



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER PARAMETRELER İLE METASTATİK KARACİĞER
KANSERLERİNDE METASTAZEKTOMİ SONRASI NÜKSÜN
ÖNGÖRÜLMESİ
MÜMKÜN MÜ? RETROSPEKTİF ÇALIŞMA

Dr. Ahmet KARAMUSTAFAOĞLU

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Ekrem KAYA

BURSA – 2021

İÇİNDEKİLER

Özet	4
İngilizce Özet	5
GİRİŞ	7
GENEL BİLGİLER	9
Kolorektal Kanser	9
Kolorektal Kanselerde Karaciğer Metastazları	9
Kolorektal Kanser Oluşumunun Moleküler Mekanizmaları	9
Kolorektal Kanselerde Karaciğer Metastazının Moleküler Oluşum Mekanizmaları ve Metastazda Güncel Belirteçler	13
GEREÇ ve YÖNTEM	19
GEREÇ	19
Kullanılan Aletler ve Cihazlar	19
Kullanılan Kimyasal Malzemeler	19
YÖNTEM	21
Hasta Grubu	21
Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden RNA Elde Edilmesi	22
Elde Edilen RNA'ların Miktar ve Kalite Tayini	22
RNA'lardan cDNA Sentezi	23
Real-Time PCR ile mRNA Ekspresyon Analizleri	24
İstatistiksel Analiz	24
BULGULAR	26
TARTIŞMA ve SONUÇ	32
KAYNAKÇA	50

TEŞEKKÜR

53

ÖZGEÇMİŞ

54

ÖZET

Planlanan bu tez çalışmasında, kolorektal tümörlerden köken alan metastatik karaciğer kanserlerinde (mKK) takip sırasında oluşan nükse ve kısa sağkalıma neden olan genetik ve epigenetik sinyal yollarının araştırılarak rutin pratikte kullanılabilecek güçlü bir biyobelirtecini tanımlanması amaçlanmaktadır.

Mevcut tez çalışmasında hasta seçim kriterleri doğrultusunda belirlenen mKK'larda ve primer kolorektal kanserlerde, gerçek zamanlı PCR kullanılarak kök hücre belirteçleri, RAS, PIK3CA, P53, mTOR, VEGF sinyal yollarının ve EMT mekanizmasının aktivitesi incelendi. Web tabanlı Sabiosciences PCR-Data Analiz programından yararlanılarak, gruplar arasında mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimleri ifade eden kat değişimleri belirlendi.

Çalışmada 85 primer kolorektal kanser vakası değerlendirildi. 21 vakada (%24.7) mKK gelişimi gözlemlendi. Metastazektomi sonrası 21 vakanın 9'unda nüks belirlendi. Genel sağ kalım ortalama 84 ay olarak belirlendi. Hastalısız sağ kalım da ortalama 51 ay olarak saptandı. Kök hücre CD44, EMT'den SNAIL, TWIST, MEK ve mTOR ekspresyonlarının mKK gelişiminde etkili olduğu saptandı. CD44, mTOR ve SNAIL yüksek ekspresyonları metastazektomi sonrası nüks gelişiminde etkili olduğu gösterildi.

Bu çalışmada, CD44, mTOR ve SNAIL'in primer kolorektal tümörlerde yüksek ekspresyonlarının ileride gelişecek mKK ve hatta mKK'larda metastazektomi sonrasında gelişecek nüksü öngörmede kullanılabilecek biyobelirteç adayları olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer metastazları, metastazektomi, sinyal yolları, RT-PCR, kolorektal kanser

SUMMARY

Is It Possible to Predict Recurrence After Metastasectomy in Metastatic Liver Cancers with Molecular Parameters? Retrospective Study

In this thesis study, it is aimed to define a strong biomarker that can be used in routine practice by investigating the genetic and epigenetic signaling pathways that is associated with recurrence and poor survival during follow-up of metastatic liver cancers (mCC) originating from colorectal tumors.

In the current thesis study, stem cell markers, RAS, PIK3CA, P53, mTOR, VEGF signaling pathways and EMT mechanism activity were investigated using real-time PCR in mCCs and primary colorectal cancers which are determined with patient selection criteria. Using the web-based Sabiosciences PCR-Data Analysis program, changes in multitude between groups that show changes in mRNA expression level were determined.

In the study, 85 primary colorectal cancer cases were evaluated. mCC development was observed in 21 cases (24.7%). After metastasectomy, recurrence was detected in 9 of 21 cases. The mean overall survival period was 84 months. Disease-free survival period was also found to be 51 months on average. Stem cell CD44, SNAIL, TWIST, MEK and mTOR expressions from EMT were found to be effective in the development of mCC. High expressions of CD44, mTOR and SNAIL were shown to be effective in the development of recurrence after metastasectomy.

In this study, it is determined that the high expressions of CD44, mTOR and SNAIL in primary colorectal tumors seem to be biomarker candidates to predict future mCC and even recurrence after metastasectomy in mCCs. For this purpose further studies is required.

Key Words: Liver metastasis, metastasectomy, signaling pathways, RT-PCR, colorectal cancer

GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK) dünyada en yaygın görülen gastrointestinal sistem tümörlerinden olup kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır. Takip süresi içerisinde KRK'ların yaklaşık %35-55 'inde senkron ya da metakron karaciğer metastazı (metastatik karaciğer kanserleri; mKK) görülmektedir. Bu olgularda metastazektomi ya da cerrahi rezeksiyon, mKK hastalarında en etkili tedavi yöntemidir. Ancak uygulanan bu cerrahi tedavi sonrası hastaların yaklaşık %50-70 'inde nüks oluşabilmektedir. Ayrıca bu hastalarda 5 yıllık sağ kalım %25-50 oranındadır. Klinikte, primer tümöre ait lenf nodu durumu, karaciğerdeki lezyon sayısı, preoperatif karsinoembriyonik antijen (CEA) seviyesi, mKK hastalarında bu kötü prognozu belirlemede önerilen parametrelerdir. Tıp alanında son dönemde elde edilen tüm gelişmelere rağmen metastaz gelişimi ile ilgili yeterli öncül belirteç belirlenememiştir.

Epitelyal Mezenkimal Tranzisyon (EMT) son yıllarda özellikle epitel kaynaklı tümörlerin metastaz oluşumunda etkili olan mekanizmalardan biri olarak görülmektedir. EMT'nin; PI3K, AKT, mTOR, RAS, MYC, HIF1, TGFB ve TP53 gibi birçok genetik ve epigenetik sinyal yolağını kullanarak, mKK oluşumuna yol açtığı savunulmaktadır. Bu mekanizma, normal dokuda, embriyogenez ve yara iyileşmesi sırasında epitelyal hücrelerin mezenkimal karakter yeteneği kazandığı biyolojik bir süreç olarak kabul edilmektedir. Tümör hücreleri, metastaz sürecinde bu mekanizmayı kullanarak, hücre-hücre adezyonu ve polariteyi de içeren farklılaşmış epitel özelliklerini kaybetmekte, migrasyon ve invazyon kapasitesi artmış, ekstraselüler matriks bileşenlerini fazla miktarda üreten ve apoptoza direnç gösteren kanser kök hücre yeteneklerine sahip mezenkimal hücre özellikleri kazanmaktadırlar. EMT sürecine giren hücreler zaman içerisinde kan damarlarına ulaşarak dolaşıma girebilmekte ve uzak organlara ulaşabilmektedirler. Uzak organa ulaşan hücreler tekrar epitelyal hücre özelliklerine dönerek metastaz sürecini tamamlamaktadırlar. Primer kolorektal tümörlerin karaciğere yaptıkları uzak

organ metastazını bu model üzerinden gerçekleştirdikleri düşünülmektedir. Ancak literatürde mKK tümörlerinde EMT çalışmaları daha çok in-vitro deneyler ile gösterilmekte olup hasta tabanlı araştırma sayısı sınırlıdır. Yapılan çalışmalarda EMT 'nin hangi sinyal yollarını etkileyerek tümörleri daha agresif davranmaya tetiklediği gösterilmektedir (1). EMT 'nin metastazektomi sonrası nüks üzerine etkisi ise bilinmemektedir.

Planlanan bu tez çalışmasında, mKK oluşumu ve gelişiminde rol oynayan sinyal yollarının ortaya çıkartılarak bu tümörlerin biyolojik davranışlarının öngörülmesi amaçlanmaktadır. Mevcut araştırmada epitel kökenli tümörlerin oluşumunda ve prognozunda ilişkili olabilen RAS, PIK3CA, P53, mTOR, VEGF sinyal yollarının ve EMT mekanizmasının incelenmesi hedeflenmektedir. Böylece mKK'ların kötü prognozunun altında yatan mekanizmalar aydınlatılarak bu tümörlerin takiplerinde kullanılacak moleküllerin belirlenmesine ve yeni tedavi seçeneklerinin oluşturulmasına katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

GENEL BİLGİLER

Kolorektal Kanser

Kolorektal kanseri (KRK), kalın bağırsak boyunca oluşan agresif bir gastrointestinal sistem tümörüdür (2). KRK, Dünya çapında tüm etnik kökenlerde kanser kaynaklı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olup Avrupa'da en sık rastlanılan ikinci kanserdir ve 1000.000' de 447 oranında görülmektedir (2,3). Sağlık bakanlığı 2014 verilerine göre KRK, Türkiye' de hem kadın hem de erkekler arasında en sık gözlenen üçüncü kanserdir. WHO'ya göre 2020 yılında KRK nedeni ile Dünya genelinde 935 bin kişi ölmüştür.

