rolüne ilişkin ilk çalışma 2002’de Calin ve ark. tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada kronik lenfositik lösemi (KLL) hastalarından alınan örneklerde miR-15 ve miR-16’nın ekspresyonunun baskılandığına ilişkin veriler mevcuttur (Calin ve ark., 2002). Cimmino ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise KLL hastalarında miR-15 ve miR-16’nın ekspresyonunun baskılandığı ve bu miR’lerin *BCL2* ekspresyonu ile ters ilişkili olduğu bulunmuştur (Cimmino ve ark., 2005).

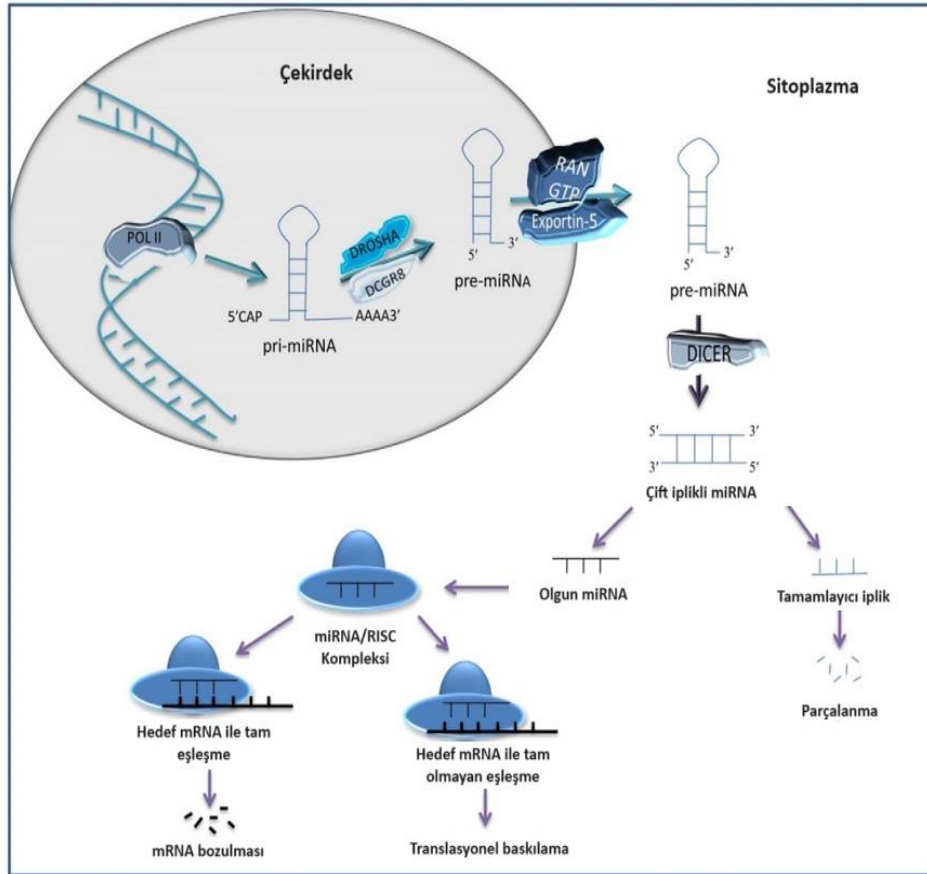
Lu ve ark. tarafından 2005’te yapılan bir çalışmada kanserli hastalardan alınan toplam 334 örnekte 217 memeli miRNA’sının normal dokulara göre baskılandığı tespit edilmiştir (Lu ve ark., 2005). 2006’da Volinia ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise; akciğer, mide, meme, pankreas, prostat ve kolon kanseri hastaları ve sağlıklı kişilerden alınan 540 örnekle yapılmış büyük ölçekli miRNome analizinde de normal dokulara kıyasla ekspresyonu anormal artış gösteren miRNA verisine ulaşılmıştır. Bu çalışmada miRNA’lardan özellikle miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-92 ve miR-155’in kanserle ilişkisi açıklanmaya çalışılmıştır (Volinia ve ark., 2006).

Normal şartlarda miRNA’lar hücre metabolizması, hücre proliferasyonu ve protein sentezi gibi süreçlerin düzenlenmesinde gerekliken bunların serbest kalması ve ekspresyonlarındaki değişiklikler karsinogenезin başlangıcı, ilerlemesi ve metastazı ile ilişkilidir (Hussen ve ark., 2021).

MiRNA Biyosentezi

MiRNA’lar yeni ortaya çıkan birincil miRNA (pri-miRNA) transkriptlerinin iki kere ardışık bölünmesi sonucu oluşur (Şekil 2-9) (Ali Syeda ve ark., 2020). Bu süreçte

Argonaute protein ailesinden RNA polimeraz II ve RNaz III enzimleri (Drosha ve Dicer) görev alır (Hussen ve ark., 2021). Pri-miRNA öncelikle çekirdekteki Drosha tarafından kopyalanarak öncü miRNA (pre-miRNA)'yı oluşturur (Rezapour ve ark., 2019). Pre-miRNA Dicer tarafından katalize uğrayarak küçük olgun miRNA'dan oluşan RNA dubleksini meydana getirir (Ali Syeda ve ark., 2020). Bu olgun çift sarmallı RNA ise olgun miRNA'nın tek ipliğini tutan Argonaute proteinlerine bağlanır ve diğer kofaktörlerle birleşerek RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC)'i oluşturur. Oluşan miRNA susturma kompleksi (miRISC), 3' çevrilmemiş bölgesindeki (3'-UTR) tamamlayıcı dizilerle hedef gen mRNA'sının translasyonel baskılamayı indükler (Ali Syeda ve ark., 2020; Hussen ve ark., 2021).



Şekil 2-9: miRNA biyogenezi. Çoğu miRNA, pri-miRNA olarak bilinen başlangıç transkriptini oluşturmak için RNA polimeraz II enzimi tarafından kopyalanır. Pri-miRNA'dan, pre-miRNA'nın meydana gelmesinde Drosha ve DGCR8 içeren bir kompleks görev alır. Pre-miRNA, Ran-GTP ile birlikte Exportin 5 tarafından sitoplazmaya geçer. Pre-miRNA, Dicer tarafından çift sarmallı RNA'yı oluşturur. Çift sarmallı RNA, RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) ile birleşen olgun bir miRNA oluşturmak üzere bölünür. Olgun miRNA, RISC'yi hedef mRNA'yı tanıması için yönlendirerek mRNA bozulmasına veya translasyonun baskısına yol açar (Biswas ve Rao, 2017).

2.2.3.1. CRC'deki miRNA'lar

MiRNA ekspresyonlarındaki değişiklikler karsinogenezle ilişkilendirilmiş olup farklı miRNA profillerinin insan kanserlerinin sınıflandırılmasında kullanıldığı görülmektedir (Ng ve ark., 2009). MiRNA'ların CRC görülme sıklığı ve karsinogenezin ilerlemesi üzerinde önemli bir rolü olduğuna dair veriler mevcuttur (Han ve ark., 2021; Hishida ve ark., 2022; Mahmoud ve ark., 2022; Zhao ve ark., 2022; Abo-Elela ve ark., 2023; Liu ve ark., 2023; Yoshikawa ve ark., 2023). CRC hastalarında anormal ekspresyon gösteren miRNA'lar arasında miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-145 bulunmaktadır (Lin ve ark., 2017; Rezapour ve ark., 2019).

MiRNA ekspresyon seviyelerinde görülen değişiklikler CRC ve diğer kanser türlerine önemli bir katkı sağlamaktadır. MiRNA'lar normal şartlarda stabildir. Hastaların plazma veya serumunda kolaylıkla saptanabilmesi onları minimal invaziv biyobelirteç haline getirir (Hofsli ve ark., 2013). CRC'de ekspresyonları değişikliğe uğrayan miRNA'lar ve hedef genleri Tablo 2-1'de gösterilmiştir.

Tablo 2-1: CRC'de ekspresyonları değişikliğe uğrayan miRNA'lar ve hedef genleri

MikroRNA	Hedef Gen	Referans
Onkogen miRNA'lar		
miR-9	<i>E-cadherin</i>	Lu ve ark., 2012
miR-17	<i>Rho GTPaz ailesi 3 (RND3)</i>	Luo ve ark., 2012
miR-18a	<i>'Ataxia telangiectasia mutated' (ATM)</i>	Wu ve ark., 2013
miR-19a	<i>Transferrin (TF)</i>	Yu ve ark., 2013
miR-21	<i>Programlanmış hücre ölümü 4 (PDCD4), fosfataz ve tensin homologu (PTEN), kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homologu (KRAS), RAS p21 protein aktivatörü 1 (RASA1), Ras homolog aile üyesi B (RhoB), dönüştürücü büyüme faktörü beta reseptör 2 (TGFβR2), kazal motifli reversiyon indükleyici sistein (RECK), nükleer faktör 1 B (NF1B), tropomiyozin 1 (TPM1), 'sprouty 2' (SPRY2), TIMP3, maspin, hücre bölünme döngüsü 25 homolog A (CDC25A), T-lenfoma invazyon ve metastazı indükleyen protein 1 (TIAM1), BCL2</i>	Meng ve ark., 2007; Zhu ve ark., 2007; Asangani ve ark., 2008; Fujita ve ark., 2008; Gabriely ve ark., 2008; Lu ve ark., 2008; Sayed ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2008; Wang ve ark., 2009; Cottonham ve ark., 2010; Hatley ve ark., 2010; Chang ve ark., 2011; Liu ve ark., 2011; Horiuchi ve ark., 2012; Yu ve ark., 2012; Xiong ve ark., 2013; Gong ve ark., 2015; Shi ve ark., 2016
miR-22	<i>B hücresi translokasyon geni 1 (BTG1)</i>	Zhang ve ark., 2015
miR-26b	<i>Siklin D1 bağlayıcı protein 1 (DIP1)</i>	Benderska ve ark., 2015
miR-30	<i>Isı şoku protein ailesi A (Hsp70) üyesi 5 (GRP78)</i>	Su ve ark., 2013
miR-31	<i>RASA1, TIAM1, SFRP1, 'SATB homeobox 2' (SATB2), KRAS, 'forkhead box C2'</i>	Bandrés ve ark., 2006; Cottonham ve ark., 2010; Sun

	(FOXC2), 'forkhead box P3' (FOXP3), axis inhibisyon proteini 1 (AXIN1)	ve ark., 2013; Kent ve ark., 2016; Lundberg ve ark., 2018; Li ve ark., 2024
miR-32	PTEN	Wu ve ark., 2013
miR-92a	BCL2, PTEN	Tsuchida ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2014
miR-95	'Sorting nexin 1' (SNX1)	Huang ve ark., 2011; Qin ve ark., 2015
miR-106a	RB transkripsiyonel korepresör 1 (RB1), TGFβR2	Feng ve ark., 2012; Ivkovic ve ark., 2013
miR-106b	PTEN, p21	Zheng ve ark., 2015
miR-135a	APC, metastaz supresör 1 (MTSS1)	Nagel, ve ark., 2008; Zhou ve ark., 2012
miR-155	MLH1, mutS homolog 2 (MSH2), mutS homolog 6 (MSH6)	Valeri ve ark., 2010
miR-191	'CCAAT enhancer binding protein beta' (C/EBPβ)	Zhang ve ark., 2015
miR-196a	Homeobox A7 (HoxA7), homeobox B8 (HoxB8), homeobox C8 (HoxC8) homeobox D8 (HoxD8), NFκB inhibitörü alfa (IκBα), büyüme inhibitörü aile üyesi 5 (ING5), AKT Serin/Treonin Kinaz 1 (AKT1), PDCD4, 'Annexin A1' (ANXA1)	Schimanski ve ark., 2009; Fawzy ve ark., 2017; Pao ve ark., 2018; Xin ve ark., 2019; Zheng ve ark., 2022; Mehrjoei ve ark., 2024
miR-214	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 (FGFR1)	Chen ve ark., 2014
miR-224	p21, MBD2, 'PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1 (PHLPP1), 'PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2' (PHLPP2), SMAD aile üyesi 4 (SMAD4)	Liao ve ark., 2013; Olaru ve ark., 2013; Yuan ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2013
miR-449-5p	'forkhead box O4' (FOXO4), PDCD4	Liu ve ark., 2011
miR-675	RB1	Tsang ve ark., 2010
Tümör Baskılayıcı miRNA'lar		
miR-7	YY1 transkripsiyon faktörü (YY1)	Zhang ve ark., 2013
miR-16	Siklin bağımlı kinaz 6 (CDK6), siklin D1 (CCND1), 'survivin' (BIRC5)	Ma ve ark., 2013; Liu ve ark., 2008
miR-22	p21	Tsuchiya ve ark., 2011
miR-28-5p	CCND1, 'homeobox B3' (HOXB3)	Almeida ve ark., 2012
miR-29	Matriks metallopeptidaz 2 (MMP2)	Ding ve ark., 2011
miR-30a	'Denticleless Homolog' (DTL)	Baraniskin ve ark., 2012
miR-33a	Pim-1 onkogen (PIM)	Thomas ve ark., 2012
miR-34	Axis inhibisyon proteini 2 (AXIN2), snail ailesi transkripsiyonel represör 1 (SNAIL1)	Kim ve ark., 2011; Kim ve ark., 2013
miR-34a	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü alfa (PDGFRα), laktat dehidrojenaz A (LDHA), MDM4 p53 regülatörü (MDM4), sirtuin 1 (SIRT1), FOS benzeri antijen 1 (FRA1, FOSL1), BCL2	Yamakuchi ve ark., 2008; Mandke ve ark., 2012; Wu ve ark., 2012; Li ve ark., 2015; Li ve ark., 2015a
miR-93	Siklin B1 (CCNB1), Erb-B2 reseptörü tirozin kinaz 2 (ERBB2), SMAD aile üyesi 7 (SMAD7)	Yang ve ark., 2012; Tang ve ark., 2015.
miR-100	'Leucine rich repeat containing G protein-	Zhou ve ark., 2015

	<i>coupled receptor 5' (LGR5)</i>	
miR-101	<i>Siklooksijenaz 2 (COX-2)</i>	Strillacci ve ark., 2009
miR-124	<i>DNMT1, DNMT3B, p53 apoptoz uyarıcı proteinin inhibitörü (IASPP), sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3)</i>	Zhang ve ark., 2013; Liu ve ark., 2013; Chen ve ark., 2015
miR-126	<i>C-X-C motif kemokin reseptörü 4(CXCR4), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)</i>	Guo ve ark., 2008; Li ve ark., 2013
miR-127	<i>BCL6 transkripsiyon represör (BCL6)</i>	Saito ve ark., 2006
miR-133b	<i>TATA-box bağlayıcı protein benzeri 1 (TBPL1)</i>	Xiang ve Li, 2014
miR-139	<i>RAP1B RAS onkogen aile üyesi (RAP1B), insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF-IR)</i>	Guo ve ark., 2012; Shen ve ark., 2012
miR-139-5p	<i>İnsulin reseptör substratı 1 (IRS1), notch reseptörü 1 (Notch1)</i>	Mi ve ark., 2015
miR-143	<i>KRAS, DNMT3A, heksokinaz 2 (HK2), IGF-IR, kolon kanseriyle ilişkili metastaz 1 (MACC1), integrin alfa 6 (ITGA6), PH domain 3 (ASAP3), BCL2, MYC, matriks metalloproteinaz 9 (MMP9), matriks metalloproteinaz 7 (MMP7), Fos benzeri antijen 2 (FOSL2), epidermal büyüme faktör reseptörü 3 (ERBB3), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 5 (ERK5)</i>	Akao ve ark., 2007; Slaby ve ark., 2008; Chen ve ark., 2009; Ng ve ark., 2009; Gregersen ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2012; Qian ve ark., 2013; Bai ve ark., 2016; Yu ve ark., 2016; Li ve ark., 2018; Guo ve ark., 2019; Karimi ve ark., 2019
miR-144	<i>'Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1' (ROCK1)</i>	Cai, ve ark., 2015
miR-145	<i>DNA'yı parçalara ayıran faktör 45 (DFF45), "friend leukemia integration 1" (FLI1), IRS1, NRAS proto-onkogen (NRAS), p21 ile aktive edilen kinaz 4 (PAK4), ribozomal protein S6 kinaz B1 (p70S6K1), paksillin (PXN), sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 1 (STAT1), yamaguchi sarkomu onkogeni homolog 1(YES), E3 ubiquitin protein Ligaz (RAD18), oktamer 4 (OCT4), SRY-box transkripsiyon faktörü 2 (SOX2), SRY-box transkripsiyon faktörü 9 (SOX9), ERK5, krüppel-like faktör 4 (KLF4), twist ailesi BHLH transkripsiyon faktörü 1 (TWIST1)</i>	Shen ve ark., 2009; Xu ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2010; Gregersen ve ark., 2010; Ibrahim ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2011; Wang ve ark., 2012; Xu ve ark., 2012; Yin ve ark., 2013; Panza ve ark., 2014; Qin ve ark., 2015; Liu ve ark., 2015;
miR-148a,b	<i>BCL2, kolesistokin B reseptörü (CCK2R)</i>	Zhang ve ark., 2011; Song ve ark., 2012
miR-181a miR-199a-5p	<i>GRP78</i>	Su ve ark., 2013
miR-195	<i>BCL2</i>	Liu ve ark., 2010
miR-203	<i>Cbl proto-onkogen benzeri 1 (CBLL1), timidilat sentetaz (TYMS)</i>	Abella ve ark., 2012; Li ve ark., 2015
miR-204	<i>Transkripsiyon faktörü A mitokondriyal (TFAM)</i>	Wu ve ark., 2015
miR-215	<i>DTL</i>	Song ve ark., 2010
miR-218-5p	<i>Polycomb grubu 'ring finger' 4 (BMI1)</i>	Ma ve ark., 2015

miR-221	<i>MBD2</i>	Yuan ve ark., 2013
miR-320a	<i>β-catenin, neuropilin 1(NRP1)</i>	Zhang ve ark., 2012; Sun ve ark., 2012
miR-339-5p	<i>Pleiotropik regülatör 1 (PRL1)</i>	Zhou ve ark., 2013
miR-342	<i>DNMT1</i>	Wang ve ark., 2011
miR-362-3p	<i>E2F transkripsiyon faktörü 1 (E2F1), protein tirozin fosfataz reseptör olmayan tip 1 (PTPN1), c-fos etkileşimli protein (USF2)</i>	Christensen ve ark., 2013
miR-365	<i>BCL2, CCND1</i>	Nie ve ark., 2012
miR-375	<i>Fosfoinositid 3-kinaz alfa (PIK3CA)</i>	Wang ve ark., 2014
miR-381	<i>Karaciğer reseptörü homolog-1 (LRH1)</i>	Liang ve ark., 2015
miR-451	<i>Makrofaj migrasyon faktörü (MIF)</i>	Bandres ve ark., 2009
miR-455	<i>Raf-1 proto-onkogen, serin/treonin kinaz (RAF1)</i>	Chai ve ark., 2015
miR-497	<i>IGF-IR</i>	Guo ve ark., 2013
miR-506	<i>'Enhancer Of Zeste Homolog 2 (Drosophila)' (EZH2), DNMT1, DNMT3A</i>	Chen ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2015
miR-622	<i>KRAS</i>	Fang ve ark., 2016
miR-627	<i>Lizin Demetilaz 3A (KDM3A, JMJD1A)</i>	Padi ve ark., 2013
miR-675	<i>Retinoblastoma (RB)</i>	Tsang ve ark., 2010
miR-1915	<i>BCL2</i>	Xu ve ark., 2013
Let-7	<i>KRAS, matriks metalopeptidaz 11 (MMP11), 'PBX homeobox 3' (PBX3)</i>	Chen ve ark., 2009; Han ve ark., 2012

Tez çalışmasında çalışılan CRC'de önemli rolü olan miR-21, miR-31, miR-143, miR-196a miRNAlar ve bu miRNA'ların hedef aldığı *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* genlerinin özellikleri ve kanserdeki rolü hakkında bilgi aşağıda verilmiştir.

MiR-21 onkogeni

CRC'de en çok çalışılan miRNA'lardan biri miR-21'dir. CRC hastalarından alınan serum, dışkı ve doku örneklerinde ekspresyonu artış göstermektedir (Shibuya ve ark., 2011; Kanaan ve ark., 2012; Wu ve ark., 2012). MiR-21 ekspresyonundaki artış karsinogenez, nüks, uzak metastaz ve zayıf sağkalımla ilişkili bulunmuştur (Rawson ve Bapat, 2012). MiR-21'in ekspresyon seviyesi, lenf nodu metastazı ve TNM evrelemesiyle pozitif olarak ilişkili bulunmuştur (Xu ve ark., 2012). Schetter ve ark. tarafından kolon adenokarsinomuna sahip hastalardan alınan örneklerde yapılan çalışmada miR-21, miR-20a, miR-106a, miR-181b ve miR-203'te yüksek ekspresyon seviyeleri tespit edilmiş olup kötü prognoz, artan klinik evre ve zayıf sağkalımla ilişkilendirilmiştir (Schetter ve ark., 2008). Erken evre CRC (çoğunlukla evre II) ve normal doku örneklerinde yapılan bir çalışmada CRC'de normal dokuya kıyasla miR-

21'in ekspresyon seviyesinin artış gösterdiği saptanmıştır (Arndt ve ark., 2009). MiR-21'in CRC'de onkogen olarak görev alarak tümör ilerlemesi, anjiyogenez ve invazyonu baskılayan genlerin transkripsiyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Slaby ve ark., 2008). MiR-21'in hücre invazyon, proliferasyon ve apoptozunda görev alan bir onkogen olduğuna ilişkin çeşitli raporlar mevcuttur (Lu ve ark., 2008; Han ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2012).

miR-21, CRC tanı ve prognozunda da umut verici bir biyobelirteçtir (Lin ve ark., 2017). Lawrie ve ark. tarafından yapılan çalışmada diffüz büyük B hücreli lenfoma hastalarından alınan örneklerde serumda miR-21, miR-155 ve miR-210 gibi tümörle ilişkili çeşitli miRNA seviyeleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmış ve bu hastaların kontrollere göre daha yüksek serum miRNA seviyelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmayla dolaşımdaki ilk mikroRNA'lar tanımlanmış olup, bu mikroRNA'ların diğer kanser türleri için invaziv olmayan potansiyel tanı belirteçleri olarak kullanılabileceği öngörülmüştür (Lawrie ve ark., 2008). Plazmadaki miR-21 ekspresyon artışı CRC tespitinde güçlü bir biyobelirteç olsa da CRC'yi ayırt etmek için CRC'de ekspresyonu değişikliğe uğrayan diğer miRNA belirteçleri ile oluşturulan bir panelin özgüllüğü arttıracığı düşünülmektedir (Kanaan ve ark., 2012).

MiR-21'in *PDCD4*, *PTEN*, *KRAS*, *RASA1*, *RhoB*, *TGF β R2*, *RECK*, *NF1B*, *TPM1*, *SPRY2*, *TIMP3*, *maspin*, *CDC25A*, *TIAM1*, *BCL2*'yi hedeflediğine ilişkin kanıtlar mevcuttur (Meng ve ark., 2007; Zhu ve ark., 2007; Asangani ve ark., 2008; Fujita ve ark., 2008; Gabriely ve ark., 2008; Lu ve ark., 2008; Sayed ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2008; Wang ve ark., 2009; Cottonham ve ark., 2010; Hatley ve ark., 2010; Chang ve ark., 2011; Liu ve ark., 2011; Horiuchi ve ark., 2012; Yu ve ark., 2012; Xiong ve ark., 2013; Gong ve ark., 2015; Shi ve ark., 2016).

PTEN

MiR-21'in hedef genleri arasında yer alan *PTEN* tümör baskılayıcı genidir ve CRC'de proliferasyon, invazyon ve metastazda önemli bir rolü vardır (Yazdani ve ark., 2016). MiR-21, *PTEN* hedef geni üzerinden *PI3K/AKT* sinyal yolunun negatif düzenleyicisidir (Xiong ve ark., 2013). Hem fosfataza bağımlı hem de bağımsız işleve sahip olan *PTEN*, en yaygın tümör baskılayıcı genlerden biridir (Stefano ve Giovanni, 2019). *PTEN/PI3K/AKT* yolunda önemli bir rolü bulunmaktadır (Wang ve ark., 2017). *PI3K* aktivasyonu sonucunda fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfat (PIP2), fosfatidilinositol

(3,4,5)-trifosfata (PIP3) çevrilir. PIP3 ise *AKT*'ye bağlanır ve fosfoinositide bağımlı kinaz yolu ile fosforilasyonu gerçekleştirerek aktive olur (Molinari ve Frattini, 2014; Fang ve ark., 2021).

PTEN ekspresyon kaybı *PIP3* ekspresyonunu arttırmaktadır (Wang ve ark., 2017). *PI3K* aktivasyonu sonucunda *AKT*'nin aktivasyonu artarken, *PIP3* defosforilasyonu ile azalmaktadır (Saavedra ve ark., 2015). *PTEN*'in diğer işlevi 3-fosfoinositide bağımlı kinaz 1 (*PDK1*) ve *AKT*'nin güçlü bir aktivatörüdür. *AKT*; hücre transkripsiyonu, proliferasyonu, apoptoz ve migrasyon gibi hücrel aktivitelere önemli bir rol oynamaktadır (Coffer ve ark., 1998). *AKT*'nin aktivasyonunun anormal artışı kanserli hastalarda tümör oluşumu ve düşük hayatta kalma ile ilişkilendirilmiştir (Liu ve ark., 2014). CRC'li hastalarda *PI3K/AKT* sinyal yolunda aktivasyon artışı ile *AKT*'nin negatif düzenleyicisi olan *PTEN*'in ekspresyon seviyelerinde anormal azalma tespit edilmiştir (Colakoglu ve ark., 2008). *PTEN* ekspresyon seviyelerinin CRC'li hastalarda sağlıklılara göre azaldığı, miR-21 ekspresyon seviyelerinin ise arttığına ilişkin birçok kanıt bulunmaktadır (Bakirtzi ve ark., 2011; Xiong ve ark., 2014; Yang ve ark., 2015; Yazdani ve ark., 2016; Wu ve ark., 2017).

BCL2

BCL2'nin, apoptoz yolunda önemli bir işlevi bulunmaktadır. Bcl-2 proteinlerinin 2 sınıfı bulunmaktadır. Pro-apoptotik proteinlerden olan Bax, mitokondriyal membran geçirgenliğini arttırarak sitokrom C salınımına ve *kaspaz 3* aktivasyonuna neden olmaktadır. Anti-apoptotik proteinlerden olan Bcl-2, *BAX* inhibisyonu ile sitokrom C'nin mitokondriden salınımını engelleyerek *kaspaz 3* aktivasyonunu inhibe etmektedir (Buscaglia ve Li, 2011; Brzozowa-Zasada ve ark., 2018). Bcl-2 proteini apoptozun önemli bir inhibitörüdür. *BCL2*'nin anormal ekspresyonu CRC dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde görülmüştür. 81 kolorektal kanser doku örneğinde *BCL2*'nin rolünün araştırıldığı çalışmada tümör dokularında *BCL2* ekspresyon seviyelerinde anormal artış gözlenmiştir (Han ve ark., 2006). Çalışmalarda *BCL2* yüksek ekspresyon seviyeleri düşük tümör derecesi ilişkili bulunmuştur. *BCL2* anormal aktivasyonunun erken karsinogeneizde rol oynayabileceği düşünülmüştür (Öfner ve ark., 1995; Baretton ve ark., 1996; Ilyas ve ark., 1998; Leahy ve ark., 1999).

MiR-21 ekspresyon seviyelerindeki artış, *BAX* inhibisyonu *BCL2* ekspresyon seviyelerindeki artışla ilişkilendirilmiştir (Shi ve ark., 2010). 2007 yılında Si ve ark.

tarafından yapılan çalışmada anti-miR-21 oligonükleotidlerinin hem in vitro hücre büyümesini hem de in vivo tümör büyümesini baskıladığı saptanmış olup artan apoptoz ve *BCL2*'nin ekspresyon seviyelerindeki azalma ile ilişkilendirilmiştir (Si ve ark., 2007). 2016 yılında Shi ve ark. tarafından yapılan 62 CRC'li, 22 kolit ilişkili kolon kanserli (KAK) neoplastik dokuda ve KAK fare modelinde miR-21 ekspresyon seviyelerinin anormal artış gösterdiği tespit edilmiştir. MiR-21 ekspresyon seviyelerindeki kaybın *BCL2* aktivasyonunu azaltarak KAK farelerinin tümör hücrelerinin apoptozunda bir artışa sebep olduğu bulunmuştur (Shi ve ark., 2016).

MiR-21 hedef genlerinin tanımlanması, miR-21'in *BCL2* dahil apoptoz yollarında görev alan genlerin ekspresyon seviyelerini nasıl etkilediğine dair yeni bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir (Si ve ark., 2007).

KRAS

Moghadamnia ve ark. tarafından 74 CRC'li hastada yapılan çalışmada evre III ve IV CRC'li doku örneklerinde *KRAS* mRNA ve miR-21 arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür. *KRAS* gen ekspresyonu CRC'li hastalarda hücre döngüsünün G0 ve G1 fazında en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Moghadamnia ve ark., 2020). MiR-21'in onkogenik RAS tarafından MAPK yoluyla ekspresyon seviyelerinin arttığı ve miR-21'in inhibisyonu *KRAS* kaynaklı tümörleri baskıladığı gözlenmiştir (Hatley ve ark., 2010).

MiR-31 onkogeni

MiR-31'in CRC'de hücre proliferasyonu, invazyon ve migrasyonunda karsinojenez oluşumu ve metastazında etkili olduğu görülmüştür (Yang ve ark., 2016). MiR-31 CRC'de, ileri TNM evresi ve daha derin invazyonu olan kanserlerde anormal artan ekspresyon seviyeleri göstermiştir (Wang ve ark., 2009). MiR-31'in klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi inceleyen bir diğer çalışmada CRC'li hastalarda MiR-31'in yüksek ekspresyonu ve miR-143'ün azalmış ekspresyonu agresif müsinöz fenotip ile ilişkilendirilmiştir (Chang ve ark., 2011). CRC'li hastalarda 760 miRNA'nın incelendiği çalışmada yüksek miR-31 ekspresyonu mortaliteyle ilişkili bulunmuş olup, miR-31 inhibitörünün anti-tümör erkisi olduğu tespit edilmiştir (Nosho ve ark., 2014). MiR-31'in CRC'de tanısal bir biyobelirteç ve umut verici bir terapötik hedef olacağı düşünülmektedir (Lin ve ark., 2017). 2006'da Bandres ve ark. tarafından yapılan

çalışmada CRC'li hastalardan alınmış doku örneklerinde 156 miRNA ekspresyonu incelenmiştir ve CRC'li hastalarda miR-31'in artan ekspresyonu raporlanmıştır. MiR-31'in anormal ekspresyonu IV. evre CRC hastalarında II. evreye göre önemli seviyede daha yüksek bulunmuştur (Bandrés ve ark., 2006). 2008 yılında Slaby ve ark. tarafından CRC ve tümör olmayan komşu doku örneklerinde yapılan çalışmada miR-31'in ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenmiştir (Slaby ve ark., 2008). Farklı evrelerdeki CRC dokularının kullanıldığı bir diğer çalışmada geç evre (III ve IV) CRC hastalarından alınan örneklerde, erken evre (I ve II) CRC hastalarından alınan örneklerle kıyasla miR-31 ekspresyon seviyelerinin arttığı saptanmıştır (Arndt ve ark., 2009). Kolorektal mukozaya sahip 55 hastadan alınan örneklerde yapılan çalışmada kontrol grubuna göre CRC'de miR-31'in artan ekspresyonu, miR-143'ün ise azalan ekspresyon seviyeleri gözlenmiştir (Earle ve ark., 2010).

MiR-31'in hedef genleri arasında *RASA1*, *TIAM1*, *SFRP1*, *SATB2*, *KRAS*, *FOXC2*, *FOXP3*, *AXIN1* bulunmaktadır (Bandrés ve ark., 2006; Cottonham ve ark., 2010; Sun ve ark., 2013; Kent ve ark., 2016; Lundberg ve ark., 2018; Li ve ark., 2024).

KRAS

MiR-31 ekspresyon seviyesi ve *KRAS* mRNA düzeylerinin CRC'li hastalarda arttığı tespit edilmiştir (Moghadamnia ve ark., 2020). MiR-31'in ekspresyonu, onkogenik *KRAS* ekspresyonu ve MAPK yolunun aktivasyonu ile korele bulunmuştur (Kent ve ark., 2016). *KRAS* ve diğer *RAS* ailesi üyelerinin mutasyonları CRC dahil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde rol almaktadır ve *RAS* sinyalleme tümör gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili bulunmuştur (Prior ve ark., 2012). Onkogenik *KRAS*'ın, MAPK yoluyla transkripsiyonel düzenlenmesi ve *ELK1* transkripsiyon faktörünün miR-31 promotörüne alınması yoluyla miR-31 ekspresyon seviyelerini arttırdığı tespit edilmiştir (Kent ve ark., 2016).

MiR-143 tümör baskılayıcı geni

MiR-143, tümör baskılayıcı bir miRNA olarak CRC'li hastaların serum, dışkı ve tümör dokularında ekspresyon seviyelerinin azaldığına ilişkin veriler mevcuttur (Kulda ve ark., 2010; Li ve ark., 2012; Hofslı ve ark., 2013). MiR-143'ün azalan ekspresyonu artan klinik evre ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir (Chang ve ark., 2011; Qian ve ark., 2013).

CRC’de miRNA ekspresyon profilini inceleyen ve CRC için spesifik miRNA’ların işlevini analiz eden bir çalışmada, CRC’li doku örneklerinde sürekli olarak azalmış miR-143 ekspresyon seviyeleri görülmüştür (Arndt ve ark., 2009). MiR-143’ün anormal artan ekspresyonunun metastatik olmayan CRC hücrelerinde tümör baskılayıcı olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir (Akao ve ark., 2006). MiR-143 ekspresyon artışının *e-cadherin* ekspresyonunu arttırdığı, hücre proliferasyonu ve hücre metabolizmasını azalttığı görülmüştür (Arndt ve ark., 2009). 2009 yılında Motoyama ve ark., tarafından yapılan çalışmada 69 CRC’li hastadan alınan doku örneklerindeki miR-143 ekspresyon seviyeleri sağlıklı dokulara kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Motoyama ve ark., 2009).

2013 yılında Qian ve ark. tarafından yapılan çalışmada CRC’li hastaların plazma örneklerindeki miR-143 ekspresyon seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre önemli derecede azaldığı ve miR-143 seviyelerinin CRC hastalarının klinik evreleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Geç evre CRC hastalarında (evre III, IV) erken evre (I,II) CRC hastalarına göre daha düşük miR-143 ekspresyon seviyelerine rastlanmıştır. Geç evre CRC hastalarında genellikle görülen lenf nodu metastazına sahip kişilerde, metastaz bulunmayanlara göre miR-143 seviyelerinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. MiR-143’ün artan ekspresyonunun hücre proliferasyonunu, migrasyonunu, tümör büyümesini ve anjiyogenezi inhibe ettiği tespit edilmiştir (Qian ve ark., 2013).

KRAS, DNMT3A, HK2, IGF-IR, MACC1, ITGA6, ASAP3, BCL2, MYC, MMP9, MMP7, FOSL2, ERBB3, ERK5 miR-143’ün tespit edilen hedef genlerindendir (Akao ve ark., 2007; Slaby ve ark., 2008; Chen ve ark., 2009; Ng ve ark., 2009; Gregersen ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2012; Qian ve ark., 2013; Bai ve ark., 2016; Yu ve ark., 2016; Li ve ark., 2018; Guo ve ark., 2019; Karimi ve ark., 2019).

KRAS

KRAS onkogeni, miR-143’ün hedef genlerinden biridir (Chen ve ark., 2009). MiR-143’ün *KRAS* 3’UTR’yi hedeflediği tespit edilmiştir (Kent ve ark., 2016). *KRAS* gen aktivasyonu RAS/RAF/MEK/ERK sinyal yolunu aktive eder. Bununla birlikte artan hücre proliferasyonu, azalan hücre apoptozu ve CRC’de malign sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Fang ve Richardson, 2005; Michor ve ark., 2005). CRC’de *KRAS* proteini ile miR-143 arasında ters bir korelasyon bulunmuştur. MiR-143 ekspresyon artışıyla *KRAS* ekspresyonunu inhibe olmaktadır. MiR-143 tarafından *KRAS* ekspresyonunun

inhibisyonu, *ERK1/2*'nin yapısal fosforilasyonunu inhibe eder ve CRC hücre büyümesini baskılamada rol oynadığı tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2009) . MiR-143'ün ekspresyon artışı, *KRAS* transkripsiyonunu inhibe ederek MAPK fosforilasyonunu bloke ettiği ve CRC hücre proliferasyonunu baskıladığı raporlanmıştır (Chen ve ark., 2009).

KRAS, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyallemede önemli bir faktördür. EGFR'nin uyarılmasıyla birlikte RAS/MAPK sinyal yolunun aktivasyonuna ve hücre döngüsünün progresyonu ve proliferasyonun artmasıyla karsinogenezin başlamasına neden olmaktadır (Slaby ve ark., 2009). MiR-143'ün hedef geni olan *KRAS*'ın ekspresyon seviyesindeki kaybın CRC'yi kontrol etmek için potansiyel bir tedavi stratejisi olabileceği düşünülmektedir (Karimi ve ark., 2019).

HK2

MiR-143'ün hedef geni olan *HK2* CRC hücrelerinde glikoz metabolizmasında etkilidir (Gregersen ve ark., 2012). *HK2*, glikozun glikoz-6-fosfata fosforilasyonu yoluyla glikolizin ilk adımını katalize etmektedir. *HK2* ekspresyon seviyeleri kanserde artış göstererek, tümör büyümesi için gerekli olan glikoz metabolizmasını kolaylaştırmaktadır (Mathupala ve ark., 2006). MiR-143'ün artan ekspresyonu, glikolitik enzim *HK2*'yi hedefleyerek *HK2* ekspresyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. MiR-143'ün aracılık ettiği *HK2*'nin ekspresyon seviyelerindeki kaybın laktat salgısında azalma ile sonuçlandığı tespit edilmiştir (Gregersen ve ark., 2012).

Kanser hücrelerinde miR-143 kaybının, *HK2* ekspresyon seviyelerindeki artışla, glikolizi teşvik ederek kanser hücrelerinin büyümesini destekleyeceği düşünülmektedir (Gregersen ve ark., 2012).

DNMT3A

MiR-143 *DNMT3A*'yı hedefleyerek DNA metilasyonu düzenlenmesinde rol oynamaktadır. MiR-143 ekspresyon seviyelerinin CRC'li hastalarda azaldığı ve *DNMT3A* mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri ile ters korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Ng ve ark., 2009). DNA metilasyonu onkogeneizde önemli bir role sahiptir. Karsinogeneizde tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyon yoluyla inhibisyonu gözlenmektedir (Jones ve Baylin, 2007). Genomdaki metilasyon değişiklikleri, DNMT'ler tarafından kontrol edilmektedir (Jeltsch, 2002). Yapılan çalışmalarda

DNMT1, *DNMT3A* ve *DNMT3B* mRNA seviyelerinin CRC dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde arttığı tespit edilmiştir (Eads ve ark., 1999; Oh ve ark., 2007; Ding ve ark., 2008).

BCL2

MiR-143, CRC’de ekspresyon seviyesi azalan tümör baskılayıcı miRNA’dır. MiR-143, tümör büyümesi ve metastazı ile ilişkili olan *BCL2* geninin negatif düzenleyicisidir. MiR-143’ün anormal ekspresyon gösterdiği hücrelerde *BAX/BCL2* oranında önemli bir artış gözlenmiştir (Karimi ve ark., 2019). *BCL2*’nin CRC’de önemli bir rolü bulunmaktadır (Karimi ve ark., 2017). Bcl-2 proteini mitokondrinin dış zarında bulunur ve apoptozun başlaması için gerekli olan sitokrom C’nin salınımını engellemektedir (Jafarlou ve ark., 2018). MiR-143 tarafından hedeflenen *BCL2* ekspresyon seviyeleri ve *BAX/BCL2* oranı önemli bir tedavi göstergesi olarak kullanılmaktadır (Al-Qathama ve ark., 2017).

MiR-196a onkogeni

MiR-196 gen ailesi miR-196a-1, miR-196a-2 ve miR-196b olmak üzere üç üyeden oluşmaktadır (Mehrjoei ve ark., 2024). MiR-196a, karsinogenezde proliferasyon, invazyon, metastaz ve apoptoz gibi süreçlerde yer almaktadır (Liu ve ark., 2013; Ge ve ark., 2014; Chen ve ark., 2016). CRC’li hastaların serum, plazma ve doku örneklerinde miR-196a ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir. (Mehrjoei ve ark., 2024).

Yapılan bir çalışmada 126 CRC’li doku örneğinde miR-196a ekspresyon seviyelerinin anormal artış gösterdiği gözlenmiştir. MiR-196a’nın yüksek ekspresyonu lenf nodu metastazı ve CRC’de ileri TNM evresi ile pozitif olarak ilişkili bulunmuştur (Ge ve ark., 2014).

HoxA7, *HoxB8*, *HoxC8*, *HoxD8*, *Ikbα*, *ING5*, *AKT1*, *PDCD4*, *ANXA1* miR-19a’nın tespit edilen hedef genlerindendir (Schimanski ve ark., 2009; Fawzy ve ark., 2017; Pao ve ark., 2018; Xin ve ark., 2019; Zheng ve ark., 2022; Mehrjoei ve ark., 2024).

AKT1

MiR-196a, CRC hücrelerinde invazyon ve migrasyona sebep olmaktadır. MiR-196a ekspresyon seviyelerindeki artışın CRC’deki pulmoner metastazlarla ilişkili olduğu düşünülmüştür. MiR-196a’nın PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu indüklediği

gözlenmiştir. CRC’de miR-196a ekspresyon seviyelerindeki artışın *AKT1* fosforilasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Schimanski ve ark., 2009).

188 CRC’li hastadan alınan kan örnekleriyde yapılan *in silico* analizde miR-196a’nın hedef geni olan *AKT1*’in artan ekspresyon seviyeleri CRC progresyonuyla önemli ölçüde korele bulunmuştur. CRC hastalarında görülen anormal *AKT1* ekspresyon seviyeleri düşük sağkalımla birlikte görülmüştür. Gen Ontolojisi ve Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi zenginleştirme analizleri miR-196a’nın hücresel protein modifikasyon süreci, adherens junction, mitotik hücre döngüsü ve hücre dışı matriks reseptör etkileşim yolları gibi onkogenik yollarla ilişkili bulunmuştur (Pao ve ark., 2018).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

miRNeasy Mini Kit	Qiagen 217004
Eritrosit Liziz Tamponu 2x çözeltisi	Biobasic PL012
miRCURY LNA Ters Transkriptaz (RT) Kit	Qiagen 339340
miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit	Qiagen 339347
hsa-miR-21 miRCURY LNA miRNA PCR Assay	Qiagen 339306
hsa-miR-31 miRCURY LNA miRNA PCR Assay	Qiagen 339306
hsa-miR-143 miRCURY LNA miRNA PCR Assay	Qiagen 339306
hsa-miR-196a-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay	Qiagen 339306
Gen ekspresyonu syber green karışımı	
SensiFAST SYBR® No-ROX Kit	Bioline BIO-98050
<i>BCL2</i> primer	Sentebiolab
<i>PTEN</i> primer	Sentebiolab
<i>DNMT3A</i> primer	Sentebiolab
<i>KRAS</i> primer	Sentebiolab
<i>HK2</i> primer	Sentebiolab
<i>Beta-actin</i> primer	Sentebiolab
<i>GAPDH</i> primer	Sentebiolab

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Eppendorf
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik 2041 D
Derin dondurucu (-80 °C)	Daihan-Scientific Wisecry
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Epoch Biotek
Mikrosantrifüj	Hettich Micro 120
Otoklav	Hirayama HV-50L
Otomatik pipetör	Eppendorf

Gerçek zamanlı termal döngü cihazı (‘Real-time PCR’, RT-PCR)	Roche Life Science Lightcycler 480-II
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich Micro 200R
Soğutmalı santrifüj	Hettich Micro Universal 32R
Spin santrifüj	Labnet C1301B
Termal döngü cihazı-Altın blok	Applied Biosystems 9700
Termal döngü cihazı-Gradient	Axygen Therm-1000
Vorteks	NC 28405-Ika

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Falkon tüp (15 mL; 50 mL)	Citotest
Falkon tüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
İnce duvarlı RT-PCR tüpü (0,2 mL)	Greiner bio-one
Lateks eldiven	Broche
Mikrotüp (0,5 mL; 1,5 mL)	Greiner bio-one
Mikrotüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Nitril eldiven	Broche
Otoklav bandı	Sussex
Pipet ucu (0,1-10 µL)	Eppendorf
Pipet ucu (0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Nest

3.4. Hasta ve Kontrol Örneklerle ait Bilgiler

Tez çalışmasında metastatik CRC hastalığının erken tanı ve prognozuna yarar sağlayabilecek biyobelirteçlerin taranması hedeflendi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Onkoloji Anabilim Dalı polikliniklerine başvuran metastatik kolorektal kanser tanısı konulmuş 51 hasta ve kontrol grubu olarak kanser tanısı bulunmayan 14 sağlıklı gönüllüden kan örnekleri alındı. Tüm çalışma materyalleri 21/08/2020 tarih ve 19 sayılı İstanbul Üniversitesi-İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu kararına uygun olarak toplandı. Hastaların yaşları, cinsiyetleri, telefon numaraları, tanı tarihleri kaydedildi. Hastaların tamamından EDTA içeren vakumlu tüplere 10 ml tam kan alındı. Kan örnekleri hastaların kendilerinin veya yakınlarının rızası ile alındı. Alınan kanlar +4°C’de saklanarak miRNA izolasyonu

yapıldı. Araştırılacak hastalar çalışma konusunda bilgilendirilerek onayları ile birlikte rıza formları alındı.

3.5. Çalışma Dışı Bırakma Kriteri

Hastalarda klinik, laboratuvar ve patoloji sonucu ile kolorektal kanser tanısı konmuş hastalardan metastatik evrede olmayan hastalar ve metastatik evrede olup faz 3 ilaç çalışmalarına katılmış hastalar çalışma dışı bırakıldı.

3.6. MikroRNA'ların Tayini

3.6.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA, Eritrosit Liziz Tamponu (Buffer EL) ve miRNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda total kandan izole edildi.

Kit İçeriği

50 RNeasy mini döndürme kolonu

Toplama tüpleri 1,5 mL

Toplama tüpleri 2 mL

QIAzol Liziz Reaktifi

Buffer RWT

Buffer RPE

RNAz içermeyen su

Deney protokolü

1. Hasta ve kontrol grubundan alınan total kan örnekleri yavaşça alt üst edilerek karıştırıldı ve falkon tüplere 7,5 mL alındı. Üzerine 15 mL Buffer EL eklendi ve hafifçe karıştırıldı.
2. Buz üzerinde 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sırasında iki kez kısaca vortekslendi.
3. 4°C 400 g'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
4. Pellet üzerine 2 katı hacimde (yaklaşık) Buffer EL eklenerek kısaca vortekslendi.
5. 4°C 400 g'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.

6. Pelletin üzerine 700 µL QIAzol Liziz Reaktifi eklendi. Vortekslenerek pellet çözüldü.
7. Üzerine 140 µL kloroform eklendi ve tüp 15 saniye kuvvetlice sallandı.
8. 4°C 12.000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra örnek 3 faza ayrıldı; RNA içeren üstteki renksiz sulu faz, beyaz ara faz ve kırmızı organik bir faz.
9. RNA içeren üstteki sulu renksiz faz yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Üzerine 1,5 katı (yaklaşık) hacimde %100 etanol eklendi. Birkaç kez yukarı aşağı pipetlenerek iyice karıştırıldı.
10. Karışım RNeasy mini döndürme kolonu + toplama tüpüne alındı.
11. Oda sıcaklığında 8.000 g'de 15 saniye santrifüjlendi ve toplama tüpleri boşaltıldı.
12. Örnekler tekrar oda sıcaklığında 8.000 g'de 15 saniye santrifüjlendi. Toplama tüpleri boşaltıldı.
13. RNeasy mini döndürme kolonuna 500 µL Buffer RPE eklendi ve 8.000 g'de 15 saniye santrifüjlendi ve toplama tüpleri boşaltıldı.
14. RNeasy mini döndürme kolonuna tekrar 500 µL Buffer RPE eklendi. Kapağı yavaşça kapatıldı ve RNeasy mini döndürme kolonu membranını kurutmak için 8.000 g'de 2 dakika boyunca santrifüjlendi.
15. Santrifüjlemenin ardından, etanolün taşınmasını engellemek için RNeasy mini döndürme kolonu, toplama tüpünden dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Toplama tüpleri atıldı.
16. RNeasy mini döndürme kolonları yeni 1,5 mL'lik toplama tüplerine aktarıldı. 50 µL RNAz içermeyen su, RNeasy mini döndürme kolonunun tüm membranına gelecek şekilde pipetlendi.
17. 8.000 g'de 1 dakika santrifüjlerele elde edilen total RNA -80 °C'de saklandı.