Kolorektal Kanselerde Karaciğer Metastazları

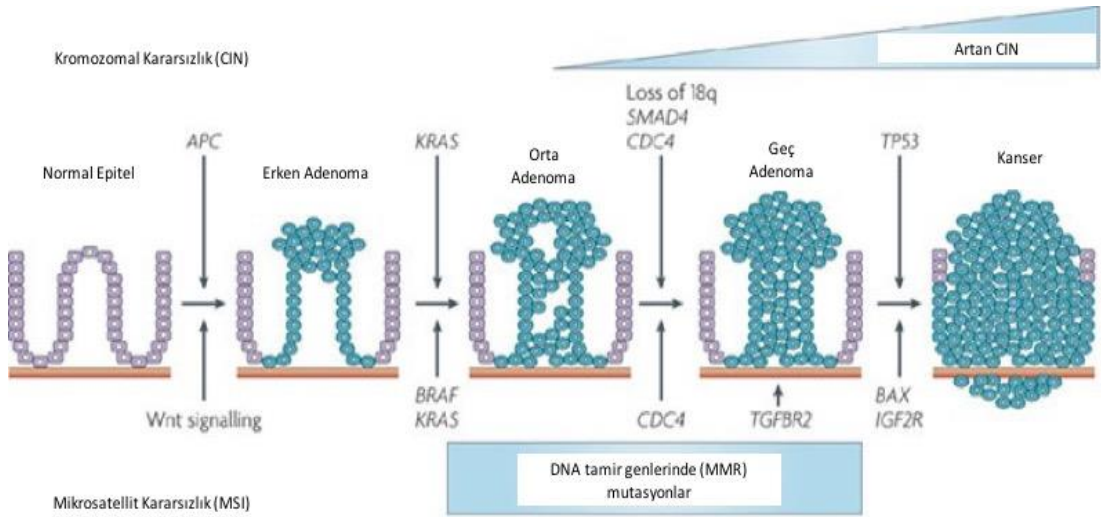
Karaciğer en yaygın görülen KRK metastaz bölgesidir. KRK olgularında tanı anında ya da takip süresinde karaciğer metastazı gelişmesi, KRK'ların başlıca ölüm sebepleri arasında yer almaktadır. KRK tanısı alan hastaların %50'sinden fazlasının yaşamları boyunca karaciğer metastazı oluşturma riski bulunduğu rapor edilmektedir. Tanı anında (senkron) metastaz oranı %15-%20, takip süresinde (metakron) metastaz oranı ise yaklaşık %42'dir. Bu metastaza sahip hastaların ise üçte ikisi ölümle sonuçlanmaktadır. Bu nedenle karaciğer metastazına sahip evre IV KRK tümörlerde tedavi, rezeksiyon ve sonrasında uygulanan kemo-radyo terapiden oluşmaktadır. Bazı iskandinav ülkelerinde karaciğer nakli dahi tedavide yer almaktadır (7-9).

Kolorektal Kanser Oluşumunun Moleküler Mekanizmaları

KRK, bir dizi genomik ve epigenomik değişiklik ile karakterize olan heterojen bir hastalıktır. Bu kanserlerin yaklaşık %15'i ailesel olup sadece %5'inde kanserleşme sürecini düzenleyen genlerde kalıtsal mutasyonlar

saptanmıştır(10). KRK %75-80 oranında sporadik formda oluşmaktayken, hastaların %20-25'inin ailesinde kolorektal kanser öyküsü bulunmaktadır. Bunların %5'i yüksek penetrant genlerde, adenomatous polipozis koli (APC) geninde (%1) ve mismatch repair (MMR) genlerinde (%3-5) bir germline mutasyondan kaynaklanırken, kalan kısmında aile öyküsü olmasına rağmen herhangi bir sendrom kategorize edilememektedir(11).

KRK'nın patogenizinde yer alan moleküler değişimler ilk olarak Fearon ve Vogelstein tarafından tanımlanmıştır. Bu modele göre KRK, onkogenlerde, tümör baskılayıcı genlerde ve DNA yanlış eşleşme genlerinde biriken mutasyonlar sonucunda meydana gelmektedir (12) (Şekil-1).



Şekil-1: Fearon ve Vogelstein Kolorektal kanser modeli (12).

Normal epitel hücresinde meydana gelen bir seri mutasyonlar sonucunda, epitel önce adenoma sonrasında ise kansere dönüşmektedir. Bu nedenle oluşturulan modele adeno-karsinoma sekansı adı verilmektedir. Model kromozomal kararsızlık (chromosomal instability: CIN) ve mikrosatellit kararsızlık (microsatellite instability: MSI) olmak üzere iki temel mekanizma ile açıklanmaktadır (13).

CIN, baskılayıcı veya standart yolak olarak da ifade edilmektedir. Fearon ve Vogelstein modeline göre Kolon adenokarsinomlarının %80-85'i bu mekanizma ile meydana gelmektedir. Bu süreçte ilk olarak 5q'da lokalize APC, 17p'de lokalize p53 ve 18q'da lokalize DCC/SMAD4 alel kayıpları

meydana gelmektedir. CIN mekanizması, bu kromozomal kayıplar ile birlikte gen amplifikasyonları ve translokasyonlarla da oluşabilmektedir (14).

Mikrosatellit kararsızlık ise KRK'ların oluşumunu açıklayan bir diğer mekanizmadır. Mikrosatellitler(MS), genomun belli bölgelerinde görülen kısa baz dizi tekrarlarıdır, bu yüzden Kısa Tandem Tekrar (Short Tandem Repeat: STR) olarak da bilinmektedir. MS, bir ya da birden fazla bazın çeşitli tekrarları ile oluşmaktadır. Bazı MS bölgelerinde üç bazın 10 tekrarı gözlemlenirken bazı bölgelerde 2 bazın 30 tekrarı saptanmaktadır. DNA replikasyonuna bağlı hatalar sonucunda MS bölgelerinde delesyonlar veya insersiyonlar meydana gelmekte, bu durum MSI olarak isimlendirilmektedir. MSI oluşumunda DNA tamirinde görev alan *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ve *PMS2* (MMR) genlerindeki kayıpların etkili olduğu bilinmektedir. Bu mekanizma, MMR genlerinde meydana gelen metilasyonlar ya da bu genlerin somatik mutasyonlar sonucu inaktivasyonları ile meydana gelmektedir (15).

Bununla birlikte KRK gelişiminde genetik mekanizmalar ile birlikte epigenetik mekanizmaların da rol oynadığı bilinmektedir. Epigenetik mekanizmalar aracılığı ile DNA baz diziliminde herhangi bir değişiklik meydana gelmeden, gen ifadesi düzenlenmektedir. Epigenetik değişimler DNA ya da RNA temelli olarak DNA promotör metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlama yapmayan RNA (ncRNA)'ların etkileri ile kromotinin yeniden düzenlenmesi ve transkripsiyon sonrası gen ifadesinin değişmesi gibi süreçler ile tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin düzensizliklerine sebep olarak tümörün gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadırlar (16-18).

Wnt/beta-katenin ve RAS KRK gelişiminden sorumlu temel sinyal yollarıdır. Wnt sinyal yolağından kilit protein APC'dir. 5q21'de lokalize olan APC geni 15 ekzondan meydana gelmektedir. Sporadik KRK'ların %60'ı APC mutasyonları sonucu aktif hale gelen Wnt sinyal yolağı nedeniyle oluşmaktadır. Wnt sinyal yolağında APC, Kazein kinazı 1 (CK1) ve Glikojen Sentaz Kinaz 3b (GSK3-b) ve AXIN'den oluşan yıkım kompleksi aracılığı ile Beta-katenin düşük sitoplazmik konsantrasyon altında tutulmaktadır. Wnt ligantı yokluğunda APC, GSK3b, CK1 ve Axin sitoplazmada bir araya gelerek yıkım kompleksi oluşturmaktadırlar. Bu kompleks sitoplazmada bulunan Beta-

katenin'i übikitinleyerek bu proteinin proteosomal yıkımını sağlamaktadır. Ortamda Wnt ligantı bulunduğu zaman ligant, hücre zarında yer alan Fzd ve LRP5/6 reseptör proteinlerini tanıyarak bu proteinlere bağlanmaktadır. Fzd ve LRP5/6 koreseptörlerine bağlı Wnt ligandları, Dvl-fzd kompleksinin oluşumunu ve LRP'nin GSK3b tarafından fosforilasyonunu tetiklemektedir. Bu fosforilasyon sonucunda bir scaffold protein olan Axin2'nin de reseptör ligand kompleksine katılmasını sağlar. Böylece sitoplazmadaki yıkım kompleksi dağılır ve Beta-katenin'in yıkımı sağlanamamaktadır. Sitoplazmada biriken Beta-katenin nükleus içerisine geçerek hücre proliferasyonunda etkili genlerin transkripsiyonunun artmasını teşvik ederek tümör oluşum sürecini başlatır. Wnt sinyal yolağı APC protein kaybı sonucu da aktif hale geçmektedir. APC'nin az olması ya da hiç olmaması durumunda sitoplazmada yıkıcı kompleks oluşmamakta, bunun sonucunda Beta-katenin degradasyonu sağlanamamaktadır (19).

Proto-onkogenler, hücrede sinyal uyarı iletiminde ve hücre büyümesinin kontrolünde rol oynamaktadırlar ve bu genlerin çeşitli nedenler ile aktivasyonları sonucunda hücre proliferasyonu artmaktadır. KRAS, 12p12.1'de lokalize bir proto-onkogen olup 21 kDa büyüklüğünde GTP-bağlanma proteini üretmektedir. KRAS proto-onkogeni, EGFR sinyalinin BRAF aracılıklı MAPK sinyal mekanizmasında yer alan bir moleküldür. KRAS mutasyonuna bağlı RAS aktivitesi, erken evre KKK tümörlerinin %35-42'sinde rapor edilmektedir. KRAS proteini GTP'ye bağlandığında aktif hale geçerek EGFR sinyal yolağı içerisinde yer alan RAS yolağı aracılığı ile birçok farklı süreçte görev almaktadır. RAS aktivitesi sonucunda mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) gibi birçok transdüksiyon sinyal yolları açık hale gelmektedir. *KRAS* geninin 2. ekzonunda meydana gelen kodon 12 ve 13, 3. ekzonunda meydana gelen kodon 61 nokta mutasyonları RAS aktivitesine neden olan en temel genetik değişimlerdir. Son zamanlarda, KRAS'ın, kolon epitelindeki hiperplastik büyümeyi teşvik ettiği bildirilmektedir. Aynı zamanda RAS aktivasyonu epitel hücre polaritesini düzenlemekte, KKK gelişimi sırasında birleşme aracılı hücre-hücre temaslarını azaltarak epitel hücrelerinin polaritelerini kaybetmelerini sağlamaktadır (20).