3.6.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

İzole edilen RNA'nın saflığı ve miktar tayini Epoch Biotek mikropilaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm'deki ölçümler RNA miktarının belirlenmesinde kullanıldı. RNA'nın saflığının belirlenmesinde kullanılan A260/A280 oranı ise yaklaşık $1,95 \pm 0,1$ olmalıdır.

3.6.3. cDNA Sentezi

Ölçüm sonrası elde edilen total RNA örneklerinden miRCURY LNA RT Kit (Qiagen) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA'nın bozulmasını engellemek için tüm reaksiyonlar buz üzerinde gerçekleştirildi.

Kit İçeriği

5x miRCURY RT ('reverse transcriptase') Reaksiyon Tamponu

10x miRCURY RT Enzim Karışımı

RNaz İçermeyen Su

Deney protokolü

1. RNA örnekleri ve kit içeriğindeki 5x miRCURY RT Reaksiyon Tamponu buz üzerinde çözüldü. RNaz içermeyen su oda sıcaklığında çözüldü. Kullanmadan hemen önce 10x miRCURY RT Enzim Karışımı dondurucudan çıkarıldı. Tüplere hafifçe vurularak karıştırıldı ve kenardaki sıvıyı toplamak için kısa süre spin santrifüjlenerek buz üzerinde tutuldu.
2. RNA örnekleri 5 ng/ μ L'ye ayarlandı. Tablo 3-1'e göre buz üzerinde ters transkripsiyon ana karışımı hazırlandı. Karıştırılarak buz üzerinde bekletildi. Ana karışım tüplerdeki her bir RNA örneğine uygun hacimde eklendi.
3. 42°C'de 60 dk inkübe edildi.
4. Ters transkriptaz enzim inaktivasyonu için 95°C'de 5 dk inkübe edildi ve hemen 4°C'ye soğutulularak tüpler buz üzerine alındı.
5. cDNA saflaştırmaya gerek olmaksızın PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Tablo 3-1: Ters transkripsiyon reaksiyon ürünlerinin hazırlanışı

5x miRCURY RT reaksiyon tamponu	RNaz içermeyen su	10x miRCURY RT enzim karışımı	Örnek RNA (5 ng/ μ L)	Total reaksiyon miktarı
2 μ L	4,5 μ L	1 μ L	2 μ L	9,5 μ L

3.6.4. miRNA Ekspresyonlarının miRNA PCR ‘Assay’ler Kullanılarak Real-Time PCR ile Tayini

MiRNA’ların tayini

Hsa-miR-21, hsa-miR-31, hsa-miR-143, hsa-miR-196a ve referens miRNA olarak UniSp6’nın ekspresyon analizleri ‘miRCURY LNA miRNA PCR Assay’ler (Qiagen) kullanılarak ‘miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit’ (Qiagen) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda RT-PCR’da gerçekleştirildi.

Kit İçeriği

‘miRCURY LNA miRNA PCR Assay’ler (hsa-miR-21, hsa-miR-31, hsa-miR-143, hsa-miR-196a)

‘2x miRCURY SYBR Green Master Mix’ karışımı

RNAz İçermeyen Su

Reaktiflerin Hazırlanması

‘PCR Assay’ primerleri santrifüjlendi ve 220 µl RNAz içermeyen su primer tüplerinin tüm duvarına gelecek şekilde eklendi. Üç defa vortekslendi ve santrifüj yapıldı. ‘2x miRCURY SYBR Green Master Mix’ karışımı, RNAz içermeyen su ve örnek cDNA’lar çözdürüldü, vortekslendi ve santrifüj yapıldı.

Deney Protokolü

1. Örnek cDNA’ların 1 µL’sine 19 µL RNAz içermeyen su eklenerek 1:20’ye seyreltildi.
2. Tablo 3-2’ye göre mikropiçinin her bir kuyucuğunda toplamda 10 µL’lik bir reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 3-2: miRCURY LNA miRNA PCR Reaksiyon Ürünleri

‘2x miRCURY SYBR Green Master Mix’ Karışımı	PCR primer karışımı	cDNA örnekleri (1:20 seyreltilmiş)	RNAz içermeyen su	Total miktarı	reaksiyon
5 µL	1 µL	3 µL	1 µL	10 µL	

3. Mikroplakanın üzeri mikrolaka filmi ile kapatılarak oda sıcaklığında kısa süre santrifüjlendi.
4. Mikrolaka LightCycler 480 RT-PCR cihazına konularak ölçüm yapıldı. RT-PCR protokolü Tablo 3-3’de gösterilmiştir.

Tablo 3-3: RT- PCR protokolü

Program adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç ısı aktivasyonu	1	95	2 dk
Denatürasyon	45	95	10 sn
Primerlerin hedef DNA’ya bağlanma ve uzama aşamaları	45	56	1 dk
Erime eğrisi analizi	1	60	5 sn
Soğutma	1	40	10 sn

Sonuçların değerlendirilmesi

MiR-21, miR-31, miR-143, miR-196a ve referans miRNA olarak kullanılan UniSp6 için spesifik RT-PCR kantitatif Ct değerleri belirlendi. Genlerin relatif ekspresyonu kontrol grubuna göre Livak ve Schmittgen’in (2001) geliştirdiği karşılaştırmalı Ct yöntemi (Livak yöntemi) ile değerlendirildi. Bu yöntemde, RT-PCR analizinde örneğin çoğalmasının (amplifikasyonunun) görüldüğü döngü sayısı olan Ct değerleri kullanılır:

- Bu değerler, “araştırılmak istenen genin (hedef gen) Ct değeri” ile “referans genin Ct değeri” arasındaki fark olan ΔCt değeri hesaplanarak normalize edilir.

$$\Delta Ct = Ct (\text{hedef genin Ct değeri}) - Ct (\text{referans genin Ct değeri})$$

- ΔCt değerleri her örnek için hesaplandıktan sonra $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplanır. Bu değer, “hedef genin ΔCt değeri” ile “kontrol grubunun ΔCt ortalaması” arasındaki farktır.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{hedef genin } \Delta Ct \text{ değeri}) - \text{ort. kont. } \Delta Ct (\text{kontrol grubunun } \Delta Ct \text{ ortalaması})$$

- Son olarak, standartize edilmiş ekspresyon seviyesi belirlenmek için; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılır. Bu değerler, örneğin kontrol gruplarına göre hasta gruplarında ekspresyon değişiminin kaç kat olduğunu belirlemek için kullanılır.

3.7. MiRNA'ların Hedef Aldığı Genlerin Ekspresyonlarının Tayini

BCL2, *PTEN*, *DNMT3A*, *KRAS*, *HK2* ve referens genler olarak *Beta-actin* ve *GAPDH* genlerinin ekspresyonları Bölüm 3.5.3.'de belirtildiği üzere sentezlenen cDNA, primer ve SensiFAST SYBR® No-ROX Kit (Bioline) kullanılarak RT-PCR ile gerçekleştirildi.

Kullanılan Malzemeler

Gene özgü primerler (Tablo 3-4'de hedef genlerin ekspresyonunun tayininde kullanılan primer dizileri gösterilmiştir.)

PCR kalitede su

'SensiFAST SYBR® No-ROX mix (2x)' karışımı

Tablo 3-4: Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile tayininde kullanılan primer dizileri

Gen adı	Primer dizisi (5'-3')	Sıcaklık (°C)	Kaynak
<i>BCL2</i>	F: TGTGGCCCAGATAGGCACC R: ACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG	58	Ali ve ark. (2017)
<i>PTEN</i>	F: 5'-TCGACTACTTGCTTTGTAGA-3' R: 5'-TTTACAGCCCCGATTGGGCT-3'	58	Huang ve ark. (2020)
<i>DNMT3A</i>	F: GGTCACGCAAAACAGAACCC R: CCTTGGTGAAACCCTTTGCG	58	Gu ve ark. (2017);
<i>KRAS</i>	F: CATGGACTGTGTCCCCACG R: TGACTAACCAATGCATGACAACACT	49	Kent ve ark. (2016)
<i>HK2</i>	F: CAAAGTGACAGTGGGTGTGG R: GCCAGGTCCTTCACTGTCTC	55	Guo ve ark. (2017)
<i>GAPDH</i>	F: GGCCTCCAAGGAGTAAGACC R: AGGGGTCTACATGGCAACTG	55	Hao ve ark. (2014)
<i>Beta-actin</i>	F: AACTACCTTCAACTCCAT R: TGATCTTGATCTTCATTGTG	48	Rosa ve ark. (2009)

Deney Protokolü

Aşağıdaki gösterildiği gibi uygun miktarlarda bileşenler ilave edilerek RT-PCR karışımı hazırlandı ve dikkatlice pipetleme yapıldı.

'SensiFAST SYBR® No-ROX mix' karışımı	10 µL
Forward primer:	1 µL
Reverse primer:	1 µL

PCR kalitede su:	3 µL
Toplam hacim:	15 µL

1. Hazırlanan RT-PCR karışımından 15 µL mikropalkanın her kuyucuğuna ilave edildi.
2. cDNA örnekleri steril su ile 1:10 oranında seyreltildi.
3. Hazırlanan cDNA örneklerinden 5 µL her bir kuyucuğa eklendi ve mikropalkanın üzeri mikropalka filmi ile kapatıldı.
4. Mikropalka 1500 x g'de 2 dk. santrifüj edildi.
5. Mikropalka LightCycler 480 RT-PCR cihazına konularak ölçüm yapıldı. RT-PCR protokolü Tablo 3-5'de gösterilmiştir.

Tablo 3-5: RT- PCR protokolü

Program adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre
Polimeraz aktivasyonu	1	95	2 dk
Denatürasyon	40	95	5 sn
Primerlerin hedef DNA'ya bağlanması	40	48-66	10 sn
Uzama	40	72	15 sn
Erime eğrisi analizi	1	95	5 sn
Erime eğrisi analizi	1	65	1 dk

Sonuçların değerlendirilmesi

BCL2, *PTEN*, *DNMT3A*, *KRAS*, *HK2* ve referens genler olarak *Beta-actin* ve *GAPDH* genlerinin için spesifik RT-PCR kantitatif Ct değerleri belirlendi. Genlerin relatif ekspresyonu kontrol grubuna göre Livak ve Schmittgen'in (2001) geliştirdiği karşılaştırmalı Ct yöntemi (Livak yöntemi) ile Bölüm 3.5.4'de açıklandığı şekilde değerlendirildi.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler, IBM SPSS.25 (IBM Inc., Chicago, IL, ABD) programına aktarılarak istatistiksel analizlerle değerlendirildi. İstatistiksel analizlere geçmeden önce veri giriş hatasının olmaması ve parametrelerin beklenen aralıkta olup olmadığı ile ilgili

kontroller yapıldı. Sürekli değişkenlerin tanımlayıcı istatistiklerin de ortalama ve standart sapma, kategorik değişkenlerin tanımlanmasında ise kişi sayısı (n) ve yüzde (%) değerleri verildi. Kategorik değişkenler arasındaki kıyaslamalarda Ki- Kare testi kullanıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov Smirnov normallik testi ile, varyans homojenliği ise Levene's testi ile kontrol edildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar normal dağılım görülmeyen durumlarda ortalama kıyaslaması için Mann Whitney-U testi, medyan kıyaslaması için ise Medyan testi ile yapıldı. Sürekli değişkenlerin birbiri arasındaki korelasyonun incelenmesinde ise Spearman's rho analizi uygulandı. Bütün analizlerde anlamlılık düzeyi olarak $p<0.05$ değeri kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. CRC'li Hasta ve Kontrol Grubundan Alınan Örneklerle Ait Bilgiler

Çalışmaya 51 patolojik olarak kolorektal kanser teşhisi konmuş hasta ve herhangi bir kanser öyküsü olmayan 14 birey kontrol grubu olarak alındı. Hasta ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyetleri benzer olarak seçildi.

Çalışmaya 51'i (%78,5) hasta, 14'ü (%21,5) kontrol grubundan toplamda 65 kişi dahil edildi. Katılımcıların 30'u (%46,2) erkek, 35'i (%53,8) kadındı. En küçük katılımcı 18, en büyük katılımcı ise 86 yaşında olup, hastaların yaş ortalaması 57.05 ± 16.78 'di. Çalışmaya katılan kişilerden 30'u sağ iken 35 kişi ex olmuştur. Hastaların 16 (%34,37)'sı sağ iken; 35 (%68,63)'i ex olmuştur. Hastaların 26 (%50,98)'sı erkek; 25 (%49,02)'si kadındır. Çalışmaya alınan bireylerin demografik bilgileri Tablo 4-1'de verilmiştir.

Tablo 4-1: Çalışmaya alınan bireylerin demografik bilgileri

Grup	n	%
Kontrol	14	21.5
Hasta	51	78.5
Mortalite		
Sağ	30	46.2
Vefat	35	53.8
Cinsiyet		
Erkek	30	46.2
Kadın	35	53.8
		Medyan (Min.-Maks.)
Yaş	57.05 ± 16.78	61(18-86)

4.2. Hastalardan İzole Edilen RNA'ların Optik Dansite Sonuçları

Hasta ve kontrol bireylerden alınan 8-10 mL venöz kan örneklerinden "Qiagen miRNeasy Mini Kit" kullanılarak izole edilen RNA'ların saflığı ve miktarı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikropłaka okuyucu spektrofotometrede de ölçümü gerçekleştirilmiştir. Optik dansite sonuçlarına göre tüm örneklerde RNA izolasyonu gerçekleşmiş hem hasta hem de kontrol örneklerde total RNA miktarları ve saflıklarının çalışmaya uygun olduğu görüldü (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Kontrol ve hasta grubundan alınan örneklerde total RNA miktarları ve saflıkları

RNA Örnekleri			
Örnek Grupları		A_{260}/A_{280}	Miktarı (ng/ μ L)
Kontrol Grubu	1	1,885	55,685
	2	1,944	43,584
	3	1,887	34,949
	4	1,95	72,228
	5	1,849	40,5
	6	1,878	53,071
	7	1,891	39,655
	8	1,971	110,059
	9	1,953	30,567
	10	2,067	37,947
	11	1,929	60,789
	12	1,843	33,743
	13	1,394	20,515
	14	1,941	64,025
Hasta Grubu	1	2,029	219,158
	2	1,982	96,5345
	3	1,932	26,996
	4	1,996	151,3515
	5	2,022	129,452
	6	1,927	25,887
	7	1,996	135,191
	8	2,021	126,546
	9	1,990	51,477
	10	1,998	105,5935
	11	2,009	164,95
	12	1,924	19,1495
	13	1,988	55,602
	14	2,004	64,2195
	15	1,801	2,4325
	16	1,77	15,6005
	17	1,797	11,535
	18	1,982	128,4615
	19	1,981	124,4455
	20	1,966	120,034
	21	1,964	64,101
	22	2,011	199,466
	23	1,985	122,8015
	24	2,007	130,689
	25	1,813	91,4225
	26	1,989	135,674
	27	1,995	162,0365
	28	1,991	73,869
	29	1,924	22,195
	30	1,864	28,675
	31	1,913	49,186
	32	1,973	54,8045

33	1,959	49,716
34	1,99	80,674
35	1,933	39,46
36	1,957	80,358
37	2,015	76,1465
38	2,004	19,066
39	1,989	47,727
40	1,974	38,8505
41	2,02	9,637
42	1,997	99,7625
43	1,994	42,9605
44	1,996	133,4885
45	1,987	81,127
46	1,943	39,816
47	2,033	68,142
48	2,042	77,074
49	1,926	20,337
50	1,981	47,926
51	1,977	39,604

4.3. MiRNA Sonuçları

Çalışma kapsamında hasta ve kontrol grubu bireylerde hsa-miR-21, hsa-miR-31, hsa-miR-143 ve hsa-miR-196a ekspresyon seviyeleri referans miRNA olarak UniSp6 kullanılmasıyla ve RT-PCR reaksiyonu sonucu elde edilen Ct değerleri kullanılarak hesaplandı. Aşağıda elde edilen bulgular her bir hedef miRNA için ayrı ayrı verilmiştir. Çalışmaya alınan bireylerin miR-21, miR-31, miR-143, miR-196a sonuçları Tablo 4-3'te verilmiştir.

Tablo 4-3: Çalışmaya alınan bireylerin miR-21, miR-31, miR-143, miR-196a sonuçları

Grup	No	Yaş	Mortalite	Cinsiyet	mir-21	mir-143	mir-31	mir-196
K	3	68	Sağ	K	3,34	1,66	2,19	0,50
K	4	19	Sağ	K	0,47	0,57	0,11	0,13
K	5	60	Sağ	E	4,17	2,75	0,54	0,53
K	6	31	Sağ	K	0,71	2,48	0,54	0,13
K	7	23	Sağ	K	0,91	2,62	0,19	0,16
K	8	72	Sağ	E	0,25	0,86	0,06	0,13
K	9	40	Sağ	E	1,17	1,10	0,28	0,18
K	10	21	Sağ	K	3,58	1,07	0,44	0,52
K	11	60	Sağ	K	2,06	1,56	0,39	0,18
K	12	18	Sağ	K	0,02	0,86	0,54	0,13
K	17	18	Sağ	K	3,97	6,49	0,54	0,52

K	18	40	Sağ	K	0,36	0,52	0,10	0,13
K	19	28	Sağ	E	0,93	0,44	0,44	0,13
K	20	42	Sağ	K	4,86	2,85	0,54	1,05
H	1	49	Vefat	E	0,13	0,06	0,10	0,03
H	2	65	Vefat	E	0,16	0,12	0,29	0,13
H	4	65	Sağ	K	1,29	0,02	0,02	0,00
H	5	45	Vefat	K	0,05	0,04	0,06	0,13
H	6	73	Vefat	E	0,03	0,06	0,06	0,00
H	7	69	Sağ	K	0,00	0,03	0,03	0,00
H	8	58	Vefat	E	0,09	0,08	0,06	0,13
H	9	54	Sağ	K	0,01	0,03	0,03	0,00
H	10	71	Sağ	K	0,08	0,11	0,08	0,00
H	11	41	Vefat	K	0,18	0,10	0,04	0,00
H	12	64	Vefat	K	0,09	0,03	0,07	0,00
H	13	76	Vefat	E	0,00	0,00	0,03	0,00
H	14	41	Vefat	K	0,04	0,08	0,02	0,00
H	15	58	Vefat	K	1,88	0,26	0,13	0,01
H	16	67	Sağ	E	0,03	0,10	0,15	0,13
H	17	69	Sağ	E	0,12	0,33	0,11	0,13
H	18	69	Vefat	K	0,40	0,19	0,04	0,00
H	19	65	Vefat	E	0,16	0,38	0,22	0,00
H	20	66	Sağ	E	0,09	0,12	0,10	0,02
H	21	72	Vefat	K	1,19	0,33	0,04	0,13
H	22	64	Vefat	K	0,39	0,48	1,98	0,11
H	23	52	Sağ	E	0,06	0,06	0,18	0,01
H	24	52	Vefat	E	0,03	0,01	0,03	0,00
H	26	63	Vefat	E	0,04	0,01	0,07	0,01
H	27	61	Sağ	E	1,29	0,86	0,54	0,13
H	29	45	Vefat	K	5,58	3,50	2,11	0,13
H	30	28	Vefat	E	0,66	0,84	0,26	0,04
H	31	72	Sağ	K	0,95	1,12	0,29	0,02
H	32	70	Vefat	E	0,24	0,10	0,12	0,01
H	33	65	Vefat	K	0,86	0,46	0,22	0,02
H	34	55	Vefat	E	4,29	4,08	3,34	0,30
H	35	65	Vefat	K	1,29	0,86	0,54	0,13
H	36	76	Vefat	E	4,57	1,55	0,99	0,14
H	37	38	Vefat	K	2,79	2,77	2,99	0,02
H	38	61	Sağ	K	1,00	0,83	0,71	0,01
H	39	51	Sağ	E	0,40	0,14	0,22	0,01
H	40	86	Vefat	K	2,43	1,80	1,37	0,04
H	41	74	Vefat	E	1,28	0,63	0,14	0,01
H	42	58	Sağ	K	3,30	0,38	3,89	0,29
H	44	54	Vefat	E	2,91	2,75	0,72	0,27
H	45	69	Vefat	E	7,11	2,71	1,56	1,05

H	46	64	Vefat	E	0,32	0,05	0,17	0,02
H	47	76	Vefat	E	4,83	0,55	1,49	0,28
H	48	67	Sağ	K	0,28	0,16	0,44	0,13
H	49	85	Vefat	E	1,69	0,45	0,65	0,02
H	50	69	Sağ	E	0,23	0,09	0,20	0,03
H	51	65	Sağ	K	0,37	0,14	0,24	0,01
H	52	55	Vefat	K	0,35	0,17	0,33	0,02
H	53	59	Vefat	K	0,07	0,09	0,07	0,01
H	54	52	Vefat	K	0,19	0,09	0,19	0,13
H	55	80	Vefat	E	1,29	0,11	0,27	0,01

Referans miRNA UniSp6 kullanılarak miR-21, miR-31, miR-143, miR-196 için elde edilen verilere göre gen ekspresyonları hesaplandığında; bireylerin miR-21 geni için ortalaması $1,29 \pm 1,67$ olup medyan değeri 0,40; miR-31 geni için ortalaması $0,54 \pm 0,81$ olup medyan değeri 0,22; miR-143 geni için ortalaması $0,86 \pm 1,22$ olup medyan değeri 0,38; Mir-196a geni için ortalaması $0,13 \pm 0,21$ olup medyan değeri 0,04 idi (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: MiR-21, miR-31, miR-143, miR-196a için ortalama ve medyan değerleri

	Ort.	SS	Medyan	Min.	Maks.
miR-21	1.29	1.67	0.40	0.00	7.11
miR-31	0,54	0,81	0.22	0.02	3.89
miR-143	0,86	1,22	0.38	0.00	6.49
miR-196a	0,13	0,21	0.04	0.00	1.05

4.4. GAPDH Referans Gene Göre Gen Ekspresyonu Sonuçları

Çalışmaya alınan bireylerin GAPDH referans gene göre gen ekspresyonu sonuçları Tablo 4-5'te verilmiştir.

Tablo 4-5: Çalışmaya alınan bireylerin GAPDH referans gene göre gen ekspresyonu sonuçları

Grup	No	Yaş	Mortalite	Cinsiyet	KRAS	HK2	BCL2	PTEN	DNMT3A
K	3	68	Sağ	K	1,13	1,46	0,03	0,42	0,23
K	4	19	Sağ	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
K	5	60	Sağ	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
K	6	31	Sağ	K	7,43	1,62	0,38	2,76	7,17

K	7	23	Sağ	K	0,19	0,43	0,04	0,46	0,59
K	8	72	Sağ	E	2,19	1,11	0,18	0,35	0,91
K	9	40	Sağ	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
K	10	21	Sağ	K	1,96	2,96	0,33	5,67	2,70
K	11	60	Sağ	K	1,04	0,50	0,11	0,60	0,92
K	12	18	Sağ	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
K	17	18	Sağ	K	0,65	0,69	0,02	1,07	0,23
K	18	40	Sağ	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
K	19	28	Sağ	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
K	20	42	Sağ	K	0,22	0,87	0,15	1,52	1,93
H	1	49	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	2	65	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	4	65	Sağ	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	5	45	Vefat	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	6	73	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	7	69	Sağ	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	8	58	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	9	54	Sağ	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	10	71	Sağ	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	11	41	Vefat	K	0,48	6,39	0,08	3,51	1,85
H	12	64	Vefat	K	0,43	0,03	0,05	0,23	0,95
H	13	76	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	14	41	Vefat	K	3,61	8,73	0,19	17,66	2,99
H	15	58	Vefat	K	0,65	1,75	0,11	1,83	1,17
H	16	67	Sağ	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	17	69	Sağ	E	0,09	0,03	0,07	4,35	0,57
H	18	69	Vefat	K	0,67	10,82	0,23	1,14	1,57
H	19	65	Vefat	E	0,98	7,48	0,65	5,47	4,17
H	20	66	Sağ	E	0,26	13,89	0,08	1,56	3,74
H	21	72	Vefat	K	0,45	5,45	0,18	3,20	7,24
H	22	64	Vefat	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	23	52	Sağ	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	24	52	Vefat	E	0,04	0,21	0,12	0,51	1,16
H	26	63	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	27	61	Sağ	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	29	45	Vefat	K	0,43	7,48	0,11	1,88	1,77
H	30	28	Vefat	E	0,89	33,50	1,16	10,57	153,41
H	31	72	Sağ	K	0,30	1,57	0,03	0,96	1,02
H	32	70	Vefat	E	0,32	50,08	0,29	5,87	4,73
H	33	65	Vefat	K	0,71	3,60	0,04	0,74	1,82
H	34	55	Vefat	E	0,37	0,94	0,05	0,51	0,56
H	35	65	Vefat	K	0,71	8,49	0,10	3,92	1,48
H	36	76	Vefat	E	0,35	31,48	0,11	9,60	1,73
H	37	38	Vefat	K	0,22	3,85	0,04	1,98	0,36

H	38	61	Sağ	K	1,09	4,58	0,04	1,96	0,63
H	39	51	Sağ	E	0,30	6,80	0,20	2,42	2,25
H	40	86	Vefat	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	41	74	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	42	58	Sağ	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	44	54	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	45	69	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	46	64	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	47	76	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	48	67	Sağ	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	49	85	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	50	69	Sağ	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	51	65	Sağ	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	52	55	Vefat	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	53	59	Vefat	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	54	52	Vefat	K	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24
H	55	80	Vefat	E	0,98	7,48	0,18	3,20	7,24

GAPDH referans genine göre; bireylerin gen ekspresyonları *KRAS* geni için ortalaması $0,98 \pm 0,96$ olup medyan değeri 0,98; *HK2* geni için ortalaması $7,48 \pm 7,66$ olup medyan değeri 7,48; *BCL2* geni için ortalaması $0,18 \pm 0,15$ olup medyan değeri 0,18; *PTEN* geni için ortalaması $3,20 \pm 2,53$ olup medyan değeri 3,20 idi; *DNMT3A* geni için ortalaması $7,24 \pm 18,63$ olup medyan değeri 7,24 idi (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: *GAPDH* referans genine göre *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN* ve *DNMT3A* için ortalama ve medyan değerleri

	Ort.	SS	Medyan	Min.	Maks.
<i>KRAS</i>	0.98	0.96	0.98	0.04	7.43
<i>HK2</i>	7.48	7.66	7.48	0.03	50.08
<i>BCL2</i>	0.18	0.15	0.18	0.02	1.16
<i>PTEN</i>	3.20	2.53	3.20	0.23	17.66
<i>DNMT3A</i>	7.24	18.63	7.24	0.23	153.41

4.5. *Beta-actin* Referans Gene Göre Gen Ekspresyonu Sonuçları

Çalışmaya alınan bireylerin *beta-actin* referans gene göre gen ekspresyonu sonuçları Tablo 4-7’de verilmiştir.

Tablo 4-7: Çalışmaya alınan bireylerin *beta-actin* referans gene göre gen ekspresyonu sonuçları

Grup	No	Yaş	Mortalite	Cinsiyet	KRAS	HK2	BCL2	PTEN	DNMT3A
K	3	68	Sağ	K	0,53	0,68	0,01	0,19	0,11
K	4	19	Sağ	K	0,81	1,15	0,18	2,56	2,61
K	5	60	Sağ	E	0,81	1,15	0,18	2,56	2,61
K	6	31	Sağ	K	4,07	0,89	0,21	1,51	3,93
K	7	23	Sağ	K	0,40	0,91	0,09	0,98	1,25
K	8	72	Sağ	E	2,20	1,12	0,18	0,35	0,92
K	9	40	Sağ	E	0,81	1,15	0,18	2,56	2,61
K	10	21	Sağ	K	1,33	2,01	0,22	3,85	1,83
K	11	60	Sağ	K	0,74	0,36	0,07	0,42	0,66
K	12	18	Sağ	K	0,81	1,15	0,18	2,56	2,61
K	17	18	Sağ	K	0,94	0,99	0,03	1,54	0,34
K	18	40	Sağ	K	0,81	1,15	0,18	2,56	2,61
K	19	28	Sağ	E	0,81	1,15	0,18	2,56	2,61
K	20	42	Sağ	K	0,57	2,28	0,38	3,99	5,08
H	1	49	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	2	65	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	4	65	Sağ	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	5	45	Vefat	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	6	73	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	7	69	Sağ	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	8	58	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	9	54	Sağ	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	10	71	Sağ	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	11	41	Vefat	K	0,35	4,56	0,06	2,51	1,32
H	12	64	Vefat	K	1,70	0,12	0,18	0,91	3,77
H	13	76	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	14	41	Vefat	K	2,90	7,01	0,15	14,17	2,40
H	15	58	Vefat	K	1,05	2,83	0,18	2,96	1,90
H	16	67	Sağ	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	17	69	Sağ	E	0,23	0,08	0,16	10,67	1,39
H	18	69	Vefat	K	0,43	6,91	0,15	0,73	1,00
H	19	65	Vefat	E	0,05	2,85	0,13	1,12	0,85
H	20	66	Sağ	E	0,40	4,85	0,07	1,39	3,33
H	21	72	Vefat	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	22	64	Vefat	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	23	52	Sağ	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	24	52	Vefat	E	0,74	3,63	2,00	8,78	19,89
H	26	63	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	27	61	Sağ	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	29	45	Vefat	K	1,12	2,67	0,29	4,91	4,61
H	30	28	Vefat	E	0,06	2,34	0,08	0,74	10,73
H	31	72	Sağ	K	0,43	2,28	0,04	1,40	1,49

H	32	70	Vefat	E	0,03	5,06	0,03	0,59	0,48
H	33	65	Vefat	K	0,48	2,46	0,02	0,51	1,24
H	34	55	Vefat	E	0,76	1,92	0,11	1,05	1,14
H	35	65	Vefat	K	0,24	2,81	0,03	1,30	0,49
H	36	76	Vefat	E	0,02	1,94	0,01	0,59	0,11
H	37	38	Vefat	K	0,16	2,81	0,03	1,44	0,26
H	38	61	Sağ	K	0,38	1,60	0,01	0,69	0,22
H	39	51	Sağ	E	0,29	6,67	0,20	2,37	2,21
H	40	86	Vefat	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	41	74	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	42	58	Sağ	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	44	54	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	45	69	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	46	64	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	47	76	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	48	67	Sağ	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	49	85	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	50	69	Sağ	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	51	65	Sağ	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	52	55	Vefat	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	53	59	Vefat	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	54	52	Vefat	K	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61
H	55	80	Vefat	E	0,81	2,67	0,18	2,56	2,61

Beta-actin referans genine göre; bireylerin *KRAS* geni için ortalaması $0,81 \pm 0,60$ olup medyan değeri 0,81; *HK2* geni için ortalaması $2,53 \pm 1,36$ olup medyan değeri 2,67; *BCL2* geni için ortalaması $0,18 \pm 0,24$ olup medyan değeri 0,18; *PTEN* geni için ortalaması $2,56 \pm 2,18$ olup medyan değeri 2,56; *DNMT3A* geni için ortalaması $2,61 \pm 2,62$ olup medyan değeri 2,61 idi (Tablo 4-8)

Tablo 4-8: *Beta-actin* referans genine göre *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN* ve *DNMT3A* için ortalama ve medyan değerleri

	Ort.	SS	Medyan	Min.	Maks.
<i>KRAS</i>	0.81	0.60	0.81	0.02	4.07
<i>HK2</i>	2.53	1.36	2.67	0.08	7.01
<i>BCL2</i>	0.18	0.24	0.18	0.01	2.00
<i>PTEN</i>	2.56	2.18	2.56	0.19	14.17
<i>DNMT3A</i>	2.61	2.62	2.61	0.11	19.89

4.6. Kontrol ve Hastaların miRNA Sonuçları

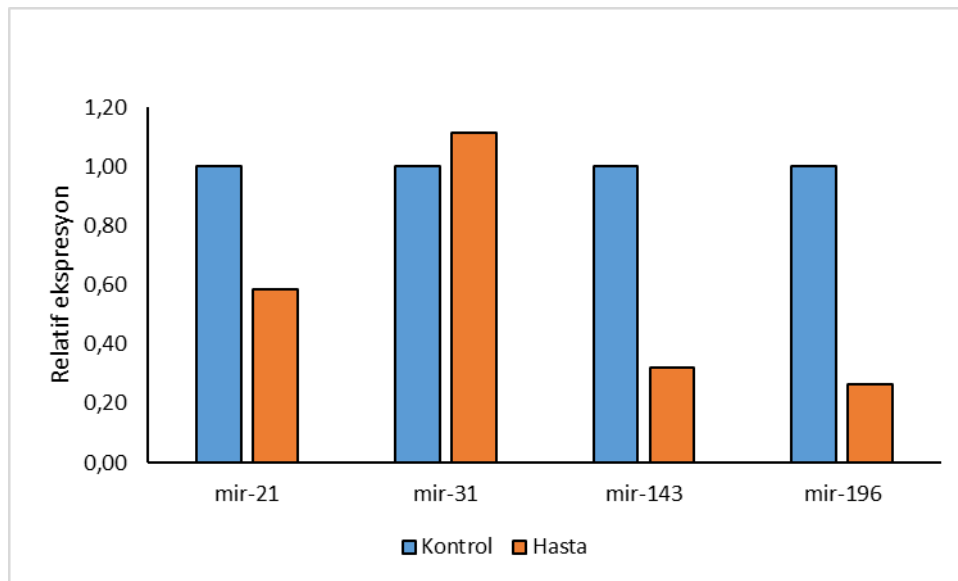
Hastalarda miR-21 geni için ortalama $1,12 \pm 1,64$ olup medyan değeri 0,35'di. MiR-31 geni için ortalama $0,55 \pm 0,88$ olup medyan değeri 0,19'du. MiR-143 için ortalama $0,59 \pm 0,95$ olup medyan değeri 0,14 'dü. MiR-196a için ortalama $0,08 \pm 0,16$ olup medyan değeri 0,02 idi.

Hastaların miR-21, miR-143 ve miR-196a medyan değerinin kontrol grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu elde edildi ($p < 0.05$). MiR-31 medyan değerinin hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği görüldü ($p > 0.05$) (Tablo 4-9; Şekil 4-1).

Tablo 4-9: Kontrol ve hasta grubunda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a ekspresyon seviyelerinin ortalama ve medyan değerleri

		Ort.	SS	Medyan	p
miR-21	Kontrol	1.91	1.70	1.05	0.029*
	Hasta	1.12	1.64	0.35	
miR-31	Kontrol	0.49	0.52	0.44	0.088
	Hasta	0.55	0.88	0.19	
miR-143	Kontrol	1.85	1.59	1.33	<0.001*
	Hasta	0.59	0.95	0.14	
miR-196a	Kontrol	0.32	0.27	0.17	<0.001*
	Hasta	0.08	0.16	0.02	

Medyan test



Şekil 4-1: Kontrole kıyasla kontrol ve hasta grubunda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a relatif ekspresyon seviyelerinin ortalama değerleri

4.7. GAPDH Referans Gene Göre Kontrol ve Hastaların Gen Ekspresyonu Sonuçları

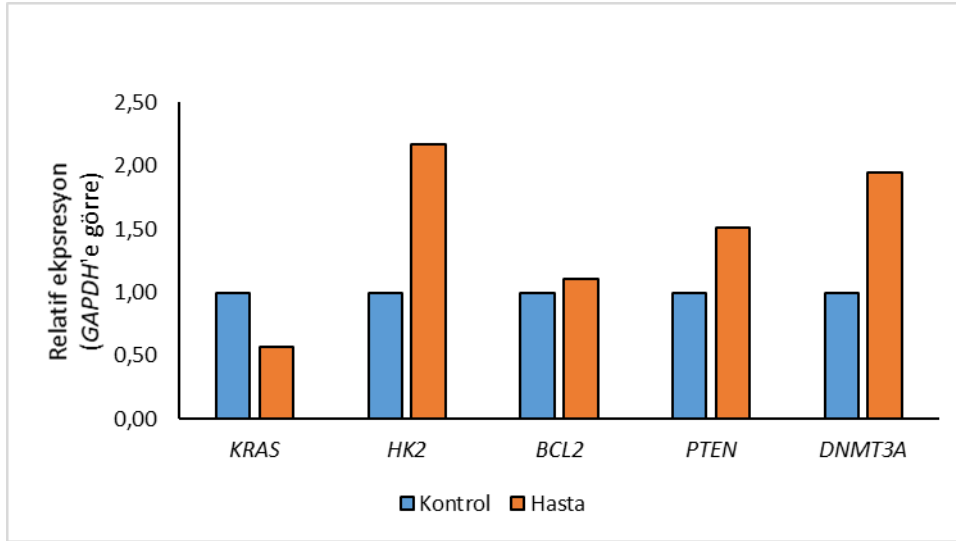
Hastalarda *GAPDH* referans gen olarak alındığında *KRAS* geni için ortalaması $0,84 \pm 0,50$ olup medyan değeri 0,98'di. *HK2* geni için ortalaması $8,46 \pm 8,23$ olup medyan değeri 7,48'di. *BCL2* geni için ortalaması $0,18 \pm 0,17$ olup medyan değeri 0,18 idi. *PTEN* geni için ortalaması $3,45 \pm 2,70$ olup medyan değeri 3,20 idi. *DNMT3A* geni için ortalaması $8,09 \pm 20,94$ olup medyan değeri 7,24 idi.

Hastaların medyan *KRAS* değerinin, kontrol grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu elde edildi (%43,24, $p=0,004$). Hasta grubundakilerin ortalama *HK2* ve *PTEN* değerinin, kontrol grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış (2,17-kat, $p=0,005$; 1,51-kat, $p=0,040$, sırasıyla) olduğu görüldü. Ortalama ve medyan *BCL2*, *DNMT3A* gen değerlerinin hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı ($p>0.05$) (Tablo 4-10; Şekil 4-2).

Tablo 4-10: Kontrol ve hasta grubunda *GAPDH* referans genine göre *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN* ve *DNMT3A* ekspresyon seviyelerinin ortalama ve medyan değerleri

		Ort.	SS	Medyan	p
<i>KRAS</i>	Kontrol	1.48	1.80	0.98	0.004^a
	Hasta	0.84	0.50	0.98	
<i>HK2</i>	Kontrol	3.89	3.28	2.29	0.005^b
	Hasta	8.46	8.23	7.48	
<i>BCL2</i>	Kontrol	0.17	0.10	0.18	0,668 ^b
	Hasta	0.18	0.17	0.18	
<i>PTEN</i>	Kontrol	2.29	1.57	2.98	0,040^b
	Hasta	3.45	2.70	3.20	
<i>DNMT3A</i>	Kontrol	4.15	3.26	4.94	0,485 ^a
	Hasta	8.09	20.94	7.24	

a: Medyan test, b: Mann Whitney-U testi



Şekil 4-2: Kontrole kıyasla kontrol ve hasta *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN* ve *DNMT3A* relatif ekspresyon seviyelerinin (*GAPDH*'e göre) ortalama değerleri

4.8. *Beta-actin* Referans Gene Göre Kontrol ve Hastaların Gen Ekspresyonu Sonuçları

Hastalarda *Beta-actin* referans gen olarak alındığında *KRAS* geni için ortalaması $0,72 \pm 0,44$ olup medyan değeri 0,81'di. *HK2* geni için ortalaması $2,91 \pm 1,27$ olup medyan değeri 2,67'yd. *BCL2* geni için ortalaması $0,19 \pm 0,27$ olup medyan değeri 0,18 idi. *PTEN* geni için ortalaması $2,71 \pm 2,36$ olup medyan değeri 2,56 idi. *DNMT3A* geni için ortalaması $2,74 \pm 2,87$ olup medyan değeri 2,61 idi.

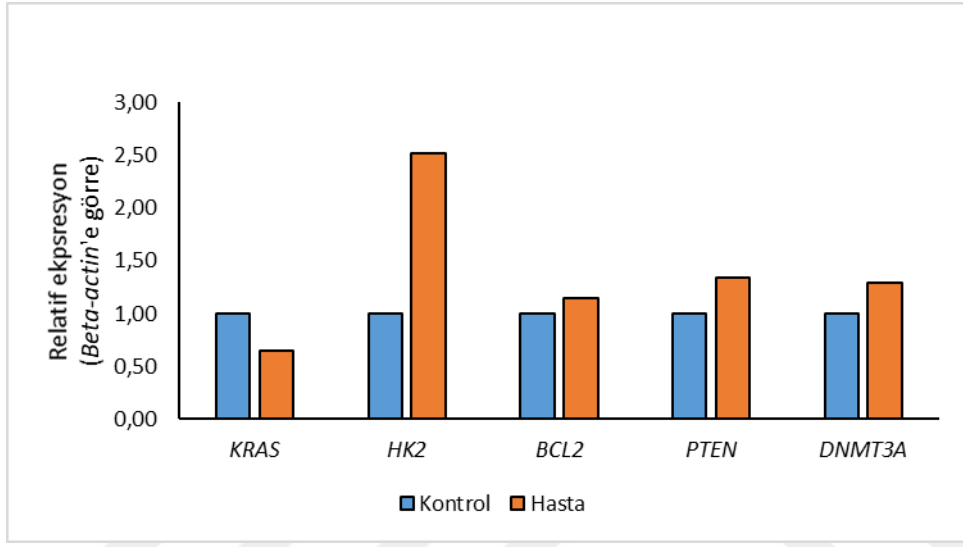
Ortalama ve medyan *KRAS*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* gen değerlerinin hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edildi ($p > 0,05$). Hasta kişilerin ortalama *HK2* değerinin, kontrol grubundaki kişilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış (2,53-kat, $p = 0,001$) olduğu bulundu (Tablo 4-11; Şekil 4-3).

Tablo 4-11: Kontrol ve hasta grubunda *Beta-actin* referans genine göre *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN* ve *DNMT3A* ekspresyon seviyelerinin ortalama ve medyan değerleri

		Ort.	SS	Medyan	p
<i>KRAS</i>	Kontrol	1.12	0.95	0.81	0,103 ^a
	Hasta	0.72	0.44	0.81	
<i>HK2</i>	Kontrol	1.15	0.48	1.15	0,001 ^{*b}

	Hasta	2.91	1.27	2.67	
BCL2	Kontrol	0.16	0.09	0.18	0,208 ^a
	Hasta	0.19	0.27	0.18	
PTEN	Kontrol	2.01	1.22	2.56	0,406 ^b
	Hasta	2.71	2.36	2.56	
DNMT3A	Kontrol	2.13	1.39	2.61	0,994 ^a
	Hasta	2.74	2.87	2.61	

a: Medyan test, b: Mann Whitney-U testi



Şekil 4-3: Kontrole kıyasla kontrol ve hasta *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN* ve *DNMT3A* relatif ekspresyon seviyelerinin (*beta-actin*'e göre) ortalama değerleri

4.9. Demografik Koşullarına Göre Kontrol ve Hasta Gruplarının Karşılaştırılması

Ölen hastaların tamamının hasta grubundan olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Kişilerin cinsiyeti ile hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmediği saptandı ($p > 0.05$) (Tablo 4-12).

Tablo 4-12: Yaş, mortalite ve cinsiyete göre kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılması

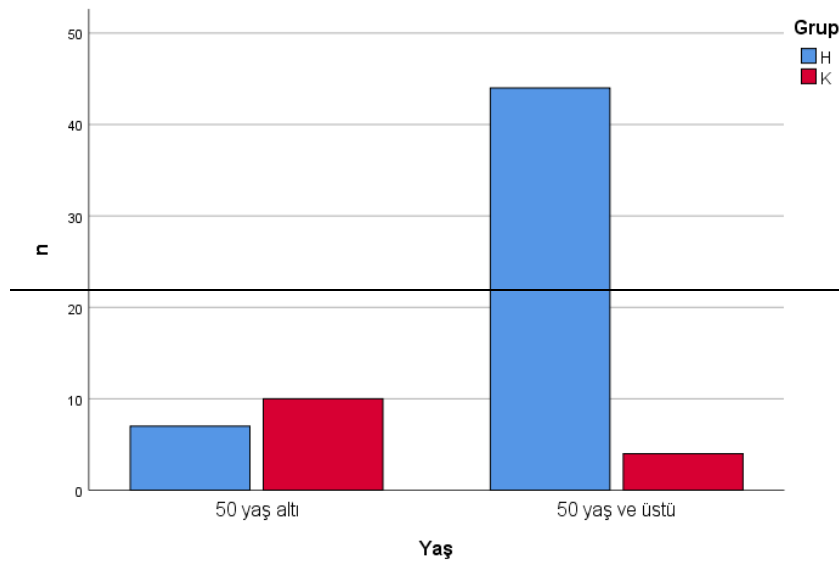
	Grup		
	Kontrol	Hasta	
Yaş	n(%)		p
50 yaş altı	10(71.4)	7(13.7)	<0.001*
50 yaş ve üstü	4(28.6)	44(86.3)	
Mortalite			
Sağ	14(100.0)	16(31.4)	<0.001*

EX	0(0.0)	35(68.56)	
Cinsiyet			
Erkek	4(28.6)	26(51.0)	0.226
Kadın	10(71.4)	25(49.0)	

Ki kare testi

4.9.1. Yaşa göre Kontrol ve Hasta Gruplarının Karşılaştırılması

Hasta grubundakilerin %86.3'ünün 50 yaş ve üstü olduğu görüldü. Kişilerin yaşları artış gösterdiğinde hasta olma ihtimalinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fazla olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: Yaşa göre kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılması

Hastalarda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a medyan değerlerinin, yaş gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği elde edildi ($p > 0.05$) (Tablo 4-13).

Tablo 4-13: Hastalarda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a medyan değerlerinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Hastalarda n=51	Yaş	Ort.	SS	Medyan	p
miR-21	50 yaş altı	1.35	2.11	0.18	0,955
	50 yaş ve üstü	1.08	1.58	0.36	
miR-143	50 yaş altı	1.06	1.46	0.10	0,955
	50 yaş ve üstü	0.52	0.85	0.15	
miR-31	50 yaş altı	0.80	1.23	0.10	0,955
	50 yaş ve üstü	0.51	0.83	0.20	
miR-196a	50 yaş altı	0.05	0.06	0.03	0,693

	50 yaş ve üstü	0.09	0.17	0.02	
--	----------------	------	------	------	--

Medyan test

GAPDH referans gen olarak alındığında hastaların ortalama ve medyan *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* gen değerlerinin yaş grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı ($p>0.05$) (Tablo 4-14).

Tablo 4-14: Hasta grubunda *GAPDH* referans genine göre *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN* ve *DNMT3A* gen değerlerinin yaş grubuna göre karşılaştırılması

Hastalarda n=51	Yaş	Ort.	SS	Medyan	p
<i>KRAS</i>	50 yaş altı	1.08	1.15	0.89	0,636 ^a
	50 yaş ve üstü	0.80	0.30	0.98	
<i>HK2</i>	50 yaş altı	10.70	10.17	7.48	0,620 ^b
	50 yaş ve üstü	8.11	7.97	7.48	
<i>BCL2</i>	50 yaş altı	0.28	0.39	0.18	0,393 ^a
	50 yaş ve üstü	0.17	0.09	0.18	
<i>PTEN</i>	50 yaş altı	6.00	5.94	3.20	0,299 ^b
	50 yaş ve üstü	3.04	1.52	3.20	
<i>DNMT3A</i>	50 yaş altı	24.98	56.70	2.99	0,287 ^a
	50 yaş ve üstü	5.40	2.70	7.24	

a: Medyan test, b: Mann Whitney-U testi

Beta-actin referans gen olarak alındığında hastalarda ortalama ve medyan *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* gen değerlerinin yaş grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği elde edildi ($p>0.05$) (Tablo 4-15).

Tablo 4-15: Hasta grubunda *Beta-actin* referans genine göre *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN* ve *DNMT3A* gen değerlerinin yaş grubuna göre karşılaştırılması

Hastalarda n=51	Yaş	Ort.	SS	Medyan	p
<i>KRAS</i>	50 yaş altı	0.89	0.97	0.81	0,150 ^a
	50 yaş ve üstü	0.70	0.30	0.81	
<i>HK2</i>	50 yaş altı	3.53	1.70	2.67	0,325 ^b
	50 yaş ve üstü	2.81	1.18	2.67	
<i>BCL2</i>	50 yaş altı	0.14	0.09	0.15	0,879 ^a
	50 yaş ve üstü	0.19	0.28	0.18	
<i>PTEN</i>	50 yaş altı	4.13	4.61	2.56	0,265 ^a
	50 yaş ve üstü	2.48	1.77	2.56	

DNMT3A	50 yaş altı	3.51	3.45	2.61	0,265 ^a
	50 yaş ve üstü	2.62	2.79	2.61	

a: Medyan testi, b: Mann Whitney-U testi

4.9.2. Cinsiyete göre Hasta Grubunun Karşılaştırılması

Hastalarda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a medyan değerlerinin, cinsiyete göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edildi ($p>0.05$) (Tablo 4-16).