Bununla birlikte 18q kaybı da KRK'da önemli genetik bir olaydır. 18. kromozomun uzun kolunda meydana gelen delesyonlar KRK'ların %60'ında belirlenmektedir. Bu bölgede bulunan gen "Kolorektal Kanserde Silinmiş (*Deleted in colorectal carcinogenesis: DCC*)" olarak adlandırılmaktadır. DCC tümör baskılayıcı bir gen dir ve bu genin delesyonu kolorektal kanserlerin %70'inde ve ileri derecede displazi gösteren adenomların da yaklaşık olarak yarısında görülmektedir. Hafif displazi gösteren adenomlarda görülmemektedir. DCC, Netrin-1 ile etkileşerek Kaspaz 9 üzerinden apoptozu düzenlemektedir (21).

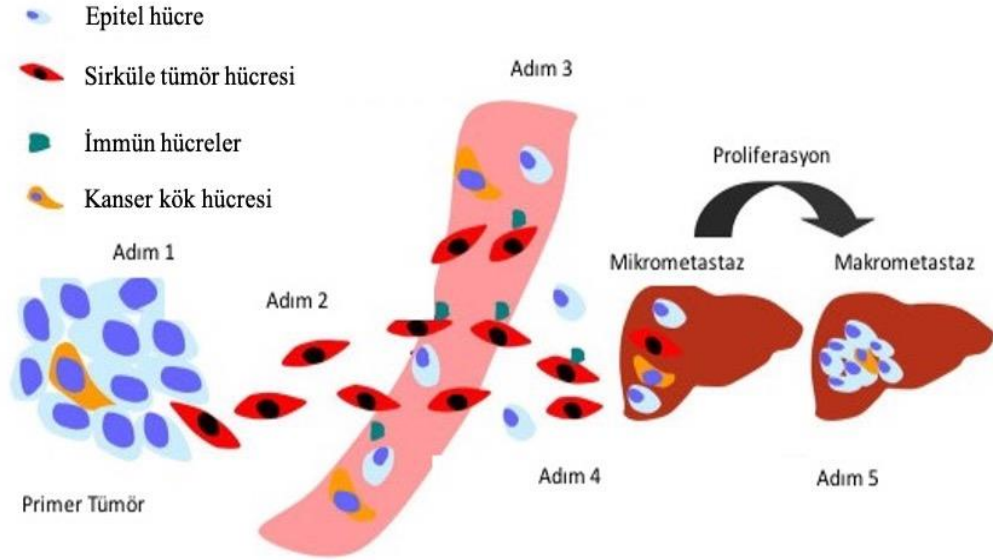
Ayrıca *DPC4/Smad4* ve *SMAD2*, 18q'da yerleşim gösteren ve KRK'da delesyona uğrayabilen diğer genlerdir. Bu genlerin proteinleri, hücre büyümesini kontrol eden TGF β sinyal yolağında görev almaktadırlar (22).

KRK başta olmak üzere birçok kanserde P53 kaybı önemli bir olay olarak değerlendirilmektedir. P53, 17p13.1'de lokalize tümör baskılayıcı gen olan *TP53* tarafından kodlanmaktadır. P53 proteini, çevresel veya onkogenik strese maruz kalan hücrelerin replikasyonu sırasında DNA onarımını kolaylaştırmak için G1 hücre döngüsü durmasını tetiklemektedir. Bu protein, DNA hasarı onarılamayacak kadar büyük olduğunda, apoptozu tetiklemede temel rol oynamaktadır. Tüm kanserler değerlendirildiğinde insan tümörlerinin % 50'den fazlasında p53 kaybı belirtilmektedir. *TP53* mutasyonu veya kaybı genellikle KRK'da adenomdan kansere geçişte meydana gelmektedir. Çalışmalarda *TP53* anormalliklerinin sıklığının lezyonun ilerlemesi ile arttığı vurgulanmaktadır. P53 kayıpları adenomların %4-26'sında, geç adenomların % 50'sinde, karsinomaların ise %50-75'inde gözlenmektedir (23).

Kolorektal Kanselerde Karaciğer Metastazının Moleküler Oluşum Mekanizmaları ve Metastazda Güncel Belirteçler

Kanser hücrelerinin primer dokudan ayrılıp uzak dokularda yeni koloniler oluşturması süreci, invazyon-metastaz kaskadı olarak tanımlanmaktadır. Bu süreç beş adımdan oluşur: kanser hücrelerinin primer

tümörü çevreleyen matrikse lokal invazyonu (Adım 1), tümör hücrelerinin dolaşım sistemine intravazasyonu (Adım 2), tümör hücrelerinin sistemik taşınması (Adım 3), tümör hücrelerinin uzak organ parenkimine ekstravazasyonu (Adım 4), uzak organların kolonizasyonu ve makroskopik tümörlerin oluşumu (Adım 5). Bu adımlardan bazılarının altında yatan biyoloji henüz tanımlanmamış olsa da, son zamanlarda birkaç mekanizma ortaya çıkmış ve istila-epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) mekanizmasının metastaz oluşumunun desteklenmesinde önemli roller oynadığı belirlenmiştir (24) (Şekil-2).



Şekil-2: Primer tümörden uzak organa metastaz süreci (24).

EMT, hücrelerin epitel özelliklerini kaybederek daha invaziv mezenkimal hücre özelliği kazanmalarıdır. EMT ile ilişkilendirilmiş çeşitli moleküler süreçler; transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, spesifik hücre yüzey proteinlerinin ekspresyonu, sitoskelet proteinlerinin yeniden düzenlenmesi, ekstrasüleler matriks bozucu enzimlerin üretimi ve spesifik ncRNA'ların ekspresyonlarında değişiklikler, şeklinde sıralanmaktadır (24).

KRK'dan karaciğer metastazı sırasında EMT süreci, hücreler arası etkileşimde görev alan E-kaderin proteini kaybı ile başlamaktadır. Epitelyal hücreler tarafından eksprese edilen bir transmembran protein olan E-kaderin, epitel hücre polaritesini korumada ve hücrelerin epitel durumlarını

sürdüremelerine izin veren hücre-hücre temaslarını stabilize etmede önemli bir rol oynamaktadır. E-kaderin ekspresyonunun aşağı regülasyonu, lenf nodu metastazı, ileri evre, zayıf farklılaşma ve vasküler invazyon ile ilişkilendirilmektedir. E-kaderin seviyelerinde bir azalmayı genellikle epitelyal olmayan dokularda bulunan bir adezyon molekülü olan N-kaderin düzenlenmesi izlemektedir. N-kaderin, fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR) sinyalini ve nükleer β -katenin aktivitesini güçlendirerek tümörün ilerlemesini desteklemektedir (25).

KRK'da karaciğer metastaz oluşumunda E-kaderin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleri doğrudan ve dolaylı baskılayıcılar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. SNAIL (SNAI1,2), ZEB (ZEB1,2), E12 / E47, Brachyury ve AP4 doğrudan E-kaderin promoterine bağlanan baskılayıcılarıdır. TWIST (TWIST1,2), FOXC2, TCF4, SOX2, OCT4, Nanog, PROX1, SIX1, PRRX1, HMGA1 ve Fra-1 birden fazla spesifik hedefe sahip olan ve E-kaderini dolaylı şekilde baskılayan transkripsiyon faktörleridir. Bununla birlikte Vimentin, MMP ve integrin hücre-bazal membran bozulmasında EMT sürecine katkı sağlayan proteinlerdir (26).

EMT süreci, tümör mikro ortamındaki çok sayıda hücre dışı sinyal tarafından tetiklenmekte ve ardından tüm hücre içi sinyal yolları ile bağlantı kurabilmektedir. Karaciğer metastazı oluşumu sırasında KRK oluşumunda yer alan tüm sinyal yollarının EMT'ye katkıda bulunduğu görülmektedir. EMT süreci ile ilişkilendirilen sinyal yolları ise, Wnt ve TGF-beta'dır (27). Bununla birlikte bu konuda çalışmalar devam etmektedir.

Son dönemde özellikle senkron mKK olan hastalarda, geleneksel tedavi düzenini tersine çeviren bir yaklaşım uygulanmaktadır. Bu tedavi seçeneğinde önce kemoterapi ile başlanmakta, ikinci olarak karaciğer cerrahisi yapılmakta son olarak da primer KRK cerrahisi uygulanmaktadır. Bunun amacı, metastatik hücrelerin uzak organda yerleşimlerinden sonra primer dokuya gönderdikleri sinyallerden dolayı metastatik kaskadın sürekli açık kalmasını engellemektir. Yani bu yaklaşım ile metastatik tümör odağının primer tümör için davetkar ve yer açan bir yaklaşım sergilemesinin önüne geçilmektedir, diyebiliriz. KRK'ların çoğu epitel kökenlidir ve tümör büyüyüp yayıldıkça tümör

mikroçevresi bileşimi değişmektedir. Bu mikroçevre, hücre dışı matrsten, kanserle ilişkili fibroblastlardan (CAF'ler), endotelial hücrelerden, bağışıklık hücrelerinden ve kanserin ilerlemesi için gerekli olan birçok çözümler faktörden oluşmaktadır. Tümör ve bitişik stromal dokular arasındaki etkileşim, tümörojenik sürecin önemli bir ayağıdır. Tümör hücrelerinin, dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF β)'nın salgılanması yoluyla normal fibroblastların CAF'lere dönüşmesini indükleyebildiği bildirilmektedir. Aynı zamanda, CAF'ler, kanser hücresi proliferasyonunu ve istilasını teşvik etmek için fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerini salgılayabilmektedir. Böylece primer tümör ve metastatik tümör arasındaki kaskat karaciğere metastaz yapan hücrelerden dolayı sürekli açık kalmaktadır. Güncel tedavi yaklaşımlarında bu metastatik kaskadı ortadan kaldırmak üzerine çalışılmaktadır (28).