Tablo 4-16: Hastalarda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a medyan değerlerinin cinsiyete göre karşılaştırılması

Hastalarda n=51	Cinsiyet	Ort.	SS	Medyan	p
miR-21	Erkek	1.23	1.91	0.24	0.713
	Kadın	1.00	1.33	0.39	
miR-143	Erkek	0.62	1.03	0.12	0.777
	Kadın	0.56	0.89	0.17	
miR-31	Erkek	0.46	0.72	0.19	0.624
	Kadın	0.64	1.03	0.19	
miR-196a	Erkek	0.11	0.21	0.03	0.189
	Kadın	0.05	0.07	0.02	

Medyan testi

GAPDH referans gen olarak alındığında hastaların ortalama ve medyan *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* gen değerlerinin cinsiyete göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı ($p>0.05$) (Tablo 4-17).

Tablo 4-17: Hasta grubunda *GAPDH* referans genine göre *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN* ve *DNMT3A* gen değerlerinin cinsiyete göre karşılaştırılması

Hastalarda n=51	Cinsiyet	Ort.	SS	Medyan	p
KRAS	Erkek	0.78	0.34	0.98	0.839 ^b
	Kadın	0.90	0.62	0.98	
HK2	Erkek	10.45	11.01	7.48	0.955 ^a
	Kadın	6.40	2.50	7.48	
BCL2	Erkek	0.22	0.22	0.18	0.095 ^b
	Kadın	0.14	0.06	0.18	

PTEN	Erkek	3.66	2.20	3.20	0.171 ^b
	Kadın	3.22	3.17	3.20	
DNMT3A	Erkek	11.36	29.07	7.24	0.984 ^a
	Kadın	4.68	2.99	7.24	

a: Medyan test, b: Mann Whitney-U testi

Beta-actin referans gen olarak alındığında hastalarda ortalama ve medyan *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* gen değerlerinin cinsiyete göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği elde edildi ($p>0.05$) (Tablo 4-18).

Tablo 4-18: Hasta grubunda *Beta-actin* referans genine göre *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN* ve *DNMT3A* gen değerlerinin cinsiyete göre karşılaştırılması

Hastalarda n=51	Cinsiyet	Ort.	SS	Medyan	p
KRAS	Erkek	0.63	0.30	0.81	0.109 ^b
	Kadın	0.82	0.53	0.81	
HK2	Erkek	2.87	1.17	2.67	0.837
	Kadın	2.94	1.39	2.67	
BCL2	Erkek	0.23	0.37	0.18	0.972 ^a
	Kadın	0.15	0.07	0.18	
PTEN	Erkek	2.72	2.20	2.56	0.949 ^b
	Kadın	2.69	2.57	2.56	
DNMT3A	Erkek	3.25	3.86	2.61	0.963 ^a
	Kadın	2.21	1.02	2.61	

a: Medyan test, b: Mann Whitney-U testi

4.9.3. Mortalite göre Hasta Grubunun Karşılaştırılması

Hastalarda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a medyan değerlerinin, mortalite durumuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edildi ($p>0.05$) (Tablo 4-19).

Tablo 4-19: Hastalarda miR-21, miR-31, miR-143 ve miR-196a medyan değerlerinin, mortaliteye göre karşılaştırılması

Hastalarda n=51	Mortalite	Ort.	SS	Medyan	p
miR-21	Sağ	0.59	0.85	0.26	0.836
	Vefat	1.36	1.85	0.39	
miR-143	Sağ	0.28	0.34	0.13	0.417
	Vefat	0.74	1.10	0.19	

miR-31	Sağ	0.45	0.94	0.19	0.836
	Vefat	0.59	0.87	0.19	
miR-196a	Sağ	0.06	0.08	0.02	0.807
	Vefat	0.10	0.19	0.02	

Medyan testi

Beta-actin referans gen olarak alındığında hastalarda ortalama ve medyan *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* gen değerlerinin mortalite durumuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği elde edildi ($p>0.05$) (Tablo 4-20).

Tablo 4-20: Hasta grubunda *Beta-actin* referans genine göre *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN* ve *DNMT3A* gen değerlerinin mortaliteye göre karşılaştırılması

Hastalarda n=51	Mortalite	Ort.	SS	Medyan	p
KRAS	Sağ	0.67	0.23	0.81	0.704 ^b
	Vefat	0.75	0.51	0.81	
HK2	Sağ	2.80	1.38	2.67	0.343 ^b
	Vefat	2.95	1.24	2.67	
BCL2	Sağ	0.15	0.06	0.18	0.572 ^a
	Vefat	0.20	0.32	0.18	
PTEN	Sağ	2.79	2.18	2.56	0.712 ^b
	Vefat	2.67	2.47	2.56	
DNMT3A	Sağ	2.33	0.73	2.61	0.800 ^b
	Vefat	2.93	3.43	2.61	

a: Medyan test, b: Mann Whitney-U testi

GAPDH referans gen olarak alındığında hastaların ortalama ve medyan *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* gen değerlerinin mortalite durumuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı ($p>0.05$) (Tablo 4-21).

Tablo 4-21: Hasta grubunda *GAPDH* referans genine göre *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN* ve *DNMT3A* gen değerlerinin mortaliteye göre karşılaştırılması

Hastalarda n=51	Mortalite	Ort.	SS	Medyan	p
KRAS	Sağ	0.80	0.34	0.98	0.564 ^b
	Vefat	0.86	0.56	0.98	
HK2	Sağ	6.82	2.98	7.48	0.542 ^a
	Vefat	9.21	9.69	7.48	
BCL2	Sağ	0.15	0.06	0.18	0.653 ^b
	Vefat	0.20	0.19	0.18	

PTEN	Sağ	2.90	0.81	3.20	0.519 ^b
	Vefat	3.70	3.20	3.20	
DNMT3A	Sağ	5.49	2.77	7.24	0.685 ^a
	Vefat	9.27	25.23	7.24	

a: Medyan test, b: Mann Whitney-U testi

4.10. MiRNA ve Gen Ekspresyonları Arasında Korelasyon Varlığı

Hasta grubunda miR-21, miR-31, miR-143, miR-196a ve *GAPDH* referans gen olarak alınan *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* genleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlanmadı ($p>0.05$) (Tablo 4-22).

Tablo 4-22: Hasta grubunda miR-21, miR-31, miR-143, miR-196a ve *GAPDH* referans gen olarak alınan *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* genleri arasında korelasyon varlığı

Hastalarda		mir21	mir143	mir31	mir196
<i>KRAS</i>	r	-0.188	-0.243	-0.030	-0.052
	p	0.186	0.086	0.833	0.717
<i>HK2</i>	r	-0.050	-0.047	-0.023	0.056
	p	0.728	0.743	0.871	0.698
<i>BCL2</i>	r	-0.203	-0.253	-0.209	-0.150
	p	0.153	0.073	0.142	0.294
<i>PTEN</i>	r	-0.124	-0.064	-0.082	0.082
	p	0.385	0.654	0.567	0.567
<i>DNMT3A</i>	r	-0.171	-0.273	-0.076	0.128
	p	0.230	0.052	0.595	0.370

Spearman's rho testi

Tablo 4-23'de görüldüğü üzere hasta grubunda miR-21 ve *beta-actin* referans alınan *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* genleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon görülmedi ($p>0.05$).

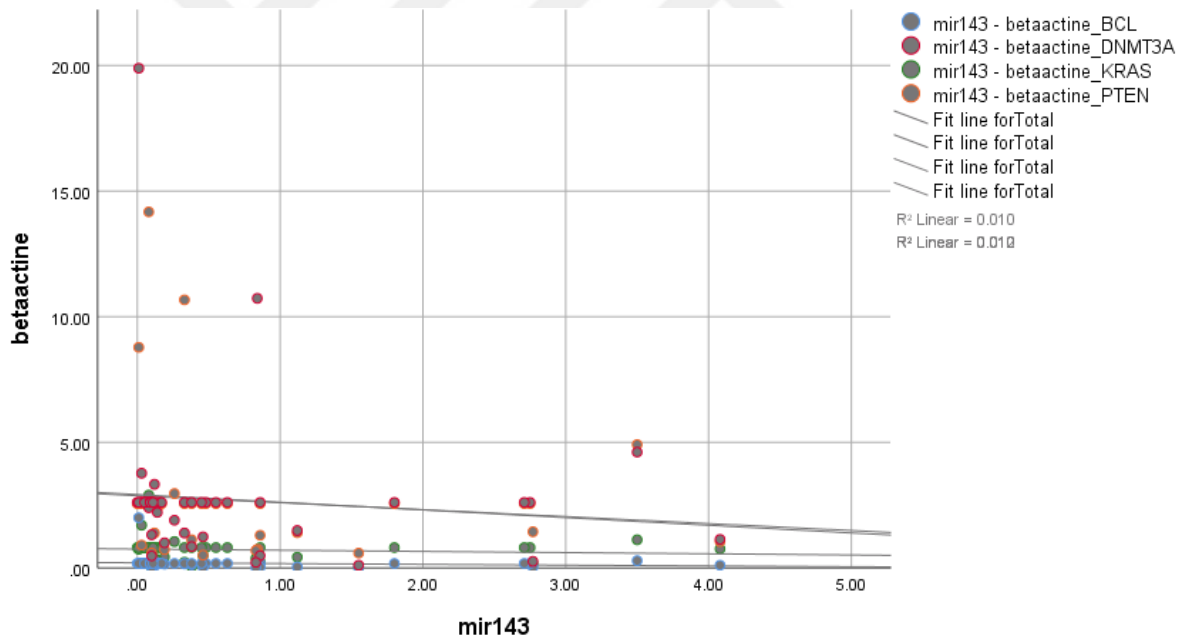
Tablo 4-23: Hasta grubunda miR-21, miR-31, miR-143, miR-196a ve *Beta-actin* referans gen olarak alınan *KRAS*, *HK2*, *BCL2*, *PTEN*, *DNMT3A* genleri arasında korelasyon varlığı

Hastalarda		mir21	mir143	mir31	mir196
<i>KRAS</i>	r	-0.115	-0.308*	-0.148	-0.015
	p	0.422	0.028	0.300	0.914

<i>HK2</i>	r	-0.145	-0.193	-0.276*	-0.344*
	p	0.310	0.174	0.050	0.013
<i>BCL2</i>	r	-0.154	-0.0355*	-0.127	-0.007
	p	0.282	0.011	0.375	0.959
<i>PTEN</i>	r	-0.195	-0.284*	-0.202	0.040
	p	0.169	0.043	0.154	0.782
<i>DNMT3A</i>	r	-0.236	-0.331*	-0.153	0.032
	p	0.095	0.018	0.285	0.822

Spearman's rho testi

Hasta grubunda miR-143 ile *beta-actin* referans alınan *KRAS*, *BCL2* ve *DNMT3A* arasında negatif orta derecede¹ istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu elde edildi (Tablo 4-23; Şekil 4-5). Hasta grubunda miR-143 ile *beta-actin* referans alınan *PTEN* arasında negatif düşük derecede² istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi (Tablo 4-23; Şekil 4-5).

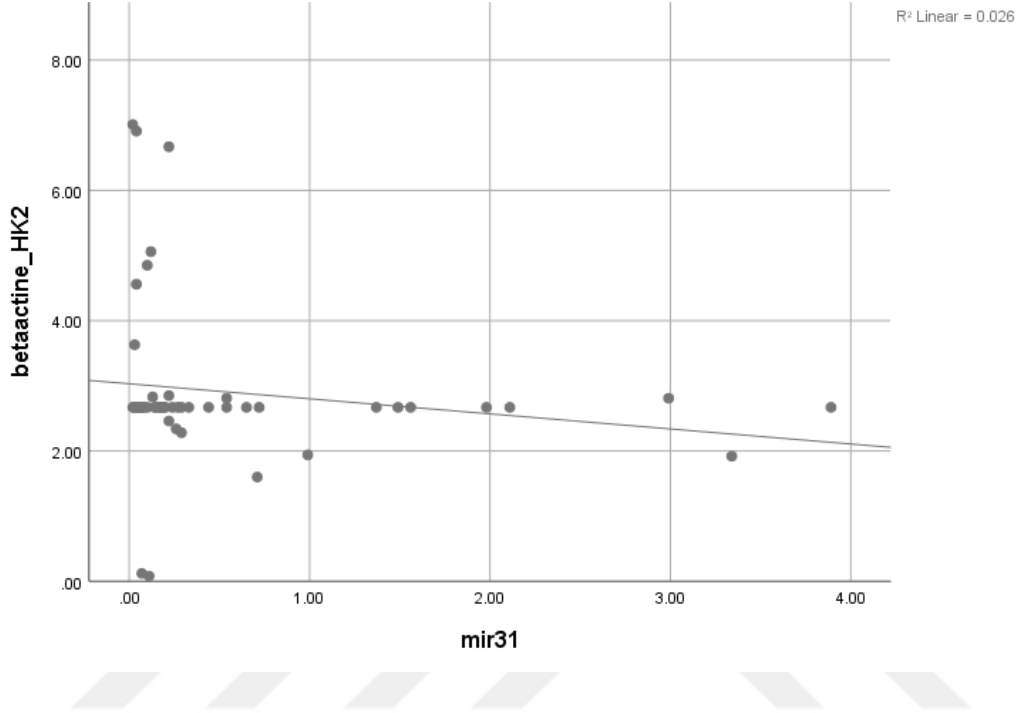


Şekil 4-5: MiR-143 ve *Beta-actin* referans genine göre genlerin ekspresyonları arasında korelasyon

¹ negatif orta derecede korelasyon: $r=(-0,49) - (-0,30)$

² negatif düşük derecede korelasyon: $r=(-0,29) - (-0,10)$

Hasta grubunda miR-31 ile *beta-actin* referans olarak alınan *HK2* arasında negatif düşük derecede³ istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu gözlemlendi (Tablo 4-23; Şekil 4-6).



Şekil 4-6: MiR-31 ve *beta-actin* referans referans genine göre *HK-2* ekspresyonları arasında korelasyon

Hasta grubunda miR-196a ile *beta-actin* referans olarak alınan *HK2* arasında negatif orta derecede⁴ istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görüldü (Tablo 4-23, Şekil 4-7).

³ negatif düşük derecede korelasyon: $r=(-0,29) - (-0,10)$

⁴ negatif orta derecede korelasyon: $r=(-0,49) - (-0,30)$

5. TARTIŞMA

CRC, önemli bir sağlık sorunu olarak öne çıkmakta, dünya çapında en sık görülen üçüncü ve kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır (WHO, 2024). 5 yıllık sağkalım oranı evre II'de (lokalize evre) %91'den, evre III'de (bölgesel evre) %73'e ve uzak metastaz gösteren CRC'li hastalarda %14'e düşmektedir (Siegel ve ark., 2023). Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN), CRC hastalarının taraması için kılavuzlar sağlamaktadır. CRC hastalarının taraması için NCCN kılavuzları ortalama riskli bireyler için taramanın 50 yaşında başlamasını önermektedir (Provenzale ve ark., 2020). Mevcut CRC tarama yöntemleri invaziv ve non-invaziv testler olarak ikiye ayrılmaktadır. Günümüzde endoskopik yöntemlerin yanı sıra dışkı ve kan bazlı non-invaziv testler de taramada kullanılmaktadır (Jayasinghe ve ark., 2023). Ancak ideal tarama yöntemi non-invaziv, duyarlılığı, etkinliği ve özgüllüğü yüksek, kolay ulaşılabilir, güvenli, kullanışlı ve ucuz olmalıdır (Carroll ve ark., 2014; Jayasinghe ve ark., 2023). CRC hastalarının yaklaşık %50'sinde karaciğer metastazı gelişir (Tauriello ve ark., 2017). Ancak kemoterapi alan uzak metastazı olan CRC hastalarında tedaviye direnç görülebilmektedir (Zhou ve ark., 2022). Bu sebeple metastatik potansiyelin erken teşhisi veya saptanması, daha erken müdahale şansını ve muhtemelen daha iyi prognozu sağlar (Casadaban ve ark., 2016). Metastatik CRC mortalite oranı yüksek olan bir kanser türüdür. Metastatik CRC prognozunu ön görmek ve tedavi şansını arttırabilmesi sebebiyle miRNA ve miRNA'ların hedef genleri üzerinde çalışmalar son dönemde hızlanmıştır. Tez çalışmasında CRC'nin erken tanı ve prognozuna yarar sağlayabilecek, kullanımı kolay, maliyeti düşük ve hasta uyumunu kolaylaştıran biyobelirteçlerin geliştirilmesinde miRNA'ların rolü araştırılmıştır. En çok çalışılan miRNA'lardan olan miR-21 seviyelerinin CRC'li hastalardan alınan serum, dışkı ve doku örneklerinde anlamlı bir artış gösterdiği görülmüştür (Lu ve ark., 2008; Shibuya ve ark., 2011; Horiuchi ve ark., 2012; Kanaan ve ark., 2012; Wu ve ark., 2012).

Yapılan araştırmalarda CRC'de miR-21 tarafından tümör ilerlemesini, anjiyogenezi ve invazyonunu baskılayan genlerin transkripsiyonunun inhibisyonu gözlenmiştir. Bu sonuçlar miR-21'in CRC'de hücre invazyonu, proliferasyonu ve apoptozunda onkogen olarak görev aldığına ilişkin raporları desteklemektedir (Lu ve ark., 2008; Slaby ve ark., 2008; Han ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2012). 84 CRC

dokusunda (Schetter ve ark., 2008); 29 CRC dokusunda (Slaby ve ark.,2008); 156 CRC dokusunda (Shibuya ve ark., 2011) ve 7 karaciğer metastazlı ve 45 metastaz bulunmayan CRC dokusunda (Xu ve ark., 2012) yapılan çalışmalarda miR-21 ve miR-31 ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak yüksek bulunmuş olup, miR-21 ve miR-31 ekspresyon seviyelerinin evre III ve IV'de evre I ve II'ye göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların CRC'de hücre proliferasyonu, invazyon, migrasyon, ileri TNM evresi ve metastazla ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Schetter ve ark., 2008; Slaby ve ark., 2008; Wang ve ark., 2009; Shibuya ve ark., 2011; Kanaan ve ark., 2012; Xu ve ark., 2012; Yang ve ark., 2016).

Plazma miRNA'larının, CRC için güvenilir ve noninvaziv belirteçler sağlayacağı öngörülerek 30 CRC'li doku ve 30 CRC plazma örneğinde yapılan çalışmada; miR-21 ve miR-31'in hem doku hem de plazmada ekspresyon seviyelerinde anormal artış saptanmış olup, plazmada miR-21'in CRC hastalarını %90 özgüllük ve duyarlılıkla kontrollerden ayırdığı gözlenmiştir (Kanaan ve ark.,2012). CRC'li 40 hastadan alınan serum ve dışkı örneklerinde yapılan çalışmada; CRC'li hastaların serum ve dışkılarındaki miR-21 ekspresyon seviyelerinin sırasıyla 12,1 ve 10 kat artış göstermiştir (Bastaminejad ve ark., 2017). Serum miR-21'in sırasıyla %86,05 ve %72,97 duyarlılık ve özgüllükle CRC tanısı için umut verici bir biyobelirteç olarak değerlendirilirken, serum miR-21'in %88,10 duyarlılık ve %73,68 özgüllükle TNM evre III ve IV'ü evre I ve II'den güvenilir bir şekilde ayırt edebildiği gözlenmiştir (). Son yıllarda yapılmış 41 CRC'li hastanın doku ve plazmasında miR-21 ekspresyon seviyelerinin incelendiği çalışmada; CRC dokularında miR-21 ekspresyonu ($r=0.33$, $p=0.049$) zayıf pozitif korelasyon göstermiştir (Fellizar ve ark., 2023). CRC dokularındaki miR-21 relatif ekspresyonlarında erken evre ile ileri evre arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, plazmada miR-21 relatif ekspresyonları erken evrede ($p = 0.006$) ileri evreye kıyasla önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Fellizar ve ark., 2023). 113 CRC hastasının plazmasındaki (Hao ve ark., 2022) miR-21, geç evrede ($p = 0.1425$) medyan ekspresyonları ile erken evrelerdekilere göre daha düşük bulunmuştur. Evre IV ve yüksek düzeyde plazma miR-21 içeren evre I ve III'deki CRC hastalarının önemli ölçüde daha kötü sağkalım sonuçları gösterdiği tespit edilmiştir. Böylelikle, dolaşımdaki miR-21'in CRC hastalarında erken nüksü öngörebilmek için önemli bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasında hastaların miR-21 medyan değerinin kontrol grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu elde

edilmiştir (%41,36 azalma, $p=0.029$). Hao ve ark., (2022) çalışmasında da belirtildiği gibi tez çalışmasındaki CRC hastalarının ileri evre olabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasında miR-21 sonuçları bakımından anlamlılık görülmemiştir.

20 CRC doku ve plazma örneklerinde genom çapında miRNA ve mRNA ekspresyon analizi yapılan çalışmada; normal dokuya kıyasla en yüksek miRNA ekspresyon değişikliğinin CRC'li dokuda yüksek ekspresyon gösteren miR-31'de (8 kat, $p<0.001$) görülmüş olup, bu durum plazma örneklerinde de miR-31 ekspresyon artışının yüksek olması ile desteklenmiştir (Nagy ve ark., 2017). CRC metastazı için tanısal bir biyobelirteç olarak miRNA'ların kullanılabileceğini öngören çalışmada; 28 lenf nodu metastazına sahip evre III ve IV ve 28 metastaz bulunmayan evre I ve II CRC'li hastadan alınan plazma örneklerinde miR-31 metastazdan bağımsız olarak tüm CRC hastalarında anlamlı derecede yüksek bulunurken, miR-31'in metastatik CRC hastalarını, metastaz bulunmayan CRC hastalarından ayırt etmek için kullanılabileceğini ortaya koymuştur ($p < 0.001$) (Zhangve ark., 2019). 74 evre II ve IV CRC'li plazma ve doku örneğinde miR-21 ve miR31'in ekspresyon seviyeleri plazmada ($p<0.05$) ve dokuda ($p<0.001$) anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Eslamizadeh ve ark., 2018). 144 CRC hastasından alınan plazma örneklerinde yaş, cinsiyet, tümör evresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamakla birlikte yüksek miR-31 ekspresyon seviyeleri nüks riskinde artış ($p=0.001$) ile ilişkilendirilmiştir (Yuan ve ark., 2017). Tez çalışmasında ise ilginç olarak hastaların miR-31 medyan değerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır ($p>0.05$).

Qian ve ark. (2013) tarafından CRC'li hastaların plazma örneklerinde yapılan çalışmada miR-143 ekspresyon seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde azaldığı gözlenmiş ve evre III ve evre IV'de evre I ve evre II'ye göre daha düşük miR-143 ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. MiR-143'ün azalan ekspresyonunu artan klinik evre ve metastaz ile ilişkilendiren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Chang ve ark., 2011; Qian ve ark., 2013). 31 metastatik CRC'li hastanın plazma örneğinde miR-143'ün kemosensitivite ve sağkalım üzerine prediktif değerinin araştırıldığı çalışmada; miR-143 ile birinci basamak kemoterapi alımı sırasında ilerlemesiz sağkalım arasında anlamlı bir ilişki görülmemiş (başlangıç $p=0.06$, kemoterapi sonrası $p=0.699$) olup, başlangıçtaki miR-143 ($p = 0.009$) ekspresyon seviyelerinin kötü genel sağkalımla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Gherman ve ark., 2023). Tez çalışmasında hastaların

miR-143 medyan değerinin kontrol grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu elde edildi (%68,10 azalma; $p < 0.001$).

CRC’de proliferasyon, invazyon, metastaz ve apoptoz gibi süreçlerde onkogen olarak yer aldığı bilinen miR-196a’nın ekspresyon seviyeleri CRC’li hastalarda anlamlı bir şekilde yüksek olarak bulunmuştur (Liu ve ark., 2013; Ge ve ark., 2014; Chen ve ark., 2016). CRC’li hastaların serum, plazma ve doku örneklerinde miR-196a ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiş olup, miR-196a’nın yüksek ekspresyonu lenf nodu metastazı ve CRC’de ileri TNM evresi ile pozitif olarak ilişkili bulunmuştur (Ge ve ark., 2014; Mehrjoei ve ark., 2024). 55 CRC dokusu ve 55 CRC’li plazma örneğinde yapılan çalışmada; CRC’li doku örneklerinde miR-196a ekspresyon düzeylerinin normal dokulara kıyasla 11.426 kat önemli ölçüde arttığı ($p < 0.001$), CRC hastalarının plazma örneklerinde ise 11.655 kat arttığı ($p < 0.0001$) gözlenmiştir (Mehrjoei ve ark., 2024). Tez çalışmasında miR-196a medyan değerinin kontrol grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu elde edildi (%75 azalma, $p < 0.001$).

Araştırmalara göre; *PTEN*, CRC ile ilişkili önemli bir miR-21 hedef genidir (Xiong ve ark., 2013; Yazdani ve ark., 2016). Yu ve ark. (2012) CRC hücrelerinde miR-21 ekspresyon seviyesinin artarken *PTEN* hedef geninin ekspresyonunun azaldığını tespit ederek miR-21’in onkojenik bir rolü olduğuna ve miR-21’in hedef geni olan *PTEN*’in ekspresyonunu baskılayarak apoptozu inhibe ettiğine dikkat çekmiştir. Yapılan çalışmalarda CRC’de anormal ekspresyon gösteren miR-21’in hedef geni *PTEN* arasında negatif bir korelasyon gözlenmiştir. Bu çalışmalarda CRC’de anormal artış gösteren miR-21 ekspresyonu lenf nodu metastazı, uzak metastaz gelişimi ve ileri TNM evresi ile ilişkilendirmiştir (Slaby ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2012; Xiong ve ark., 2013). 30 CRC dokusunda yapılan çalışmada miR-21’in ekspresyonunun adenomlar ile normal dokularla karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığı ($p < 0,01$) görülmüş olup, miR-21 ile *PTEN* arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon ($r = -0,396$, $p < 0,05$) tespit edilmiştir (Xiong ve ark., 2013). Ayrıca, yüksek miR-21 ve düşük *PTEN* ekspresyonlarının invazyon, lenf nodu metastazı ve ileri TNM evresi (III, IV) ile anlamlı düzeyde ilişkili olduğu gözlenmiştir (). 125 CRC’li dokuda yapılan çalışmada da miR-21 ekspresyon seviyesinin CRC’de anlamlı derecede yüksek olduğu ($p = 0,014$) gözlenmiş olup, *PTEN* mRNA ve miR-21 ekspresyon seviyeleri arasında negatif korelasyon olduğu ($r = -0.595$, $P < 0.001$) anlaşılmıştır (Yazdani ve ark., 2016).

Çalışmamızda *GAPDH* referans gen olarak alındığında hastalardaki *PTEN* ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla CRC'li hastalarda anlamlı ölçüde bir artış gösterdiği görülmüştür (1,51-kat, $p=0,040$). Beta-actin referans gen olarak alındığında hastalarda *PTEN* ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($p>0.05$). *GAPDH* referans gen olarak alındığında hasta grubunda *PTEN* ile miR-21 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlanmamıştır ($p>0.05$). Beta-actin referans gen olarak alındığında hasta grubunda *PTEN* ile miR-21 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon görülmemiştir ($p>0.05$).

Araştırmalara göre *KRAS*, miR-21, miR-31 ve miR-143'ün hedef genleri arasında yer almaktadır (Chen ve ark., 2009; Kent ve ark., 2016; Moghadamnia ve ark., 2020). MiRNA'ların ekspresyonlarını CRC ile ilişkili genlerden *KRAS* mRNA seviyeleriyle ilişkilendiren 72 CRC'li dokuda (Moghadamnia ve ark., 2020) yapılan çalışmada miR-21 ve miR-31'in ekspresyon düzeyi açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Aynı zamanda miR-21 ile *KRAS* arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir ($p<0,001$). 48 CRC'li dokuda (Sun ve ark., 2016) yapılan çalışmada miR-21'in ($p=0.0000$) ekspresyonu anlamlı bir artış gösterirken, miR-143 ($p=0.0028$) anlamlı bir azalış göstermiştir. MiR-21 ile *KRAS* ekspresyonu arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Çalışmamızda CRC'li hastalarda *GAPDH* referans gen olarak alındığında *KRAS* ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı gözlenmiştir (%43,24, $p=0,004$). Beta-actin referans gen olarak alındığında hastalarda *PTEN* ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($p>0.05$). *GAPDH* referans gen olarak alındığında hasta grubunda *KRAS* ile miR-21, miR-31 ve miR-143 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlanmamıştır ($p>0.05$). Beta-actin referans gen olarak alındığında hasta grubunda *KRAS* ile miR-21 ve miR-31 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlanmamıştır ($p>0.05$). Beta-actin referans gen olarak alındığında *KRAS* ile miR-143 arasında negatif orta derecede istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu gözlenmiştir ($p>0.05$).

Araştırmalara göre *HK2*, CRC ile ilişkili önemli bir miR-143 hedef genidir (Gegersen ve ark., 2012; Jahangiri ve ark., 2022; Chen ve ark., 2023). 215 CRC'li dokuda (Zhu ve ark., 2017) yapılan çalışmada normal dokulara kıyasla CRC

dokularında *HK2*'nin önemli ölçüde artışı gözlenmiştir. Bu artışın ileri klinik evrelerde (III ve IV) erkem klinik evrelere (I ve II) göre çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hücre kültürü ve mezenkimal kök hücrelerden türetilen CRC üzerinde yapılmış çalışmada (Jahangiri ve ark., 2022), miR-143 seviyelerinde artışa rastlanmıştır olup, *HK2* ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Son yıllardaki bir diğer araştırmada (Chen ve ark., 2023) CRC'de *HK2*'nin artan ekspresyonu ve CRC'nin 5-Fluorourasil direnci ile pozitif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. 5-Fluorourasil'e dirençli CRC hastalarında ve kolon kanseri hücrelerinde miR-143 ekspresyonu belirgin şekilde baskılanmıştır. CRC hücrelerinde ise *HK2* ile miR-143 ekspresyonları ters korelasyon göstermiştir. 113 prostat kanseri dokusunda (Peschiaroli ve ark., 2013) yapılan çalışmada prostat kanserli dokuda miR-143 ekspresyon seviyeleri azalmış olup özellikle metastatik vakalarda daha çok azaldığı tespit edilmiştir. Prostat kanserli dokularda normal dokulara kıyasla *HK2* ekspresyon seviyelerinde anlamlı artış görülmüştür (8,68'e karşı 8,93; $P = 0,0002$). Çalışmamızda CRC'li hastalarda *GAPDH* referans gen olarak alındığında *HK2* ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde artış gösterdiği görülmüştür (2,17-kat, $p = 0,005$). Beta-actin referans gen olarak alındığında hastalarda *HK2* ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artış gösterdiği gözlenmiştir (2,53-kat, $p = 0,001$). *GAPDH* referans gen olarak alındığında hasta grubunda *HK2* ile miR-143 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlanmadı ($p > 0.05$). Beta-actin referans gen olarak alındığında hasta grubunda *HK2* ile miR-143 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlanmamıştır ($p > 0.05$).

Araştırmalara göre *BCL2*, miR-21 ve miR-143'ün hedef genleri arasında yer almaktadır (Han ve ark., 2006; Karimi ve ark., 2019). 24 CRC'li dokuda (Liu ve ark., 2021) yapılan çalışmada *BCL2*'nin ekspresyon seviyeleri normal dokularla kıyaslandığında CRC'li dokularda önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir ($p < 0,001$). Yapılan hücre kültürü çalışmasında (Karimi ve ark., 2019) miR-143 değişiminin *BCL2*, *BAX* ve *BAX/BCL2* oranının ifadesi üzerindeki etkisi incelenmiş olup miR-143 ile *BCL2*'nin önemli ölçüde negatif korelasyonu saptanmıştır. MiR-143 transfekte edilmiş hücrelerde *BCL2* mRNA'sında anlamlı bir azalma (0,278-kat) görülmüş olup *BAX* değişikliğe uğramamıştır (1,16-kat). *BAX/BCL2* oranı ise miR-143 uygulanan hücre dizilerinde 4,17 kata çıkmıştır ($p < 0.01$). Çalışmamızda CRC'li hastalarda *GAPDH* referans gen olarak alındığında *BCL2* ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla

istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır ($p>0,05$). Beta-actin referans gen olarak alındığında hastalarda *BCL2* ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır ($p>0,05$). *GAPDH* referans gen olarak alındığında hasta grubunda *BCL2* ile miR-21 ve *BCL2* ile miR-143 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlanmadı ($p>0,05$). Beta-actin referans gen olarak alındığında hasta grubunda *BCL2* ile miR-143 ve *BCL2* ile miR-21 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlanmamıştır ($p>0,05$).

Araştırmalara göre *DNMT3A*, CRC ile ilişkili önemli bir miR-143 hedef genidir (Ng ve ark., 2009; Kutilin, 2020). 50 CRC'li dokuda (Ng ve ark., 2009) yapılan çalışmada miR-143 ekspresyon seviyeleri normal dokulara kıyasla anlamlı olarak azaldığı ($p<0,0001$) gözlenmiş olup miR-143 ve *DNMT3A* ekspresyon seviyeleri arasında negatif korelasyon saptanmıştır ($p=0,048$) (Ng ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda miR-143'ün çeşitli kanser türlerinde *DNMT3A* ekspresyon seviyeleri arasında negatif bir korelasyon olduğu görülmüştür (Zhang ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2017; Han ve ark., 2021). CRC'li hastalarda *GAPDH* referans gen olarak alındığında *DNMT3A* ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır ($p>0,05$). Beta-actin referans gen olarak alındığında hastaların *DNMT3A* ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır ($p>0,05$). *GAPDH* referans gen olarak alındığında hasta grubunda *DNMT3A* ile miR-143 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlanmadı ($p>0,05$). Beta-actin referans gen olarak alındığında hasta grubunda *DNMT3A* ile miR-143 arasında negatif orta derecede istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abella, V., Valladares, M., Rodriguez, T., Haz, M., Blanco, M., Tarrío, N. ve ark.. (2012). miR-203 regulates cell proliferation through its influence on Hkai expression. *PloS one*, 7(12), e52568.
- Abo-Elela, D. A., Salem, A. M., Swellam, M., & Hegazy, M. G. (2023). Potential diagnostic role of circulating MiRNAs in colorectal cancer. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 37, 03946320221144565.
- Adorján, P., Distler, J., Lipscher, E., Model, F., Müller, J., Pelet, C. ve ark. (2002). Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. *Nucleic acids research*, 30(5), e21-e21.
- Akao, Y., Nakagawa, Y., & Naoe, T. (2006). MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncology reports*, 16(4), 845-850.
- Akao, Y., Nakagawa, Y., & Naoe, T. (2007). MicroRNA-143 and-145 in colon cancer. *DNA and cell biology*, 26(5), 311-320.
- Ali Syeda, Z., Langden, S. S. S., Munkhzul, C., Lee, M., & Song, S. J. (2020). Regulatory mechanism of MicroRNA expression in cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1723.
- Almeida, M.I., Nicoloso, M.S., Zeng, L., Ivan, C., Spizzo, R., Gafà, R. ve ark. (2012). Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells. *Gastroenterology*, 142(4), 886-896.
- Al-Qathama, A., Gibbons, S., & Prieto, J.M. (2017). Differential modulation of Bax/Bcl-2 ratio and onset of caspase-3/7 activation induced by derivatives of Justicidin B in human melanoma cells A375. *Oncotarget*, 8(56), 95999.
- Arndt, G.M., Dossey, L., Cullen, L.M., Lai, A., Druker, R., Eisbacher, M. ve ark. (2009). Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC cancer*, 9, 1-17.
- Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691.
- Asangani, I.A., Rasheed, S.A., Nikolova, D.A., Leupold, J.H., Colburn, N.H., Post, S. ve ark. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor

- suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 27(15), 2128-2136.
- Bai, J.W., Xue, H.Z., & Zhang, C. (2016). Down-regulation of microRNA-143 is associated with colorectal cancer progression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(22), 4682-4687.
- Bakirtzi, K., Hatziapostolou, M., Karagiannides, I., Polytarchou, C., Jaeger, S., Iliopoulos, D. ve ark. (2011). Neurotensin signaling activates microRNAs-21 and-155 and Akt, promotes tumor growth in mice, and is increased in human colon tumors. *Gastroenterology*, 141(5), 1749-1761.
- Bandres, E., Bitarte, N., Arias, F., Agorreta, J., Fortes, P., Agirre, X. ve ark. (2009). microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 15(7), 2281-2290.
- Bandrés, E., Cubedo, E., Agirre, X., Malumbres, R., Zarate, R., Ramirez, N. ve ark. (2006). Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Molecular cancer*, 5, 1-10.
- Baraniskin, A., Birkenkamp-Demtroder, K., Maghnouj, A., Zöllner, H., Munding, J., Klein-Scory, S. ve ark. (2012). MiR-30a-5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL. *Carcinogenesis*, 33(4), 732-739.
- Baretton, G.B., Diebold, J., Christoforis, G., Vogt, M., Müller, C., Dopfer, K. ve ark. (1996). Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas: Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 77(2), 255-264.
- Bastaminejad, S., Taherikalani, M., Ghanbari, R., Akbari, A., Shabab, N., & Saidijam, M. (2017). Investigation of microRNA-21 expression levels in serum and stool as a potential non-invasive biomarker for diagnosis of colorectal cancer. *Iranian biomedical journal*, 21(2), 106.
- Baylin, S.B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(9), a019505.
- Benderska, N., Dittrich, A.L., Knaup, S., Rau, T.T., Neufert, C., Wach, S. ve ark. (2015). miRNA-26b overexpression in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Inflammatory bowel diseases*, 21(9), 2039-2051.

- Binefa, G., Rodríguez-Moranta, F., Teule, À., & Medina-Hayas, M. (2014). Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(22), 6786.
- Biswas, S., & Rao, C. M. (2017). Epigenetics in cancer: fundamentals and beyond. *Pharmacology & Therapeutics*, 173, 118-134.
- Bouras, E., Kim, A.E., Lin, Y., Morrison, J., Du, M., Albanes, D. ve ark. (2023). Genome-wide interaction analysis of folate for colorectal cancer risk. *The American journal of clinical nutrition*, 118(5), 881-891.
- Brenner, H., Altenhofen, L., & Hoffmeister, M. (2010). Sex, age, and birth cohort effects in colorectal neoplasms: a cohort analysis. *Annals of internal medicine*, 152(11), 697-703.
- Brzozowa-Zasada, M., Kurek, J., Piecuch, A., & Stęplewska, K. (2018). Correlation study of GAPDH, Bcl-2, and Bax protein immunoexpression in patients with colorectal adenocarcinoma. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny*, 13(4), 322-331.
- Buscaglia, L.E.B., & Li, Y. (2011). Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chinese journal of cancer*, 30(6), 371.
- Cai, S.D., Chen, J.S., Xi, Z.W., Zhang, L. J., Niu, M.L., & Gao, Z.Y. (2015). MicroRNA 144 inhibits migration and proliferation in rectal cancer by downregulating ROCK 1. *Molecular medicine reports*, 12(5), 7396-7402.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E. ve ark. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(24), 15524-15529.
- Carroll, M. R., Seaman, H. E., & Halloran, S. P. (2014). Tests and investigations for colorectal cancer screening. *Clinical biochemistry*, 47(10-11), 921-939.
- Casadaban, L., Rauscher, G., Aklilu, M., Villenes, D., Freels, S., & Maker, A.V. (2016). Adjuvant chemotherapy is associated with improved survival in patients with stage II colon cancer. *Cancer*, 122(21), 3277-3287.
- Castro Muñoz, L. J., Ulloa, E. V., Sahlgren, C., Lizano, M., La Cruz-Hernández, D., & Contreras Paredes, A. (2023). Modulating epigenetic modifications for cancer therapy. *Oncology Reports*, 49(3), 1-23.

- Chai, J., Wang, S., Han, D., Dong, W., Xie, C., & Guo, H. (2015). MicroRNA-455 inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer by targeting RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase. *Tumor Biology*, 36, 1313-1321.
- Chang, K.H., Miller, N., Kheirleiseid, E.A., Lemetre, C., Ball, G.R., Smith, M.J. ve ark. (2011). MicroRNA signature analysis in colorectal cancer: identification of expression profiles in stage II tumors associated with aggressive disease. *International journal of colorectal disease*, 26, 1415-1422.
- Chang, K.H., Miller, N., Kheirleiseid, E.A.H., Ingoldsby, H., Hennessy, E., Curran, C.E. ve ark. (2011). MicroRNA-21 and PDCD4 expression in colorectal cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 37(7), 597-603.
- Chen, D.L., Wang, Z.Q., Zeng, Z.L., Wu, W.J., Zhang, D.S., Luo, H.Y. ve ark. (2014). Identification of microRNA-214 as a negative regulator of colorectal cancer liver metastasis by way of regulation of fibroblast growth factor receptor 1 expression. *Hepatology*, 60(2), 598-609.
- Chen, W., Chen, Y., & Hui, T. (2023). microRNA-143 interferes the EGFR-stimulated glucose metabolism to re-sensitize 5-FU resistant colon cancer cells via targeting hexokinase 2. *Journal of Chemotherapy*, 35(6), 539-549.
- Chen, X., Guo, X., Zhang, H., Xiang, Y., Chen, J., Yin, Y. ve ark. (2009). Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, 28(10), 1385-1392.
- Chen, Z., Liu, S., Tian, L., Wu, M., Ai, F., Tang, W. ve ark. (2015). miR-124 and miR-506 inhibit colorectal cancer progression by targeting DNMT3B and DNMT1. *Oncotarget*, 6(35), 38139.
- Chen, Z.Y., Chen, X., & Wang, Z.X. (2016). The role of microRNA-196a in tumorigenesis, tumor progression, and prognosis. *Tumor Biology*, 37, 15457-15466.
- Christensen, L.L., Tobiasen, H., Holm, A., Schepeler, T., Ostensfeld, M.S., Thorsen, K. ve ark. (2013). MiRNA-362-3p induces cell cycle arrest through targeting of E2F1, USF2 and PTPN1 and is associated with recurrence of colorectal cancer. *International journal of cancer*, 133(1), 67-78.
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M. ve ark. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13944-13949.

- Coffer, P.J., Jin, J., & Woodgett, J.R. (1998). Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochemical Journal*, 335(1), 1-13.
- Colakoglu, T., Yildirim, S., Kayaselcuk, F., Nursal, T.Z., Ezer, A., Noyan, T. ve ark. (2008). Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence?. *The American journal of surgery*, 195(6), 719-725.
- Cottonham, C.L., Kaneko, S., & Xu, L. (2010). miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35293-35302.
- Das, P. M., & Singal, R. (2004). DNA methylation and cancer. *Journal of clinical oncology*, 22(22), 4632-4642.
- Dawson, M. A., & Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *cell*, 150(1), 12-27.
- Delcuve, G. P., Rastegar, M., & Davie, J. R. (2009). Epigenetic control. *Journal of cellular physiology*, 219(2), 243-250.
- Ding, Q., Chang, C. J., Xie, X., Xia, W., Yang, J.Y., Wang, S.C. ve ark. (2011). APOBEC3G promotes liver metastasis in an orthotopic mouse model of colorectal cancer and predicts human hepatic metastasis. *The Journal of clinical investigation*, 121(11).
- Ding, W.J., Fang, J.Y., Chen, X.Y., & Peng, Y.S. (2008). The expression and clinical significance of DNA methyltransferase proteins in human gastric cancer. *Digestive diseases and sciences*, 53, 2083-2089.
- Eads, C.A., Danenberg, K.D., Kawakami, K., Saltz, L.B., Danenberg, P.V., & Laird, P.W. (1999). CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer research*, 59(10), 2302-2306.
- Earle, J.S., Luthra, R., Romans, A., Abraham, R., Ensor, J., Yao, H. ve ark. (2010). Association of microRNA expression with microsatellite instability status in colorectal adenocarcinoma. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(4), 433-440.
- English, J.M., Pearson, G., Baer, R., & Cobb, M.H. (1998). Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 3854-3860.

- Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E.G., Ravichandran, L.V. ve ark. (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52361-52365.
- Eslamizadeh, S., Heidari, M., Agah, S., Faghihloo, E., Ghazi, H., Mirzaei, A., & Akbari, A. (2018). The role of microRNA signature as diagnostic biomarkers in different clinical stages of colorectal cancer. *Cell Journal (Yakhteh)*, 20(2), 220.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(11), 1148–1159.
- Fadaka, A.O., Pretorius, A., & Klein, A. (2019). Biomarkers for stratification in colorectal cancer: microRNAs. *Cancer Control*, 26(1), 1073274819862784.
- Fandy, T. E., & Gore, S. D. (2010). Epigenetic targets in human neoplasms. *Epigenomics*, 2(2), 221-232.
- Fang, J., Zhou, Q., Liu, L.Z., Xia, C., Hu, X., Shi, X. ve ark. (2007). Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 α and VEGF expression. *Carcinogenesis*, 28(4), 858-864.
- Fang, J.Y., & Richardson, B.C. (2005). The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The lancet oncology*, 6(5), 322-327.
- Fang, Y., Sun, B., Li, Z., Chen, Z., & Xiang, J. (2016). MiR-622 inhibited colorectal cancer occurrence and metastasis by suppressing K-Ras. *Molecular Carcinogenesis*, 55(9), 1369-1377.
- Fang, Y., Yan, C., Zhao, Q., Xu, J., Liu, Z., Gao, J. ve ark. (2021). The roles of microbial products in the development of colorectal cancer: a review. *Bioengineered*, 12(1), 720-735.
- Fawzy, M.S., Toraih, E.A., Ibrahiem, A., Abdeldayem, H., Mohamed, A.O., & Abdel-Daim, M.M. (2017). Evaluation of miRNA-196a2 and apoptosis-related target genes: ANXA1, DFFA and PDCD4 expression in gastrointestinal cancer patients: A pilot study. *PloS one*, 12(11), e0187310.
- Fellizar, A., Refuerzo, V., Ramos, J. D., & Albano, P. M. (2023). Expression of specific microRNAs in tissue and plasma in colorectal cancer. *Journal of pathology and translational medicine*, 57(3), 147.
- Feng, B., Dong, T.T., Wang, L.L., Zhou, H.M., Zhao, H.C., Dong, F. ve ark. (2012). Colorectal cancer migration and invasion initiated by microRNA-106a. *PloS one*, 7(8): 10.

- Fujita, S., Ito, T., Mizutani, T., Minoguchi, S., Yamamichi, N., Sakurai, K. ve ark.(2008). miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *Journal of molecular biology*, 378(3), 492-504.
- Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, C.C., Burchard, J., Linsley, P.S. ve ark. (2008). MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Molecular and cellular biology*, 28(17), 5369-5380.
- Ge, J., Chen, Z., Li, R., Lu, T., & Xiao, G. (2014). Upregulation of microRNA-196a and microRNA-196b cooperatively correlate with aggressive progression and unfavorable prognosis in patients with colorectal cancer. *Cancer cell international*, 14, 1-8.
- GENCODE (2024). Erişim: 01.2024, The GENCODE Project: Encyclopædia of genes and gene variants (version 45), <https://www.encodegenes.org/human/stats.html>
- Gherman, A., Balacescu, L., Popa, C., Cainap, C., Vlad, C., Cainap, S. S. ve ark. (2023). Baseline expression of exosomal miR-92a-3p and miR-221-3p could predict the response to first-line chemotherapy and survival in metastatic colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10622.
- Gokul, G., & Khosla, S. (2012). DNA methylation and cancer. *Epigenetics: development and disease*, 597-625.
- Gong, B., Liu, W.W., Nie, W.J., Li, D.F., Xie, Z.J., Liu,C. ve ark. (2015). MiR-21/RASA1 axis affects malignancy of colon cancer cells via RAS pathways. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(5), 1488.
- Grady, W. M. (2005). Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer. *Biochemical Society Transactions*, 33(4), 684-688.
- Gregersen, L.H., Jacobsen, A., Frankel, L.B., Wen, J., Krogh, A., & Lund, A.H. (2012). MicroRNA-143 down-regulates Hexokinase 2 in colon cancer cells. *BMC cancer*, 12, 1-10.
- Gregersen, L.H., Jacobsen, A.B., Frankel, L.B., Wen, J., Krogh, A., & Lund, A.H. (2010). MicroRNA-145 targets YES and STAT1 in colon cancer cells. *PloS one*, 5(1), e8836.
- Guo, C., Sah, J.F., Beard, L., Willson, J.K., Markowitz, S.D., & Guda, K. (2008). The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting

- phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 47(11), 939-946.
- Guo, H., Hu, X., Ge, S., Qian, G., & Zhang, J. (2012). Regulation of RAP1B by miR-139 suppresses human colorectal carcinoma cell proliferation. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(9), 1465-1472.
- Guo, L., Fu, J., Sun, S., Zhu, M., Zhang, L., Niu, H. ve ark. (2019). MicroRNA-143-3p inhibits colorectal cancer metastases by targeting ITGA6 and ASAP3. *Cancer science*, 110(2), 805-816.
- Guo, S.T., Jiang, C.C., Wang, G.P., Li, Y.P., Wang, C.Y., Guo, X.Y. ve ark. (2013). MicroRNA-497 targets insulin-like growth factor 1 receptor and has a tumour suppressive role in human colorectal cancer. *Oncogene*, 32(15), 1910-1920.
- Han, H.B., Gu, J., Zuo, H.J., Chen, Z.G., Zhao, W., Li, M. ve ark. (2012). Let-7c functions as a metastasis suppressor by targeting MMP11 and PBX3 in colorectal cancer. *The Journal of pathology*, 226(3), 544-555.
- Han, H.S., Park, Y.M., & Hwang, T.S. (2006). Differential expression of Bcl-2, Bcl-XL and p53 in colorectal cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 21(7), 1108-1114.
- Han, L., Shi, W. J., Xie, Y. B., & Zhang, Z. G. (2021). Diagnostic value of four serum exosome microRNAs panel for the detection of colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 13(8), 970.
- Han, M., Liu, M., Wang, Y., Mo, Z., Bi, X., Liu, Z. ve ark. (2012). Re-expression of miR-21 contributes to migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell characteristics in MCF-7 cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 363, 427-436.
- Han, X., Liu, D., Zhou, Y., Wang, L., Hou, H., Chen, H. ve ark. (2021). The negative feedback between miR-143 and DNMT3A regulates cisplatin resistance in ovarian cancer. *Cell Biology International*, 45(1), 227-237.
- Han, Z. G. (2010). Epigenetic analysis in the search for tumor suppressor genes. *Epigenomics*, 2(4), 489-493.
- Hao, Y. J., Yang, C. Y., Chen, M. H., Chang, L. W., Lin, C. P., Lo, L. C. ve ark. (2022). Potential values of circulating microRNA-21 to predict early recurrence in patients with colorectal cancer after treatments. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2400.