KRK oluştuğundan sonra karaciğer metastaz sürecinde ise genetik ve epigenetik değişimlerin birlikte görev aldıkları görülmektedir (28). Tümör biyolojisi ve metastaz mekanizmalarının anlaşılmasında çok ilerleme sağlanmıştır, ancak özellikle KRK'da tümör hücrelerinin metastatik yolunu etkileyen faktörler hakkındaki bilgiler yetersiz kalmaktadır (29). Son çalışmalar ile kan bazlı belirteç adaylarının da metastatik lezyonların tanımlanması için kullanılabileceği vurgulanmaktadır (30,31). Plazma bazlı faktör CEA da yaygın olarak KRK prognozunu izlemek için kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu belirteç prognoz için yeterli değildir. Hala geliştirme aşamasında olmasına rağmen, dolaşımdaki yeni biyobelirteç adayları tanımlanmaktadır. Sirküle tümör hücreleri (CTC'ler), cfDNA, mikro-RNA (miRNA) ve eksozomlar gelişme potansiyeline sahip metastatik biyobelirteç adaylarıdır (30).

Metastaz oluşumu ile ilgili diğer bir belirteç adayı integrinlerdir. Lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen-1 (LFA-1), yapışma özelliği olan bağışıklık hücrelerinin enflamasyon sürecinde karaciğeri istila etmek için kullandıkları bir integrindir. Ancak son zamanlarda, bu integrinin KRK dahil solid tümörler

üzerinde de eksprese edildiği gösterilmiştir. İn vitro analiz ve bir in vivo fare modeli kullanılarak yapılan yeni bir çalışma; integrin aktivasyonu, yapışma ve sinyal verme için gerekli olan LFA-1'in β 2 alt biriminin azalmış ifadesinin, karaciğere metastaz gelişimini zorlaştırdığı saptanmıştır(31,32).

KRK'daki metastatik yayılmanın, kanser kök hücre belirteçlerinin farklı ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. KRK'da karaciğer metastazı, kanser kök hücre markerleri CD133, CD44 ve β -katenin ekspresyonu ile bağlantılıdır, oysa peritoneal karsinomatozda bu kök hücre markerlerinin ekspresyonu bulunamaz. Bu, peritoneal karsinomatozlu KRK'nin yayılması için gerekli kök hücre özelliklerinden yoksun olduğunu ve hastalığın klinik seyrini taşımasının muhtemelen lokal olarak agresif bir tümörün ileri evresi olarak yorumlanabileceğini gösterebilir. Peritoneal karsinomatozla ilişkili kök hücre belirteçleri hakkındaki bilgiler hala yetersiz olsa da, yakın zamanda karaciğer metastazı ile ilgili birkaç yeni belirteç tanımlanmıştır. Oct4 gen ekspresyonu yokluğu, karaciğer metastazı içermeyen sağkalım ile ilişkilidir ve Oct4-yüksek hücreler aktif olarak in vivo karaciğer metastazı oluşturur. Kök hücre belirteçleri Notch1 ve ALDH1, lenf nodu metastazı, ileri evre ve tümör nüksü ile ilişkilidir ve KRK'da bağımsız bir prognostik faktörü temsil eder (34-36). Özetle, kanser kök hücreleri güçlü bir göç ve istila kabiliyetine sahip gibi görünmektedir ve kök hücre belirteçlerinin bağımsız prognostik faktörler olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, organotropizmin bir parçası olarak kanser hücrelerinin farklı metastatik bölgelere dağılımı ve biyolojik özelliklerin sürdürülmesi de mikro ortam ve karmaşık bir çift yönlü mekanizmanın parçası tarafından kontrol edilmektedir.

Öte yandan mKK'larda R0 rezeksiyon sonrasında rekürrensın nedeni metastatik odağın yeniden aktivasyonu veya yeni metastaz mıdır? Metastatik ortamın rezeksiyon alanı dışına da taşabileceğini düşünebilir miyiz? Ya da metastaza komşu alan, primer tümör için davetkar bir ortam mıdır? gibi sorular akla gelmektedir.

KRK'daki klinik önemi ile ilgili olarak, AP4, SOX2 ve OCT4 baskılayıcıları karaciğer metastazı ile ilişkilendirilmiştir (34,36,37). Ayrıca, KRK

hastalarının%85'inin orta ila güçlü ifade gösterdiği, bastırıcı TWIST1'in aşırı ifadesi lenf nodu metastazı ve kötü sonuçla ilişkilidir. SNAI2'nin yukarı regülasyonu, güçlü vimentin ekspresyonu ile önemli ölçüde ilişkilidir ve hem SNAI2 hem de vimentin ekspresyonu, lenf nodu metastazı ve kötü prognoz ile ilişkilidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

GEREÇ

Kullanılan Aletler ve Cihazlar

+4 Soğutucu (Alaska, Türkiye)

-20 Derin Dondurucu (Vestel, Türkiye)

-80 Derin Dondurucu (Panasonic, Japonya)

Santrifüj (Nüve, Türkiye)

Mikrosantrifüj (Cleaver Scientific, İngiltere)

Soğutmalı Santrifüj (Labogene, Danimarka)

Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)

UV/Vis Spektrofotometre (Beckman Coulter, ABD)

Isıtıcı Blok (Cleaver Scientific, İngiltere)

20 Kuyulu Isıtıcı Blok (Techne, İngiltere)

Proflex PCR sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Step One Plus System Real-Time PCR (Applied Biosystem, ABD)

Fluoroskan Microplate Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, ABD)

0.5-10ul pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

10-100ul pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

20-200ul pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

100-1000ul pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Ethanol %99 HPLC Grade (Sigma Aldrich, ABD)

Methanol %99 HPLC Grade (Sigma Aldrich, ABD)

İzopropanol %99 HPLC Grade (Sigma Aldrich, ABD)

Ksilen (Sigma Aldrich, ABD)

RNeasy FFPE Kit(Qiagen, Hollanda)

High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Taqman Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, ABD)

TaqMan Non-coding RNA Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Taqman Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Paraformaldehyd (Sigma Aldrich, ABD)

YÖNTEM

Hasta Grubu

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalına 1997-2014 tarihleri arasında başvuran hastalardan çalışmaya uygun 85 vaka seçilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların ailelerinde kanser öyküsü bulunmamaktadır. Tüm vakalar sporadik KRK tümörlere sahiptir. Seçilen grupta, ameliyat öncesi kemoterapi ve radyoterapi görmeyen hastalar yer almaktadır. Araştırmaya dahil edilmesi planlanan hastaların normal ve tümör doku materyallerinin temini; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu 'nun 2019-6/35 no 'lu kararı ile uygun bulunduktan sonra, bu hastalara ait tümörü ve normal dokuyu en iyi temsil eden parafin bloklar Patoloji Anabilim Dalı arşivinden elde edildi. Hastalara ait klinik özellikler ise Genel Cerrahi ve Patoloji Anabilim Dalı arşivlerinden elde edildi.

Hasta Seçim Kriterleri,

1. Primer tümörü kolon ya da rektum kanseri olup metastatik karaciğer tümör tanısı almış olması
2. R0 Metastazektomi uygulanmış olması
3. Neoadjuvan tedavi almamış olması.

Hasta Ret Kriterleri,

1. Rezeksiyona uygun olmayan metastatik karaciğer tümörüne sahip olması
2. Primer tümörün kolorektal dışı olması
3. Neoadjuvan tedavi almış olması.

Ameliyat sonrası hastalığın tekrarlaması olarak tanımlanan nüks ve metastaz varlığını tespit etmek için hastaların kayıtları, tanı sonrası en az 5 yıllık süre ile incelendi. Nüks oluşumuna kadar geçen süre hastaliksız sağ kalım olarak ifade edildi. Lokal ilerleme ve uzak metastaz durumu bilgisayarlı tomografi/manyetik rezonans görüntüleme cihazları ile radyolojik olarak değerlendirildi. Periyodik olarak fiziksel muayene, rutin kan analizleri ve

karaciğer fonksiyon testleri yapılmış olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastaların, hastalıklı ve hastalısız ortalama yaşam süreleri hesaplandı. Elde edilen klinik verilerden yararlanılarak hastalar, nüks, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz varlığına göre gruplara ayrıldı. Bununla birlikte hastaların adjuvant tedavileri hastane bilgi sisteminden elde edildi. Karaciğer metastazlarında 5FU birinci basamak adjuvant kemoterapi olarak uygulanmaktadır. Bu molekül bir urasil analogudur ve DNA ile RNA'nın yapısına girerek nükleik asitlerde kırıklar meydana getirmektedir. Böylece kanser hücrelerinin apoptoza gitmesi planlanmaktadır. Mevcut tez çalışmasında değerlendirilen ve adjuvant tedavi alan hastaların tamamına 5FU-bazlı kemoterapi uygulanmıştır.

Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden RNA Elde Edilmesi

Ameliyat sonrası çıkartılarak formalin ile fikse edilip parafin içerisine gömdürülen ve patolog tarafından değerlendirilen dokular patoloji arşivinden temin edildi. Normal ve tümör doku olarak tanımlanmış hastaya ait parafin blok için ependorf tüpler oluşturuldu ve parafin bloklardan 0.2-0.4 cm kesilerek bu tüpler içerisine alındı. Materyaller, BIOstic (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA) ile 2 kez muamele edilerek parafinden arındırıldı. BIOstic ile doku üzerindeki parafin çözdürüldükten sonra materyaller, %100-%70 ve %40 'lık alkol aşamalarından geçirildi ve alkol oda ısısında uçuruldu. Bu aşamalardan sonra 85 hastaya ait tümör doku ve 12 hastaya ait normal dokudan, parafin bloktan RNA izolasyonuna uygun ticari kit (Qiagen RNeasy FFPE kit) kullanılarak prosedüre uygun şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Elde Edilen RNA'ların Miktar ve Kalite Tayini

Elde edilen RNA 'ların miktarı ve kalitesi NanoDrop 2000 Spektrometre (Thermo scientific, Wilmington, DE, USA) cihazı kullanılarak ölçüldü. RNA örneklerinin 260 ve 280 nm 'deki dalga boylarında yapılan ölçümleri ve bu

dalga boylarından elde edilen değerlerin birbirlerine olan oranları, miktar ve kalite konusunda bilgi verdi.

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği göstermektedirler. Bu nedenle 260 nm 'de ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng/μL veya μg/mL düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. RNA 'nın konsantrasyonunun saptanmasında kullanılan spektrofotometrik yöntemler DNA 'nın spektral analizi ile tamamen aynıdır. Sadece tek zincirli RNA 'nın miktarının belirlenmesinde kullanılan formül farklıdır.

Total RNA (ng/μl) = 260 nm 'deki absorbans x 40 x Dilüsyon Faktörü

RNA molekülleri için 1 optik dansitenin 40 μg/mL 'ye karşılık geldiği bilinmektedir. Bununla birlikte 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Proteinlerde bilindiği gibi 280 nm 'de absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle 280 nm 'de ölçülen bir değerdeki artışı A260/A280 oranında düşmeye neden olur. İzole edilen total RNA örneklerinin saflığından bahsetmek için bu oran 1.8-2.00 arasında olmalıdır.

RNA'lardan cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA 'nın 5 ng 'ProtoScript M-MuLV First Stand cDNA Synthesis Kit 'i kullanılarak komplementer DNA (cDNA) elde edildi. Çalışılması hedeflenen her bir örnek için 0,2 μl 'lik PCR tüpü içerisine Tablo-1'de verilen malzemelerden reaksiyon karışımı oluşturuldu. Elde edilen miks pipetaj yapılarak karıştırıldı ve santrifüje alınarak spin atıldı. PCR tüpü içerisindeki miks, 37°C 'de 2 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen cDNA 'lar üzerine reaksiyon karışımı bulunan her bir PCR tüpüne 90 μl dH₂O ilave edilerek karıştırıldı ve ürünler bir sonraki aşamaya kadar -20°C 'de saklandı.

Tablo-1: cDNA sentezi için oluşturulan reaksiyon karışımı.

Bileşenler	1 Örneklik Reaksiyon
RNA	50 ng-200 ng (0.5 µg- 2 µg)
M-MuLV Enzyme Mix (10X)	3.5 µl
M-MuLV Reaction Mix (2X)	7.5 µl
Random Primer (60 µM)	2.5 µl
Nucleas-free H ₂ O	Toplam hacim 20.0 µl olacak şekilde dH ₂ O ile tamamlanır

Real-Time PCR ile mRNA Ekspresyon Analizleri

mRNA ekspresyonlarının Ct değerleri, LightCycler480II cihazının veri tabanından yararlanılarak elde edildi. Eşik değer (Threshold) olarak tanımlanan CT değeri, floresan ışımada (ΔR_n) artışın başladığı ilk siklusu ifade eder. Rn(+), yüklenen örneğin reaksiyona giren tüm komponentlerin floresan emisyonu, Rn(-) ise negatif kontrolün ve reaksiyonu gerçekleşmeyen örneklerin floresan emisyonu olarak tanımlanmaktadır. ΔR_n , Rn(+) ve Rn(-) arasındaki fark olup, CT değerinin hesaplanmasında kullanılan temel göstergedir. Çalışmada, housekeeping gen olarak kullanılan beta-aktin geninin ortalama Ct değeri belirlenerek PCR Array 'den elde edilen verilerin normalizasyonu yapıldı.

İstatistiksel Analiz

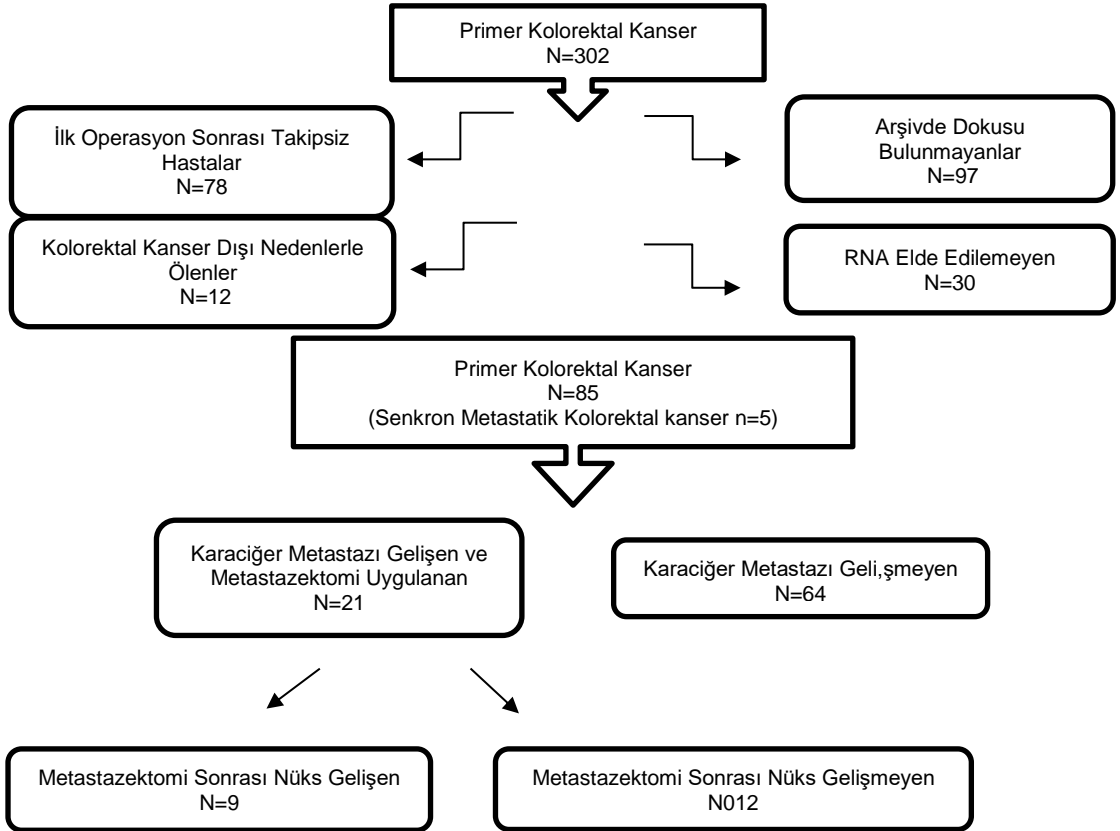
mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimleri inceleyebilmek için öncelikle LightCycler 480 II cihazının veri tabandan, yüklenen örneklerin Row Data ve CT değerleri elde edildi. Hastalar, klinik özelliklerine göre gruplara ayrıldı ve Sabioscience sitesinde yer alan PCR Array Veri Analizi sayfasına yüklendi.

Web tabanlı Sabiosciences PCR-Data Analiz (RT2 profiler PCR array data analysis version 3.5) programından yararlanılarak, evreler arasında miRNA ekspresyon düzeyindeki değişimleri ifade eden kat değişimi (fold

change) grafikleri ve değerlendirilen gruplara göre mRNA 'ların hangilerinin yüksek eksprese (up-regüle) hangilerinin düşük eksprese (down- regüle) olduğunu gösteren Clustrogram görüntüsü oluşturuldu. Sabiosciences PCR-Data Analiz sisteminde 2 'deltact değerlerinden Student T testi yapılarak her bir mRNA 'nın p değeri belirlendi. Sonuçlar % 95 'lik güven aralığında ve anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi. mRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların, hastaların klinik özellikleri ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymak için ise Sabiosciences PCR-Data analiz programından yararlanıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda, 1997-2014 yılları arasında KRK tanısı almış, operasyon öncesi radyoterapi ya da kemoterapi almamış, en az 5 yıllık takibi olan, hasta seçim ve red kriterlerine uygun, patoloji arşivinde parafine gömülü dokusu bulunan ve materyalinden kaliteli RNA elde edilebilen, 85 hasta değerlendirildi. Bu hastaların akış şeması şekil 3'te verildi.