- Harriss, D.J., Atkinson, G., Batterham, A., George, K., Tim Cable, N., Reilly, T. ve ark. (2009). Lifestyle factors and colorectal cancer risk (2): a systematic review and meta-analysis of associations with leisure-time physical activity. *Colorectal Disease*, 11(7), 689-701.
- Hart, L.S., Dolloff, N.G., Dicker, D.T., Koumenis, C., Christensen, J.G., Grimberg, A. ve ark. (2011). Human colon cancer stem cells are enriched by insulin-like growth factor-1 and are sensitive to figitumumab. *Cell cycle*, 10(14), 2331-2338.
- Hatley, M.E., Patrick, D.M., Garcia, M.R., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Van Rooij, E. ve ark. (2010). Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer cell*, 18(3), 282-293.
- Hishida, A., Yamada, H., Ando, Y., Okugawa, Y., Shiozawa, M., Miyagi, Y. ve ark. (2022). Investigation of miRNA expression profiles using cohort samples reveals potential early detectability of colorectal cancers by serum miR 26a 5p before clinical diagnosis. *Oncology Letters*, 23(3), 1-9.
- Hofsli, E., Sjrursen, W., Prestvik, W. S., Johansen, J., Rye, M., Tranø, G. ve ark. (2013). Identification of serum microRNA profiles in colon cancer. *British journal of cancer*, 108(8), 1712-1719.
- Horiuchi, A., Iinuma, H., Akahane, T., Shimada, R., & Watanabe, T. (2012). Prognostic significance of PDCD4 expression and association with microRNA-21 in each Dukes' stage of colorectal cancer patients. *Oncology reports*, 27(5), 1384-1392.
- Huang, S.X., Fan, W.Y., Wang, L., Liu, H., Wang, X., Zhao, H. ve ark. (2020). Maspin inhibits MCF 7 cell invasion and proliferation by downregulating miR 21 and increasing the expression of its target genes. *Oncology letters*, 19(4), 2621-2628.
- Huang, Z., Huang, S., Wang, Q., Liang, L., Ni, S., Wang, L. ve ark. (2011). MicroRNA-95 promotes cell proliferation and targets sorting Nexin 1 in human colorectal carcinoma. *Cancer research*, 71(7), 2582-2589.
- Huncharek, M., Muscat, J., & Kupelnick, B. (2008). Colorectal cancer risk and dietary intake of calcium, vitamin D, and dairy products: a meta-analysis of 26,335 cases from 60 observational studies. *Nutrition and cancer*, 61(1), 47-69.
- Hussen, B. M., Hidayat, H. J., Salihi, A., Sabir, D. K., Taheri, M., & Ghafouri-Fard, S. (2021). MicroRNA: A signature for cancer progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 138, 111528.

- Iacobuzio-Donahue, C. A., Maitra, A., Olsen, M., Lowe, A. W., Van Heek, N. T., Rosty, C. ve ark. (2003). Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. *The American journal of pathology*, 162(4), 1151-1162.
- Ibrahim, A.F., Weirauch, U., Thomas, M., Grünweller, A., Hartmann, R.K., & Aigner, A. (2011). MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma. *Cancer research*, 71(15), 5214-5224.
- Ilyas, M., Hao, X.P., Wilkinson, K., Tomlinson, I.P.M., Abbasi, A.M., Forbes, A. ve ark. (1998). Loss of Bcl-2 expression correlates with tumour recurrence in colorectal cancer. *Gut*, 43(3), 383-387.
- Ionescu, V. A., Gheorghe, G., Bacalbasa, N., Chiotoroiu, A. L., & Diaconu, C. (2023). Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina*, 59(9), 1646.
- Ivkovic, T.C., Aralica, G., Cacev, T., Loncar, B., & Kapitanovic, S. (2013). miR-106a overexpression and pRB downregulation in sporadic colorectal cancer. *Experimental and molecular pathology*, 94(1), 148-154.
- Jafarlou, M., Shanehbandi, D., Dehghan, P., Mansoori, B., Othman, F., & Baradaran, B. (2018). Enhancement of chemosensitivity by simultaneously silencing of Mcl-1 and Survivin genes using small interfering RNA in human myelomonocytic leukaemia. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(8), 1792-1798.
- Jahangiri, B., Khalaj-Kondori, M., Asadollahi, E., Dizaj, L.P., & Sadeghizadeh, M. (2022). MSC-Derived exosomes suppress colorectal cancer cell proliferation and metastasis via miR-100/mTOR/miR-143 pathway. *International Journal of Pharmaceutics*, 627, 122214.
- Jayasinghe, M., Prathiraja, O., Caldera, D., Jena, R., Coffie-Pierre, J.A., Silva, M.S. ve ark. (2023). Colon cancer screening methods: 2023 update. *Cureus*, 15(4).
- Jeltsch, A. (2002). Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem*, 3(4), 274-293.
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews genetics*, 3(6), 415-428.
- Jones, P.A., & Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), 683-692.
- Jung, G., Hernández-Illán, E., Moreira, L., Balaguer, F., & Goel, A. (2020). Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 17(2), 111-130.

- Kanaan, Z., Rai, S.N., Eichenberger, M.R., Roberts, H., Keskey, B., Pan, J. ve ark. (2012). Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer. *Annals of surgery*, 256(3), 544-551.
- Kanwal, R., & Gupta, S. (2010). Epigenetics and cancer. *Journal of applied physiology*.
- Karimi, L., Mansoori, B., Mohammadi, A., Aghapour, M., & Baradaran, B. (2017). Function of microRNA-143 in different signal pathways in cancer: New insights into cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 121-131.
- Karimi, L., Zeinali, T., Hosseinahli, N., Mansoori, B., Mohammadi, A., Yousefi, M. ve ark. (2019). miRNA-143 replacement therapy harnesses the proliferation and migration of colorectal cancer cells in vitro. *Journal of cellular physiology*, 234(11), 21359-21368.
- Kent, O.A., Mendell, J.T., & Rottapel, R. (2016). Transcriptional regulation of miR-31 by oncogenic KRAS mediates metastatic phenotypes by repressing RASA1. *Molecular Cancer Research*, 14(3), 267-277.
- Kim, N.H., Cha, Y.H., Eun Kang, S., Mi Lee, Y., Lee, I., Young Cha, S. ve ark. (2013). p53 regulates nuclear GSK-3 levels through miR-34-mediated Axin2 suppression in colorectal cancer cells. *Cell cycle*, 12(10), 1578-1587.
- Kim, N.H., Kim, H.S., Li, X.Y., Lee, I., Choi, H.S., Kang, S.E. ve ark. (2011). A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial–mesenchymal transition. *Journal of Cell Biology*, 195(3), 417-433.
- Kulda, V., Pesta, M., Topolcan, O., Liska, V., Treska, V., Sutnar, A. ve ark. (2010). Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases. *Cancer genetics and cytogenetics*, 200(2), 154-160.
- Kulis, M., & Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Advances in genetics*, 70, 27-56.
- Kutlin, D. S. (2020). Regulation of gene expression of cancer/testis antigens in colorectal cancer patients. *Molecular biology*, 54(4), 520-534.
- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K. ve ark. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology*, 141(5), 672-675.

- Leahy D.T., Mulcahy H.E., Donoghue D.P.O., Parfrey N.A. (1999). Bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer. *Histopathology*, 35(4), 360-367.
- Li, C., Wang, Y., Lu, S., Zhang, Z., Meng, H., Liang, L. ve ark. (2015). miR 34a inhibits colon cancer proliferation and metastasis by inhibiting platelet derived growth factor receptor α . *Molecular medicine reports*, 12(5), 7072-7078.
- Li, J.M., Zhao, R.H., Li, S.T., Xie, C.X., Jiang, H.H., Ding, W.J. ve ark. (2012). Down-regulation of fecal miR-143 and miR-145 as potential markers for colorectal cancer. *Saudi medical journal*, 33(1), 24-29.
- Li, S., Fang, X.D., Wang, X.Y., & Fei, B.Y. (2018). Fos-like antigen 2 (FOSL2) promotes metastasis in colon cancer. *Experimental cell research*, 373(1-2), 57-61.
- Li, T., Gao, F., & Zhang, X.P. (2015). miR-203 enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil by targeting thymidylate synthase in colorectal cancer. *Oncology reports*, 33(2), 607-614.
- Li, X., Zhao, H., Zhou, X., & Song, L. (2015a). Inhibition of lactate dehydrogenase A by microRNA 34a resensitizes colon cancer cells to 5 fluorouracil. *Molecular medicine reports*, 11(1), 577-582.
- Li, Z., Li, N., Wu, M., Li, X., Luo, Z., & Wang, X. (2013). Expression of miR-126 suppresses migration and invasion of colon cancer cells by targeting CXCR4. *Molecular and cellular biochemistry*, 381, 233-242.
- Li, Z., Zhao, Z., Zhang, G., Liu, Y., & Zheng, S. (2024). LncRNA MEG3 inhibits the proliferation and migration abilities of colorectal cancer cells by competitively suppressing MiR-31 and reducing the binding of MiR-31 to target gene SFRP1. *Aging (Albany NY)*, 16(3), 2061.
- Liang, Y., Zhao, Q., Fan, L., Zhang, Z., Tan, B., Liu, Y. ve ark. (2015). Down-regulation of MicroRNA-381 promotes cell proliferation and invasion in colon cancer through up-regulation of LRH-1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 75, 137-141.
- Liao, W.T., Li, T.T., Wang, Z.G., Wang, S.Y., He, M.R., Ye, Y.P. ve ark. (2013). microRNA-224 promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer by repressing PHLPP1 and PHLPP2. *Clinical Cancer Research*, 19(17), 4662-4672.

- Lin, J., Chuang, C. C., & Zuo, L. (2017). Potential roles of microRNAs and ROS in colorectal cancer: diagnostic biomarkers and therapeutic targets. *Oncotarget*, 8(10), 17328.
- Lin, K.J., Cheung, W.Y., Lai, J.Y.C., & Giovannucci, E.L. (2012). The effect of estrogen vs. combined estrogen-progestogen therapy on the risk of colorectal cancer. *International journal of cancer*, 130(2), 419-430.
- Liu, D., Chen, C., Cui, M., & Zhang, H. (2021). miR-140-3p inhibits colorectal cancer progression and its liver metastasis by targeting BCL9 and BCL2. *Cancer Medicine*, 10(10), 3358-3372.
- Liu, J., Chen, B., Yang, M., Qian, Y., Shen, Q., Chen, H. ve ark. (2023). A three-plasma miRNA panel predicts the risk of colorectal cancer: a community-based nested case-control study. *Scientific Reports*, 13(1), 4196.
- Liu, K., Zhao, H., Yao, H., Lei, S., Lei, Z., Li, T. ve ark. (2013). MicroRNA-124 regulates the proliferation of colorectal cancer cells by targeting iASPP. *BioMed research international*, 2013.
- Liu, L., Chen, L., Xu, Y., Li, R., & Du, X. (2010). microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 400(2), 236-240.
- Liu, M. Z., McLeod, H. L., He, F. Z., Chen, X. P., Zhou, H. H., Shu, Y., & Zhang, W. (2014). Epigenetic perspectives on cancer chemotherapy response. *Pharmacogenomics*, 15(5), 699-715.
- Liu, M., Du, Y., Gao, J., Liu, J., Kong, X., Gong, Y. ve ark. (2013). Aberrant expression miR-196a is associated with abnormal apoptosis, invasion, and proliferation of pancreatic cancer cells. *Pancreas*, 42(7), 1169-1181.
- Liu, M., Tang, Q., Qiu, M., Lang, N., Li, M., Zheng, Y. ve ark. (2011). miR-21 targets the tumor suppressor RhoB and regulates proliferation, invasion and apoptosis in colorectal cancer cells. *FEBS letters*, 585(19), 2998-3005.
- Liu, P., Wang, Z., & Wei, W. (2014). Phosphorylation of Akt at the C-terminal tail triggers Akt activation. *Cell Cycle*, 13(14), 2162-2164.
- Liu, Q., Fu, H., Sun, F., Zhang, H., Tie, Y., Zhu, J. ve ark. (2008). miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic acids research*, 36(16), 5391-5404.

- Liu, R.L., Dong, Y., Deng, Y.Z., Wang, W.J., & Li, W.D. (2015). Tumor suppressor miR-145 reverses drug resistance by directly targeting DNA damage-related gene RAD18 in colorectal cancer. *Tumor biology*, 36, 5011-5019.
- Liu, X., Zhang, Z., Sun, L., Chai, N., Tang, S., Jin, J. ve ark. (2011). MicroRNA-499-5p promotes cellular invasion and tumor metastasis in colorectal cancer by targeting FOXO4 and PDCD4. *Carcinogenesis*, 32(12), 1798-1805.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method. *Methods*. Dec;25(4):402-8.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D. ve ark. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *nature*, 435(7043), 834-838.
- Lu, M.H., Huang, C.C., Pan, M.R., Chen, H.H., & Hung, W.C. (2012). Prospero homeobox 1 promotes epithelial–mesenchymal transition in colon cancer cells by inhibiting E-cadherin via miR-9. *Clinical Cancer Research*, 18(23), 6416-6425.
- Lu, Z., Liu, M., Stribinskis, V., Klinge, C. M., Ramos, K. S., Colburn, N. H. ve ark. (2008). MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*, 27(31), 4373-4379.
- Lundberg, I.V., Wikberg, M.L., Ljuslinder, I., Li, X., Myte, R., Zingmark, C. ve ark. (2018). MicroRNA expression in KRAS-and BRAF-mutated colorectal cancers. *Anticancer research*, 38(2), 677-683.
- Luo, H., Zou, J., Dong, Z., Zeng, Q., Wu, D., & Liu, L. (2012). Up-regulated miR-17 promotes cell proliferation, tumour growth and cell cycle progression by targeting the RND3 tumour suppressor gene in colorectal carcinoma. *Biochemical Journal*, 442(2), 311-321.
- Ma, M.Z., Chu, B.F., Zhang, Y., Weng, M.Z., Qin, Y.Y., Gong, W. ve ark. (2015). Long non-coding RNA CCAT1 promotes gallbladder cancer development via negative modulation of miRNA-218-5p. *Cell death & disease*, 6(1), e1583-e1583.
- Ma, Q., Wang, X., Li, Z., Li, B., Ma, F., Peng, L. ve ark. (2013). microRNA-16 represses colorectal cancer cell growth in vitro by regulating the p53/survivin signaling pathway. *Oncology reports*, 29(4), 1652-1658.
- Mahmoud, H. A., El Amin, H. A., Ahmed, E. S. M., Kenawy, A. G., El-Ebidi, A. M., ElNakeeb, I. ve ark. (2022). Role of MicroRNA-223 and MicroRNA-182 as novel

- biomarkers in early detection of colorectal cancer. *International Journal of General Medicine*, 3281-3291.
- Mandke, P., Wyatt, N., Fraser, J., Bates, B., Berberich, S.J., & Markey, M.P. (2012). MicroRNA-34a modulates MDM4 expression via a target site in the open reading frame. *PLoS One*, 7(8): e42034.
- Mathupala, S.P., Ko, Y.A., & Pedersen, P.L. (2006). Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*, 25(34), 4777-4786.
- Mehrjoei, B., Haghnazari, L., Bashiri, H., & Rezvani, N. (2024). The diagnostic potential of miR-196a-1 in colorectal cancer. *BMC cancer*, 24(1), 162.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S. T., & Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133(2), 647-658.
- Mescher, A. L. (2018). *Junqueira's basic histology: text and atlas*. New York: McGraw Hill.
- Mi, L., Chen, Y., Zheng, X., Li, Y., Zhang, Q., Mo, D. ve ark. (2015). MicroRNA-139-5p suppresses 3T3-L1 preadipocyte differentiation through notch and IRS1/PI3K/Akt insulin signaling pathways. *Journal of cellular biochemistry*, 116(7), 1195-1204.
- Michor, F., Iwasa, Y., Lengauer, C., & Nowak, M.A. (2005). Dynamics of colorectal cancer. *Seminars in cancer biology*, 15(6), 484-493.
- Miranda Furtado, C. L., Dos Santos Luciano, M. C., Silva Santos, R. D., Furtado, G. P., Moraes, M. O., & Pessoa, C. (2019). EpiDrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics*, 14(12), 1164-1176.
- Mobley, A. S. (2019). *Neural stem cells and adult neurogenesis*. Academic Press.
- Moghadamnia, F., Ghoraeian, P., Minaeian, S., Talebi, A., Farsi, F., & Akbari, A. (2020). MicroRNA expression and correlation with mRNA levels of colorectal cancer-related genes. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 51, 271-279.
- Molinari, F., & Frattini, M. (2014). Functions and regulation of the PTEN gene in colorectal cancer. *Frontiers in oncology*, 3, 326.
- Moreta-Moraleda, C., Queralt, C., Vendrell-Ayats, C., Forcales, S., & Martínez-Balibrea, E. (2023). Chromatin factors: ready to roll as biomarkers in metastatic colorectal cancer?. *Pharmacological Research*, 106924.

- Motoyama, K., Inoue, H., Takatsuno, Y., Tanaka, F., Mimori, K., Uetake, H. ve ark. (2009). Over-and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *International journal of oncology*, 34(4), 1069-1075.
- Nagel, R., le Sage, C., Diosdado, B., van der Waal, M., Oude Vrielink, J. A., Bolijn, A. ve ark. (2008). Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer research*, 68(14), 5795-5802.
- Nagy, Z. B., Wichmann, B., Kalmár, A., Galamb, O., Barták, B. K., Spisák, S. ve ark. (2017). Colorectal adenoma and carcinoma specific miRNA profiles in biopsy and their expression in plasma specimens. *Clinical epigenetics*, 9, 1-14.
- Neugut, A.I., Becker, D.J., Insel, B.J., & Hershman, D.L. (2012). Uptake of oxaliplatin and bevacizumab for treatment of node-positive and metastatic colon cancer. *Journal of Oncology Practice*, 8(3), 156-163.
- Ng, E.K., Chong, W.W., Jin, H., Lam, E.K., Shin, V.Y., Yu, J. ve ark. (2009). Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 58(10), 1375-1381.
- Ng, E.K.O., Tsang, W.P., Ng, S.S.M., Jin, H.C., Yu, J., Li, J.J. ve ark. (2009). MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *British journal of cancer*, 101(4), 699-706.
- Nie, J., Liu, L., Zheng, W., Chen, L., Wu, X., Xu, Y. ve ark. (2012). microRNA-365, down-regulated in colon cancer, inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis of colon cancer cells by probably targeting Cyclin D1 and Bcl-2. *Carcinogenesis*, 33(1), 220-225.
- Nosho, K., Igarashi, H., Nojima, M., Ito, M., Maruyama, R., Yoshii, S. ve ark. (2014). Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis*, 35(4), 776-783.
- Oh, B.K., Kim, H., Park, H.J., Shim, Y.H., Choi, J., Park, C. ve ark. (2007). DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *International journal of molecular medicine*, 20(1), 65-73.
- Olaru, A.V., Yamanaka, S., Vazquez, C., Mori, Y., Cheng, Y., Abraham, J. M. ve ark. (2013). MicroRNA-224 negatively regulates p21 expression during late neoplastic progression in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 19(3), 471-480.

- Öfner, D., Riehemann, K., Maier, H., Riedmann, B., Nehoda, H., Tötsch, M. ve ark. (1995). Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumour stage and patient survival. *British journal of cancer*, 72(4), 981-985.
- Padi, S.K., Zhang, Q., Rustum, Y.M., Morrison, C., & Guo, B. (2013). MicroRNA-627 mediates the epigenetic mechanisms of vitamin D to suppress proliferation of human colorectal cancer cells and growth of xenograft tumors in mice. *Gastroenterology*, 145(2), 437-446.
- Panza, A., Votino, C., Gentile, A., Valvano, M.R., Colangelo, T., Pancione, M. ve ark. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated induction of microRNA-145 opposes tumor phenotype in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(6), 1225-1236.
- Pao, J.B., Lu, T.L., Ting, W.C., Chen, L.M., & Bao, B.Y. (2018). Association of Genetic Variants of Small Non-Coding RNAs with Survival in Colorectal Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 15(3), 217.
- Park, J. W., & Han, J. W. (2019). Targeting epigenetics for cancer therapy. *Archives of pharmacal research*, 42, 159-170.
- Park, Y., Hunter, D.J., Spiegelman, D., Bergkvist, L., Berrino, F., Van Den Brandt, P.A. ve ark. (2005). Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *Jama*, 294(22), 2849-2857.
- Patel, B.B., Sengupta, R., Qazi, S., Vachhani, H., Yu, Y., Rishi, A.K. ve ark. (2008). Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R. *International journal of cancer*, 122(2), 267-273.
- Peschiaroli, A., Giacobbe, A., Formosa, A., Markert, E. K., Bongiorno-Borbone, L., Levine, A. J.ve ark. (2013). miR-143 regulates hexokinase 2 expression in cancer cells. *Oncogene*, 32(6), 797-802.
- Prior, I.A., Lewis, P.D., & Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer research*, 72(10), 2457-2467.
- Provenzale, D., Ness, R.M., Llor, X., Weiss, J.M., Abbadessa, B., Cooper, G. ve ark. (2020). NCCN Guidelines insights: colorectal cancer screening, version 2.2020: Featured updates to the NCCN guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 18(10), 1312-1320.

- Qian, X., Yu, J., Yin, Y., He, J., Wang, L., Li, Q. ve ark. (2013). MicroRNA-143 inhibits tumor growth and angiogenesis and sensitizes chemosensitivity to oxaliplatin in colorectal cancers. *Cell cycle*, 12(9), 1385-1394.
- Qin, J., Teng, J.A., Zhu, Z., Chen, J.X., & Wu, Y.Y. (2015). Glargine promotes human colorectal cancer cell proliferation via upregulation of miR-95. *Hormone and Metabolic Research*, 47(11), 861-865.
- Qin, J., Wang, F., Jiang, H., Xu, J., Jiang, Y., & Wang, Z. (2015). MicroRNA-145 suppresses cell migration and invasion by targeting paxillin in human colorectal cancer cells. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(2), 1328.
- Rawson, J. B., & Bapat, B. (2012). Epigenetic biomarkers in colorectal cancer diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*, 12(5), 499-509.
- Rezapour, S., Hosseinzadeh, E., Marofi, F., & Hassanzadeh, A. (2019). Epigenetic-based therapy for colorectal cancer: Prospect and involved mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 19366-19383.
- Rothwell, P.M., Wilson, M., Elwin, C.E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C. P. ve ark. (2010). Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *The Lancet*, 376(9754), 1741-1750.
- Rumpold, H., Niedersüß-Beke, D., Heiler, C., Falch, D., Wundsam, H.V., Metz-Gercek, S. ve ark. (2020). Prediction of mortality in metastatic colorectal cancer in a real-life population: a multicenter explorative analysis. *BMC cancer*, 20, 1-9.
- Saavedra, L., Catarino, R., Heinz, T., Heilmann, I., Bezanilla, M., & Malhó, R. (2015). Phosphatase and tensin homolog is a growth repressor of both rhizoid and gametophore development in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant physiology*, 169(4), 2572-2586.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A. ve ark. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer cell*, 9(6), 435-443.
- Sawan, C., Vaissière, T., Murr, R., & Herceg, Z. (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 642(1-2), 1-13.