Şekil 3:Çalışmaya dahil olan hastaların akış şeması

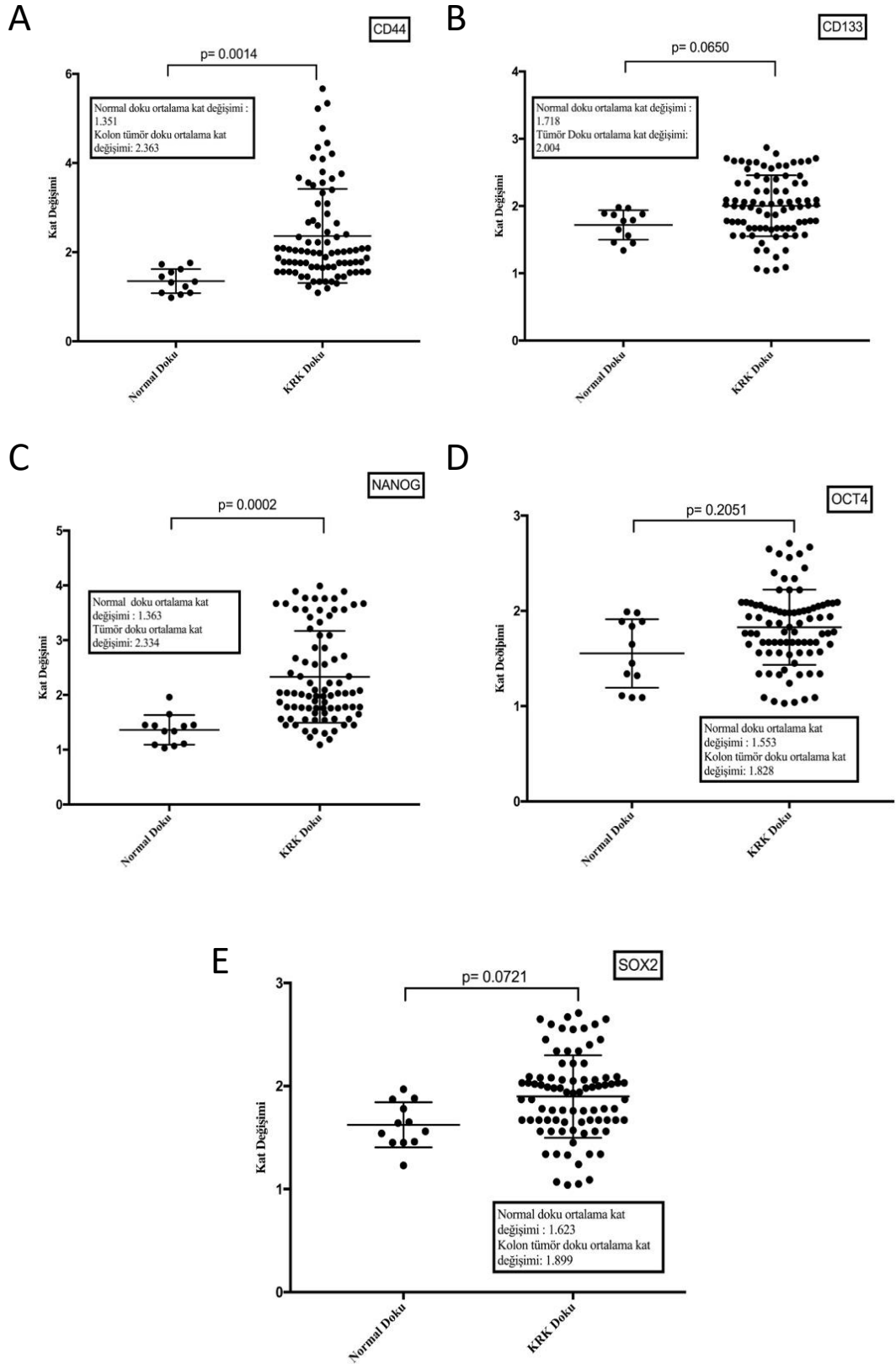
Hastaların yaş aralığı 38-67 arasında olup ortalama yaş 54 olarak belirlendi. Çalışmaya dahil edilen hastaların 38 'i erkek, 47 'si kadındı. 16 vakada primer tümörün rektumda, 69 vakada ise kolonda lokalize olduğu saptandı. 21 hastada müsinöz komponent varlığı belirlendi. 36 hastada lenf nodu metastazı belirlendi. Seçilen hastaların en az beş yıllık kayıtları incelendi ve 21 hastada karaciğere metastazı gelişmiş olduğu görüldü. Değerlendirilen hastaların klinik ve patolojik özellikleri Tablo-2 'de verildi.

Tablo-2: Hastalara ait klinik özellikler

Parametreler	Hasta Sayısı (%)	Parametreler	Hasta Sayısı (%)
Yaş		Müsinöz Komponent	
30-40	4 (%4.7)	Yok	64 (%75.3)
40-50	33 (%38.8)	Var	21 (%24.7)
50-60	25 (29.4)	Tümör Lokalizasyonu	
60-70	23 (%27.1)	Kolon	69 (%81.2)
Cinsiyet		Rektum	16 (%18.8)
Kadın	47 (%55.3)	Evre	
Erkek	38 (%44.7)	I	4 (%4.7)
Tümör Çapı		II	16 (%18.8)
<3	36 (%42.4)	III	60 (%70.6)
≥3	49 (%57.6)	IV	5 (%5.9)
Lenf Nodu Metastazı		Metastaz Durumu*	
Yok	49 (%57.6)	Yok	64 (%75.3)
Var	36 (%42.4)	Var	21 (%24.7)

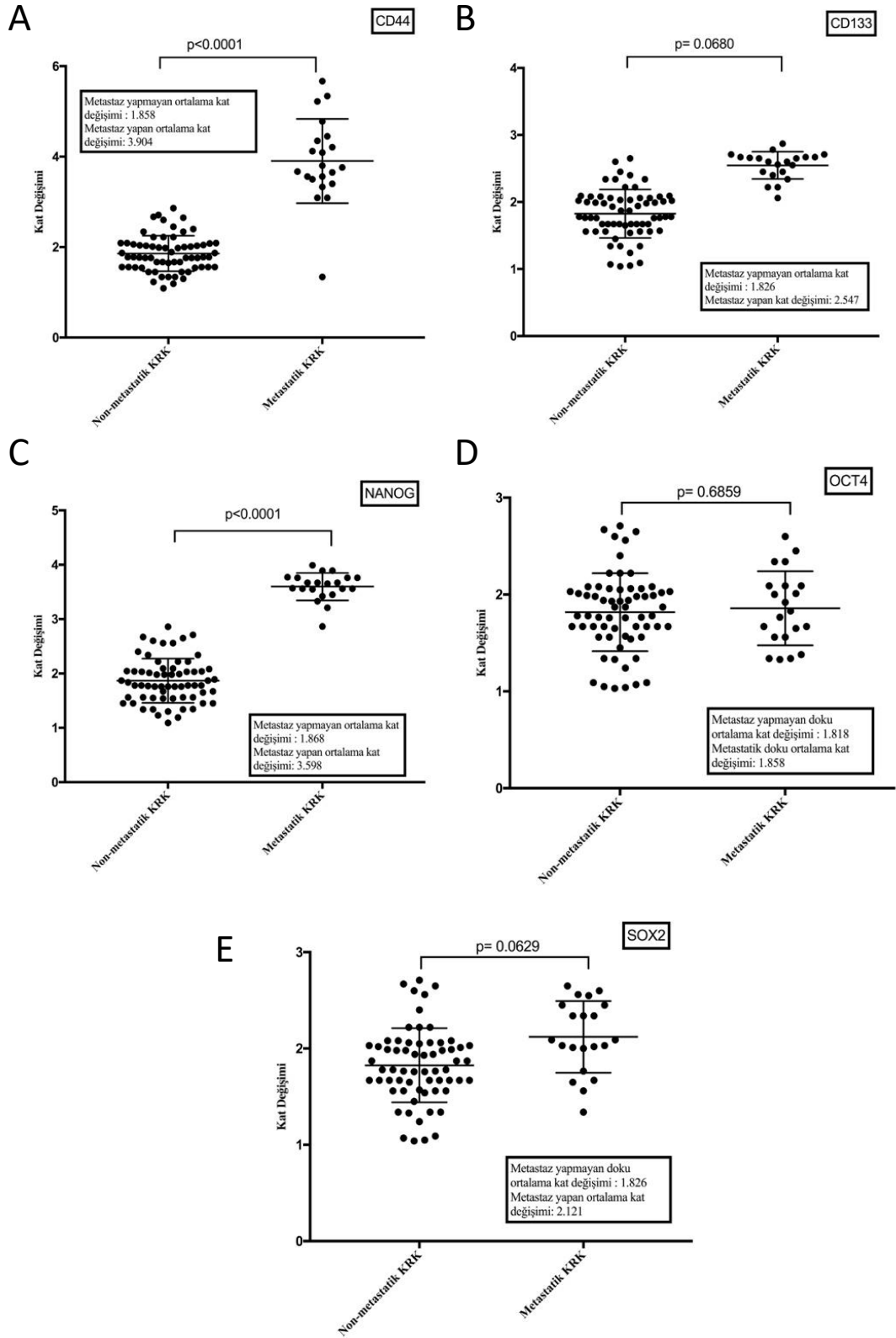
* Takip süresi içerisinde karaciğer metastazı yapanlar

İlk olarak 85 KRK dokusunda kanser kök hücre belirteçlerinden *CD133*, *CD44*, *SOX2* ve *NANOG* ekspresyon profilleri incelendi. Kontrol olarak 12 kolon normal dokusu kullanıldı. Normal doku ile karşılaştırıldığında, KRK tümörlerinde, *CD133*, *OCT4* ve *SOX2* mRNA ekspresyonlarında istatistiksel bir değişim gözlenmezken, *CD44* ve *NANOG* ekspresyonlarında KRK tümörlerinde anlamlı artış belirlendi (P= 0.0650, P= 0.2051, P= 0.0721, P= 0.0014 ve P= 0.0002; sırasıyla). Bu mRNA'ların ekspresyon değişimleri Şekil-4'te ifade edildi.