- Sayed, D., Rane, S., Lypowy, J., He, M., Chen, I. Y., Vashistha, H. ve ark. (2008). MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths. *Molecular biology of the cell*, 19(8), 3272-3282.
- Schetter, A.J., Leung, S.Y., Sohn, J.J., Zanetti, K.A., Bowman, E.D., Yanaihara, N. ve ark. (2008). MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *Jama*, 299(4), 425-436.
- Schetter, A.J., Okayama, H., & Harris, C.C. (2012). The role of microRNAs in colorectal cancer. *The Cancer Journal*, 18(3), 244-252.
- Schimanski, C.C., Frerichs, K., Rahman, F., Berger, M., Lang, H., Galle, P.R. ve ark. (2009). High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. *World journal of gastroenterology: WJG*, 15(17), 2089.
- Shen, K., Liang, Q., Xu, K., Cui, D., Jiang, L., Yin, P. ve ark. (2012). MiR-139 inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer by targeting the type I insulin-like growth factor receptor. *Biochemical pharmacology*, 84(3), 320-330.
- Shen, X., Jiang, H., Chen, Z., Lu, B., Zhu, Y., Mao, J. ve ark. (2019). MicroRNA-145 inhibits cell migration and invasion in colorectal cancer by targeting TWIST. *OncoTargets and therapy*, 10799-10809.
- Shi, C., Yang, Y., Xia, Y., Okugawa, Y., Yang, J., Liang, Y. ve ark. (2016). Novel evidence for an oncogenic role of microRNA-21 in colitis-associated colorectal cancer. *Gut*, 65(9), 1470-1481.
- Shi, L., Chen, J., Yang, J., Pan, T., Zhang, S., & Wang, Z. (2010). MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain research*, 1352, 255-264.
- Shibuya, H., Iinuma, H., Shimada, R., Horiuchi, A., & Watanabe, T. (2011). Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer. *Oncology*, 79(3-4), 313-320.
- Shin, A.E., Giancotti, F.G. & Rustgi, A.K. (2023). Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics. *Trends in pharmacological sciences*, 44(4), 222-236.
- Si, M.L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., & Mo, Y.Y. (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 26(19), 2799-2803.

- Siegel, R.L., Wagle, N.S., Cercek, A., Smith, R.A., & Jemal, A. (2023). Colorectal cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 73(3), 233-254.
- Slaby, O., Svoboda, M., Fabian, P., Smerdova, T., Knoflickova, D., Bednarikova, M. ve ark. (2008). Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*, 72(5-6), 397-402.
- Slaby, O., Svoboda, M., Fabian, P., Smerdova, T., Knoflickova, D., Bednarikova, M. ve ark. (2008). Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*, 72(5-6), 397-402.
- Slaby, O., Svoboda, M., Michalek, J., & Vyzula, R. (2009). MicroRNAs in colorectal cancer: Translation of molecular biology into clinical application. *Molecular Cancer*, 8(1), 102.
- Song, B., Wang, Y., Titmus, M.A., Botchkina, G., Formentini, A., Kornmann, M. ve ark. (2010). Molecular mechanism of chemoresistance by miR-215 in osteosarcoma and colon cancer cells. *Molecular cancer*, 9, 1-10.
- Song, Y., Xu, Y., Wang, Z., Chen, Y., Yue, Z., Gao, P. ve ark. (2012). MicroRNA-148b suppresses cell growth by targeting cholecystokinin-2 receptor in colorectal cancer. *International journal of cancer*, 131(5), 1042-1051.
- Stefano, S., & Giovanni, S. (2019). The PTEN tumor suppressor gene in soft tissue sarcoma. *Cancers*, 11(8), 1169.
- Strillacci, A., Griffoni, C., Sansone, P., Paterini, P., Piazzzi, G., Lazzarini, G. ve ark. (2009). MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. *Experimental cell research*, 315(8), 1439-1447.
- Su, S.F., Chang, Y.W., Andreu-Vieyra, C., Fang, J.Y., Yang, Z., Han, B. ve ark. (2013). miR-30d, miR-181a and miR-199a-5p cooperatively suppress the endoplasmic reticulum chaperone and signaling regulator GRP78 in cancer. *Oncogene*, 32(39), 4694-4701.
- Sun, D., Yu, F., Ma, Y., Zhao, R., Chen, X., Zhu, J. ve ark. (2013). MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1). *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9508-9518.
- Sun, G., Cheng, Y. W., Lai, L., Huang, T. C., Wang, J., Wu, X. ve ark.. (2016). Signature miRNAs in colorectal cancers were revealed using a bias reduction small RNA deep sequencing protocol. *Oncotarget*, 7(4), 3857.

- Sun, J.Y., Huang, Y., Li, J.P., Zhang, X., Wang, L., Meng, Y.L. ve ark. (2012). MicroRNA-320a suppresses human colon cancer cell proliferation by directly targeting β -catenin. *Biochemical and biophysical research communications*, 420(4), 787-792.
- Tang, Q., Zou, Z., Zou, C., Zhang, Q., Huang, R., Guan, X. ve ark. (2015). MicroRNA-93 suppress colorectal cancer development via Wnt/ β -catenin pathway downregulating. *Tumor Biology*, 36, 1701-1710.
- Tauriello, D.V., Calon, A., Lonardo, E., & Batlle, E. (2017). Determinants of metastatic competency in colorectal cancer. *Molecular oncology*, 11(1), 97-119.
- Thomas, M., Lange-Grünweller, K., Weirauch, U., Gutsch, D., Aigner, A., Grünweller, A. ve ark. (2012). The proto-oncogene Pim-1 is a target of miR-33a. *Oncogene*, 31(7), 918-928.
- Thrift, A.P., Gong, J., Peters, U., Chang-Claude, J., Rudolph, A., Slattery, M. L. ve ark. (2015). Mendelian randomization study of height and risk of colorectal cancer. *International journal of epidemiology*, 44(2), 662-672.
- To, K.K., Tong, C.W., Wu, M., & Cho, W.C. (2018). MicroRNAs in the prognosis and therapy of colorectal cancer: From bench to bedside. *World journal of gastroenterology*, 24(27), 2949.
- Tsang, W.P., Ng, E.K., Ng, S.S., Jin, H., Yu, J., Sung, J.J. ve ark. (2010). Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 31(3), 350-358.
- Tsang, W.P., Ng, E.K., Ng, S.S., Jin, H., Yu, J., Sung, J.J.ve ark. (2010). Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 31(3), 350-358.
- Tsuchida, A., Ohno, S., Wu, W., Borjigin, N., Fujita, K., Aoki, T. ve ark. (2011). miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer science*, 102(12), 2264-2271.
- Tsuchiya, N., Izumiya, M., Ogata-Kawata, H., Okamoto, K., Fujiwara, Y., Nakai, M. ve ark. (2011). Tumor suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. *Cancer research*, 71(13), 4628-4639.
- Valeri, N., Gasparini, P., Fabbri, M., Braconi, C., Veronese, A., Lovat, F. ve ark. (2010). Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 6982-6987.

- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F. ve ark. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), 2257-2261.
- Wang, C.J., Zhou, Z.G., Wang, L., Yang, L., Zhou, B., Gu, J. ve ark. (2009). Clinicopathological significance of microRNA-31,-143 and-145 expression in colorectal cancer. *Disease markers*, 26(1), 27-34.
- Wang, H., Wu, J., Meng, X., Ying, X., Zuo, Y., Liu, R ve ark. (2011). MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1. *Carcinogenesis*, 32(7), 1033-1042.
- Wang, L.L., Hao, S., Zhang, S., Guo, L.J., Hu, C.Y., Zhang, G. ve ark. (2017). PTEN/PI3K/AKT protein expression is related to clinicopathological features and prognosis in breast cancer with axillary lymph node metastases. *Human pathology*, 61, 49-57.
- Wang, P., Zou, F., Zhang, X., Li, H., Dulak, A., Tomko Jr, R.J. ve ark. (2009). microRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells. *Cancer research*, 69(20), 8157-8165.
- Wang, X., Chan, A.T., Slattery, M.L., Chang-Claude, J., Potter, J.D., Gallinger, S. ve ark. (2018). Influence of smoking, body mass index, and other factors on the preventive effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on colorectal cancer risk. *Cancer research*, 78(16), 4790-4799.
- Wang, X., Kuang, Y. Y., & Hu, X. T. (2014). Advances in epigenetic biomarker research in colorectal cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(15), 4276.
- Wang, X., O'Connell, K., Jeon, J., Song, M., Hunter, D., Hoffmeister, M. ve ark. (2019). Combined effect of modifiable and non-modifiable risk factors for colorectal cancer risk in a pooled analysis of 11 population-based studies. *BMJ open gastroenterology*, 6(1), e000339.
- Wang, Y., Tang, Q., Li, M., Jiang, S., & Wang, X. (2014). MicroRNA-375 inhibits colorectal cancer growth by targeting PIK3CA. *Biochemical and biophysical research communications*, 444(2), 199-204.
- Wang, Z., Zhang, X., Yang, Z., Du, H., Wu, Z., Gong, J. ve ark.. (2012). MiR-145 regulates PAK4 via the MAPK pathway and exhibits an antitumor effect in human colon cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 427(3), 444-449.

- WCRF/AICR Continuous Update Project Report: Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer (Revised 2018). <https://www.wcrf.org/wp-content/uploads/2021/02/Colorectal-cancer-report.pdf>
- Weiser, M.R. (2018). AJCC 8th edition: colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*, 25, 1454-1455.
- WHO (2024). Erişim: 08.02.2024, Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1), <https://gco.iarc.who.int/today/en/fact-sheets-cancers>
- Wu, C.W., Dong, Y.J., Liang, Q.Y., He, X.Q., Ng, S.S., Chan, F.K. ve ark. (2013). MicroRNA-18a attenuates DNA damage repair through suppressing the expression of ataxia telangiectasia mutated in colorectal cancer. *PloS one*, 8(2), e57036.
- Wu, C.W., Ng, S.S., Dong, Y.J., Ng, S.C., Leung, W.W., Lee, C.W. ve ark. (2012). Detection of miR-92a and miR-21 in stool samples as potential screening biomarkers for colorectal cancer and polyps. *Gut*, 61(5), 739-745.
- Wu, J., Wu, G., Lv, L., Ren, Y.F., Zhang, X.J., Xue, Y.F. ve ark. (2012). MicroRNA-34a inhibits migration and invasion of colon cancer cells via targeting to Fra-1. *Carcinogenesis*, 33(3), 519-528.
- Wu, K., He, Y., Li, G., & Peng, J. (2015). Expression and proliferative regulation of miR-204 related to mitochondrial transcription factor A in colon cancer. *Zhonghua wei Chang wai ke za zhi= Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 18(10), 1041-1046.
- Wu, W., Yang, J., Feng, X., Wang, H., Ye, S., Yang, P. ve ark. (2013). MicroRNA-32 (miR-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression and promotes growth, migration, and invasion in colorectal carcinoma cells. *Molecular cancer*, 12, 1-11.
- Wu, Y., Song, Y., Xiong, Y., Wang, X., Xu, K., Han, B. ve ark. (2017). MicroRNA-21 (Mir-21) promotes cell growth and invasion by repressing tumor suppressor PTEN in colorectal cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(3), 945-958.
- Xiang, K. M., & Li, X. R. (2014). MiR-133b acts as a tumor suppressor and negatively regulates TBPL1 in colorectal cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(8), 3767-3772.
- Xin, H., Wang, C., & Liu, Z. (2019). miR-196a-5p promotes metastasis of colorectal cancer via targeting IκBα. *BMC cancer*, 19, 1-11.

- Xiong, B., Cheng, Y., Ma, L., & Zhang, C. (2013). MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells. *International journal of oncology*, 42(1), 219-228.
- Xiong, B., Cheng, Y., Ma, L., & Zhang, C. (2013). MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells. *International journal of oncology*, 42(1), 219-228.
- Xiong, B., Cheng, Y., Ma, L., & Zhang, C. (2013). MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells. *International journal of oncology*, 42(1), 219-228.
- Xiong, Y., Zhang, Y.Y., Wu, Y.Y., Wang, X.D., Wan, L.H., & Zhou, L.M. (2014). Correlation of over-expressions of miR-21 and Notch-1 in human colorectal cancer with clinical stages. *Life sciences*, 106(1-2), 19-24.
- Xu, K., Liang, X., Cui, D., Wu, Y., Shi, W., & Liu, J. (2013). miR-1915 inhibits Bcl-2 to modulate multidrug resistance by increasing drug-sensitivity in human colorectal carcinoma cells. *Molecular carcinogenesis*, 52(1), 70-78.
- Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J. A., & Kosik, K. S. (2009). MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*, 137(4), 647-658.
- Xu, Q., Liu, L.Z., Qian, X., Chen, Q., Jiang, Y., Li, D. ve ark. (2012). MiR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis. *Nucleic acids research*, 40(2), 761-774.
- Xu, X.M., Qian, J.C., Deng, Z.L., Cai, Z., Tang, T., Wang, P. ve ark. (2012). Expression of miR-21, miR-31, miR-96 and miR-135b is correlated with the clinical parameters of colorectal cancer. *Oncology letters*, 4(2), 339-345.
- Yamakuchi, M., Ferlito, M., & Lowenstein, C. J. (2008). miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13421-13426.
- Yang, I.P., Tsai, H.L., Hou, M.F., Chen, K.C., Tsai, P.C., Huang, S.W. ve ark. (2012). MicroRNA-93 inhibits tumor growth and early relapse of human colorectal cancer by affecting genes involved in the cell cycle. *Carcinogenesis*, 33(8), 1522-1530.
- Yang, X., Xu, X., Zhu, J., Zhang, S., Wu, Y., Wu, Y. ve ark. (2016). miR-31 affects colorectal cancer cells by inhibiting autophagy in cancer-associated fibroblasts. *Oncotarget*, 7(48), 79617.

- Yang, Y., Yang, J.J., Tao, H., & Jin, W.S. (2015). MicroRNA-21 controls hTERT via PTEN in human colorectal cancer cell proliferation. *Journal of physiology and biochemistry*, 71, 59-68.
- Yazdani, Y., Farazmandfar, T., Azadeh, H., & Zekavatian, Z. (2016). The prognostic effect of PTEN expression status in colorectal cancer development and evaluation of factors affecting it: miR-21 and promoter methylation. *Journal of biomedical science*, 23, 1-8.
- Yazdani, Y., Farazmandfar, T., Azadeh, H., & Zekavatian, Z. (2016). The prognostic effect of PTEN expression status in colorectal cancer development and evaluation of factors affecting it: miR-21 and promoter methylation. *Journal of biomedical science*, 23, 1-8.
- Yazdani, Y., Farazmandfar, T., Azadeh, H., & Zekavatian, Z. (2016). The prognostic effect of PTEN expression status in colorectal cancer development and evaluation of factors affecting it: miR-21 and promoter methylation. *Journal of biomedical science*, 23, 1-8.
- Yin, Y., Yan, Z.P., Lu, N.N., Xu, Q., He, J., Qian, X., ve ark. (2013). Downregulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(2), 239-247.
- Yoshikawa, Y., Fukunaga, M., Takahashi, J., Shimizu, D., Masuda, T., Mizushima, T. ve ark. (2023). Identification of the minimum combination of serum microRNAs to predict the recurrence of colorectal cancer cases. *Annals of Surgical Oncology*, 30(1), 233-243.
- Yu, B., Liu, X., & Chang, H. (2016). MicroRNA-143 inhibits colorectal cancer cell proliferation by targeting MMP7. *Minerva medica*, 108(1), 13-19.
- Yu, G., Li, H., Wang, X., Wu, T., Zhu, J., Huang, S. ve ark. (2013). MicroRNA-19a targets tissue factor to inhibit colon cancer cells migration and invasion. *Molecular and cellular biochemistry*, 380, 239-247.
- Yu, Y., Kanwar, S.S., Patel, B.B., Oh, P.S., Nautiyal, J., Sarkar, F.H. ve ark.. (2012). MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGF β R2) in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 33(1), 68-76.
- Yuan, K., Xie, K., Fox, J., Zeng, H., Gao, H., Huang, C. ve ark. (2013). Decreased levels of miR-224 and the passenger strand of miR-221 increase MBD2, suppressing

maspin and promoting colorectal tumor growth and metastasis in mice. *Gastroenterology*, 145(4), 853-864.

- Yuan, K., Xie, K., Fox, J., Zeng, H., Gao, H., Huang, C. ve ark. (2013). Decreased levels of miR-224 and the passenger strand of miR-221 increase MBD2, suppressing maspin and promoting colorectal tumor growth and metastasis in mice. *Gastroenterology*, 145(4), 853-864.
- Yuan, Z., Baker, K., Redman, M. W., Wang, L., Adams, S. V., Yu, M. ve ark. (2017). Dynamic plasma microRNAs are biomarkers for prognosis and early detection of recurrence in colorectal cancer. *British journal of cancer*, 117(8), 1202-1210.
- Yuen, J.S., Akkaya, E., Wang, Y., Takiguchi, M., Peak, S., Sullivan, M. ve ark. (2009). Validation of the type 1 insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in renal cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 8(6), 1448-1459.
- Zhang, G. J., Zhou, H., Xiao, H. X., Li, Y., & Zhou, T. (2013). Up-regulation of miR-224 promotes cancer cell proliferation and invasion and predicts relapse of colorectal cancer. *Cancer cell international*, 13, 1-10.
- Zhang, G., Zhou, H., Xiao, H., Liu, Z., Tian, H., & Zhou, T. (2014). MicroRNA-92a functions as an oncogene in colorectal cancer by targeting PTEN. *Digestive diseases and sciences*, 59, 98-107.
- Zhang, H. P., Wang, Y. H., Cao, C. J., Yang, X. M., Ma, S. C., Han, X. B. ve ark. (2016). A regulatory circuit involving miR-143 and DNMT3a mediates vascular smooth muscle cell proliferation induced by homocysteine. *Molecular Medicine Reports*, 13(1), 483-490.
- Zhang, H., Li, Y., Huang, Q., Ren, X., Hu, H., Sheng, H. ve ark. (2011). MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell Death & Differentiation*, 18(11), 1702-1710.
- Zhang, H., Tang, J., Li, C., Kong, J., Wang, J., Wu, Y. ve ark. (2015). MiR-22 regulates 5-FU sensitivity by inhibiting autophagy and promoting apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer letters*, 356(2), 781-790.
- Zhang, J., Guo, H., Qian, G., Ge, S., Ji, H., Hu, X. ve ark. (2010). MiR-145, a new regulator of the DNA fragmentation factor-45 (DFF45)-mediated apoptotic network. *Molecular cancer*, 9, 1-10.

- Zhang, J., Guo, H., Zhang, H., Wang, H., Qian, G., Fan, X. ve ark. (2011). Putative tumor suppressor miR-145 inhibits colon cancer cell growth by targeting oncogene Friend leukemia virus integration 1 gene. *Cancer*, 117(1), 86-95.
- Zhang, J., Lu, Y., Yue, X., Li, H., Luo, X., Wang, Y. ve ark. (2013). MiR-124 suppresses growth of human colorectal cancer by inhibiting STAT3. *PloS one*, 8(8), e70300.
- Zhang, J., Xiao, Z., Lai, D., Sun, J., He, C., Chu, Z. ve ark. (2012). miR-21, miR-17 and miR-19a induced by phosphatase of regenerating liver-3 promote the proliferation and metastasis of colon cancer. *British journal of cancer*, 107(2), 352-359.
- Zhang, J., Xiao, Z., Lai, D., Sun, J., He, C., Chu, Z. ve ark. (2012). miR-21, miR-17 and miR-19a induced by phosphatase of regenerating liver-3 promote the proliferation and metastasis of colon cancer. *British journal of cancer*, 107(2), 352-359.
- Zhang, N., Li, X., Wu, C.W., Dong, Y., Cai, M., Mok, M.T.S. ve ark. (2013). microRNA-7 is a novel inhibitor of YY1 contributing to colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, 32(42), 5078-5088.
- Zhang, Q., Feng, Y., Liu, P., & Yang, J. (2017). MiR-143 inhibits cell proliferation and invasion by targeting DNMT3A in gastric cancer. *Tumor Biology*, 39(7), 1010428317711312.
- Zhang, W. W., Ming, X. L., Rong, Y., Huang, C. Q., Weng, H., Chen, H. ve ark. (2019). Diagnostic value investigation and bioinformatics analysis of miR-31 in patients with lymph node metastasis of colorectal cancer. *Analytical Cellular Pathology*, 2019.
- Zhang, X.F., Li, K.K., Gao, L., Li, S.Z., Chen, K., Zhang, J. B. ve ark. (2015). miR-191 promotes tumorigenesis of human colorectal cancer through targeting C/EBP β . *Oncotarget*, 6(6), 4144.
- Zhang, Y., He, X., Liu, Y., Ye, Y., Zhang, H., He, P. ve ark. (2012). microRNA-320a inhibits tumor invasion by targeting neuropilin 1 and is associated with liver metastasis in colorectal cancer Corrigendum in/10.3892/or. 2015.3773. *Oncology reports*, 27(3), 685-694.
- Zhang, Y., Lin, C., Liao, G., Liu, S., Ding, J., Tang, F. ve ark. (2015). MicroRNA-506 suppresses tumor proliferation and metastasis in colon cancer by directly targeting the oncogene EZH2. *Oncotarget*, 6(32), 32586.

- Zhang, Y., Wang, Z., Chen, M., Peng, L., Wang, X., Ma, Q. ve ark. (2012). MicroRNA-143 targets MACC1 to inhibit cell invasion and migration in colorectal cancer. *Molecular cancer*, 11, 1-9.
- Zhao, D. Y., Zhou, L., Yin, T. F., Zhou, Y. C., Wang, Q. Q., & Yao, S. K. (2022). Circulating miR-627-5p and miR-199a-5p are promising diagnostic biomarkers of colorectal neoplasia. *World Journal of Clinical Cases*, 10(16), 5165.
- Zhao, D., Bakirtzi, K., Zhan, Y., Zeng, H., Koon, H.W., & Pothoulakis, C. (2011). Insulin-like growth factor-1 receptor transactivation modulates the inflammatory and proliferative responses of neurotensin in human colonic epithelial cells. *Journal of biological chemistry*, 286(8), 6092-6099.
- Zheng, H.C., Xue, H., & Jiang, H.M. (2022). The roles of ING5 in cancer: A tumor suppressor. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 1012179.
- Zheng, L., Zhang, Y., Liu, Y., Zhou, M., Lu, Y., Yuan, L. ve ark. (2015). MiR-106b induces cell radioresistance via the PTEN/PI3K/AKT pathways and p21 in colorectal cancer. *Journal of translational medicine*, 13, 1-13.
- Zhou, C., Liu, G., Wang, L., Lu, Y., Yuan, L., Zheng, L. ve ark. (2013). MiR-339-5p regulates the growth, colony formation and metastasis of colorectal cancer cells by targeting PRL-1. *PloS one*, 8(5), e63142.
- Zhou, H., Liu, Z., Wang, Y., Wen, X., Amador, E.H., Yuan, L. ve ark. (2022). Colorectal liver metastasis: molecular mechanism and interventional therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 70.
- Zhou, M.K., Liu, X.J., Zhao, Z.G., & Cheng, Y.M. (2015). MicroRNA-100 functions as a tumor suppressor by inhibiting Lgr5 expression in colon cancer cells. *Molecular medicine reports*, 11(4), 2947-2952.
- Zhou, W., Li, X., Liu, F., Xiao, Z., He, M., Shen, S. ve ark. (2012). MiR-135a promotes growth and invasion of colorectal cancer via metastasis suppressor 1 in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin*, 44(10), 838-846.
- Zhu, S., Si, M.L., Wu, H., & Mo, Y.Y. (2007). MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14328-14336.
- Zhu, S., Si, M.L., Wu, H., & Mo, Y.Y. (2007). MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14328-14336.

- Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., & Mo, Y.Y. (2008). MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell research*, 18(3), 350-359.
- Zhu, W., Huang, Y., Pan, Q., Xiang, P., Xie, N., & Yu, H. (2017). MicroRNA-98 suppress Warburg effect by targeting *HK2* in colon cancer cells. *Digestive diseases and sciences*, 62, 660-668.



FORMLAR

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

METASTATİK KOLOREKTAL KANSER HASTALARINDA BİYOBELİRTEÇLER OLARAK EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 11	% 8	% 9	% 0
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 5
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	"microRNAs in Toxicology and Medicine", Wiley, 2013 Yayın	<% 1
4	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	Keun Hur, Yuji Toiyama, Yoshinaga Okugawa, Shozo Ide, Hiroki Imaoka, C Richard Boland, Ajay Goel. "Circulating microRNA-203 predicts prognosis and metastasis in human colorectal cancer", Gut, 2017 Yayın	<% 1
6	tez.sdu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