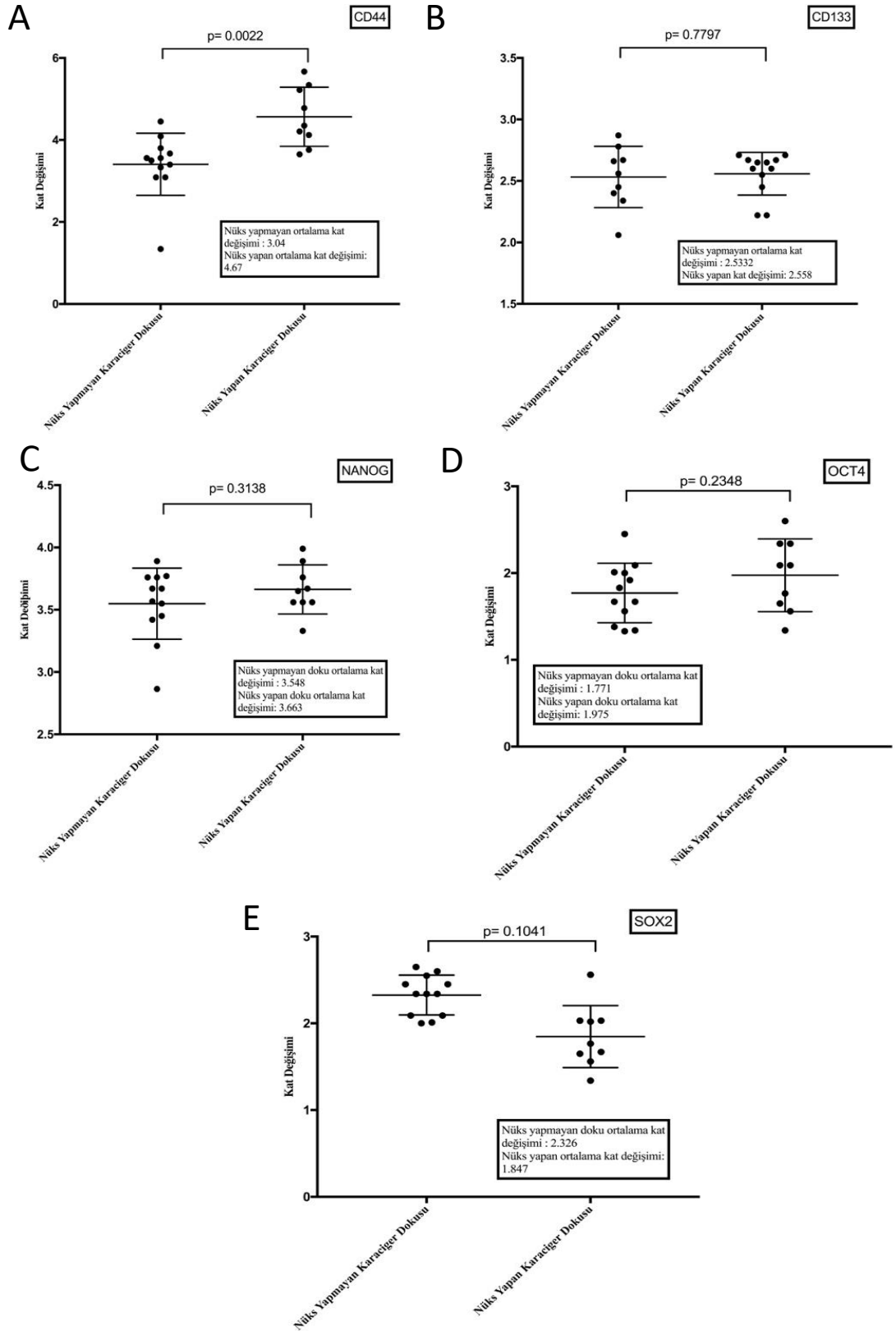
Şekil-4: Normal kolon dokusu ile karşılaştırıldığında, KRK tümörlerinde kök hücre belirteçlerinin ekspresyon profilleri. (A) CD44, (B) CD133, (C) NANOG, (D) OCT4 ve (E) SOX2. CD 44 (A) ve NANOG (C) ekspresyonları KRK'da normal dokuya göre daha yüksek belirlendi.

Takip süresi içerisinde karaciğer metastazı gösteren 21 KRK tümörü, bu süre içerisinde metastaz gelişimi belirlenmeyen 64 KRK dokusu ile karşılaştırıldığında, *CD133*, *OCT4* ve *SOX2* mRNA ekspresyonlarında yine anlamlı bir farklılık bulunmazken, *CD44* ve *NANOG* ekspresyonlarında karaciğer metastazı saptanan dokularda anlamlı artış belirlendi (Şekil-5, P=0.0680, P= 0.6859, P= 0.0628, P< 0.001 ve P< 0.0001; sırasıyla).



Şekil-5: Takip süresi içerisinde karaciğer metastazı belirlenen (n=21) ve belirlenmeyen (n=64) KRK tümörlerinde (A) CD44, (B) CD133, (C) NANOG, (D) OCT4 ve (E) SOX2 mRNA ekspresyon profilleri. Metastaz yapan 21 tümörde, primer tümör dokusundan metastaz yapmayanlara göre CD44 (A) ve NANOG (C) gen ekspresyonlarında artış gözlemlendi.

Metastatik karaciğer tümörleri (n=21), takip süresi içerisinde nüks eden (n= 9) ve nüks etmeyen (n=12) şeklinde iki gruba ayrıldığında değerlendirilen tüm kök hücre belirteçlerinden sadece CD44 ekspresyonunda anlamlı artış belirlendi (P=0.022). Bu hasta gruplarında kök hücre belirteçlerinin ekspresyon değişimleri Şekil-6'da ifade edildi.



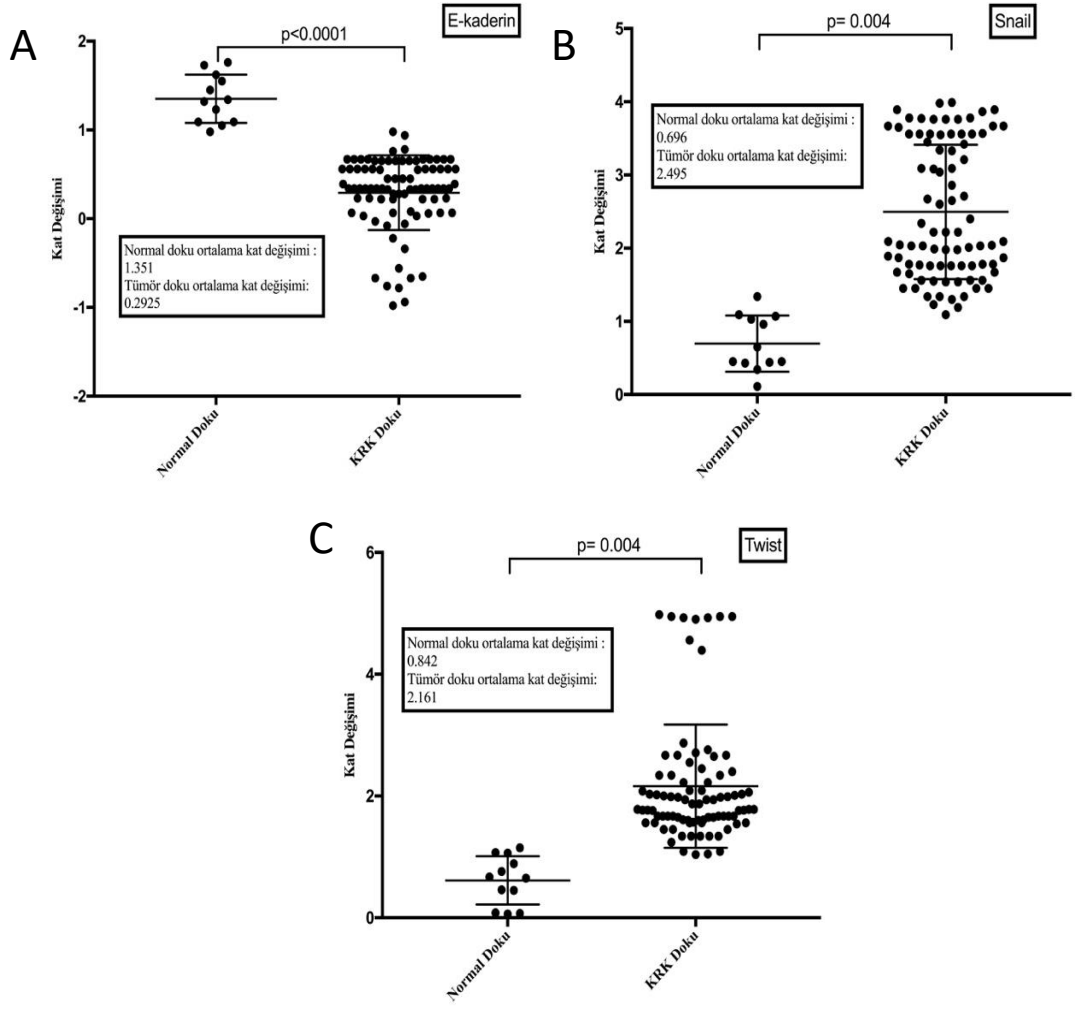
Şekil-6: Nüks yapan ve yapmayan karaciğer tümörlerinde (A) CD44, (B) CD133, (C) NANOG, (D) OCT4 ve (E) SOX2 mRNA'larının ekspresyon değerleri. mKK'da metastazın cerrahi tedavisi sonrası nüksünde, primer KRC tümöral doku örneklerinde, sadece CD44 ekspresyonu farklı idi.

KRK'dan karaciğer metastaz oluşum sürecinde EMT durumunu incelemek için *VIMENTIN*, *E-KADERIN*, *N-KADERIN*, *TWIST*, *SNAIL*, *SLUG* ve *MMP-9* mRNA'larına ait ekspresyon profilleri RT-PCR yöntemi ile analiz edildi. İlk olarak 12 normal kolon dokusu ile 85 KRK dokusunda bu belirteçler incelendi. Normal doku ile karşılaştırıldığında KRK dokularında *VIMENTIN*, *N-KADERIN*, *SLUG* ve *MMP-9* ekspresyonlarında istatistiksel olarak bir anlamlılık belirlenmezken, *E-KADERIN* ekspresyonununun 4.3-kat azaldığı, *TWIST* ve *SNAIL* ekspresyonlarının ise sırası ile 2.6-kat ve 3.9-kat arttığı saptandı (P= 0.0585, P=0.0621, P=0.0593, P=0.0762, P= 0.0001, P= 0.0042 ve P=0.0012; sırasıyla). EMT belirteçlerinin normal dokuya göre KRK dokularındaki $2^{(-\text{Avg.}(\Delta\text{Ct}))}$ değerleri ve ekspresyon profilleri Tablo-3'te verildi. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan *E-KADERIN*, *TWIST* ve *SNAIL*'in normal doku ile karşılaştırılarak bulunan KRK dokularındaki ekspresyonları Şekil-7 ve Şekil-8'de ifade edildi.

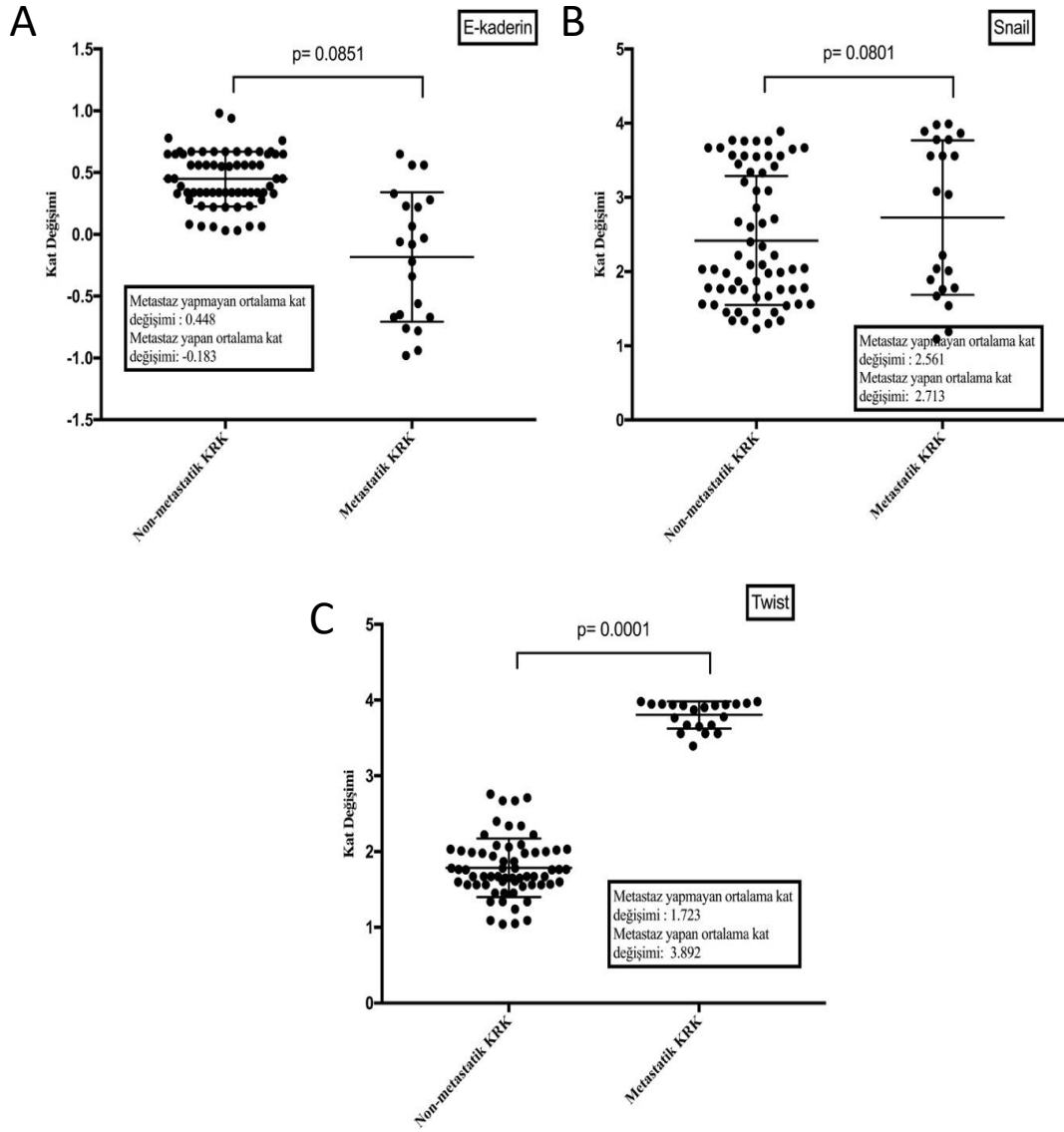
Tablo-3: Normal doku ile karşılaştırıldığında KRK tümörlerinde EMT belirteçlerinin ekspresyon profilleri.

mRNA	$2^{(-\text{Avg.}(\Delta\text{Ct}))}$		Kat Değişimi	P Değeri
	Normal Doku	KRK Doku		
VIMENTIN	0.076	0.164	2,1	0.058
E-KADERIN	0.192	0.045	4,3	0.001
N-KADERIN	0.025	0.031	1,2	0.062
TWIST	0.067	0.173	2,6	0.046
SNAIL	0.021	0.082	3,9	0.004
SLUG	0.037	0.044	1,2	0.059
MMP-9	0.021	0.034	1,6	0.076

RT2 profiler PCR dizi veri analizi bağımsız örnek T-testi ve SPSS 'de ki-kare testi ile değerlendirilmiştir.*p < 0.05'ten küçük değerler kalın harf ile yazılmıştır.

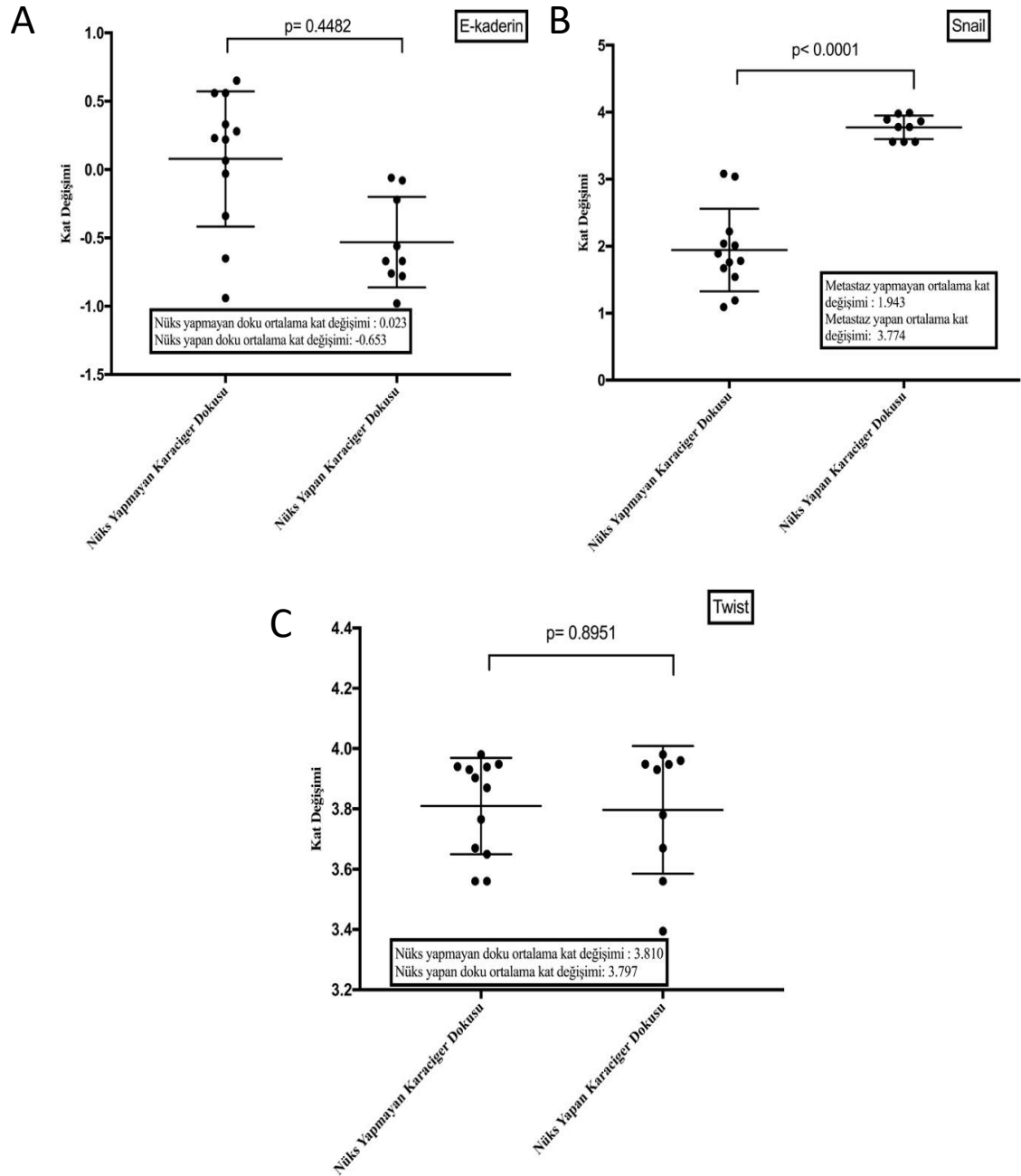


Şekil-7: Normal doku ile karşılaştırıldığında KRK dokularında istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon değişimi gösteren (A) E-KADERIN, (B) SNAIL ve (C) TWIST ekspresyonları.



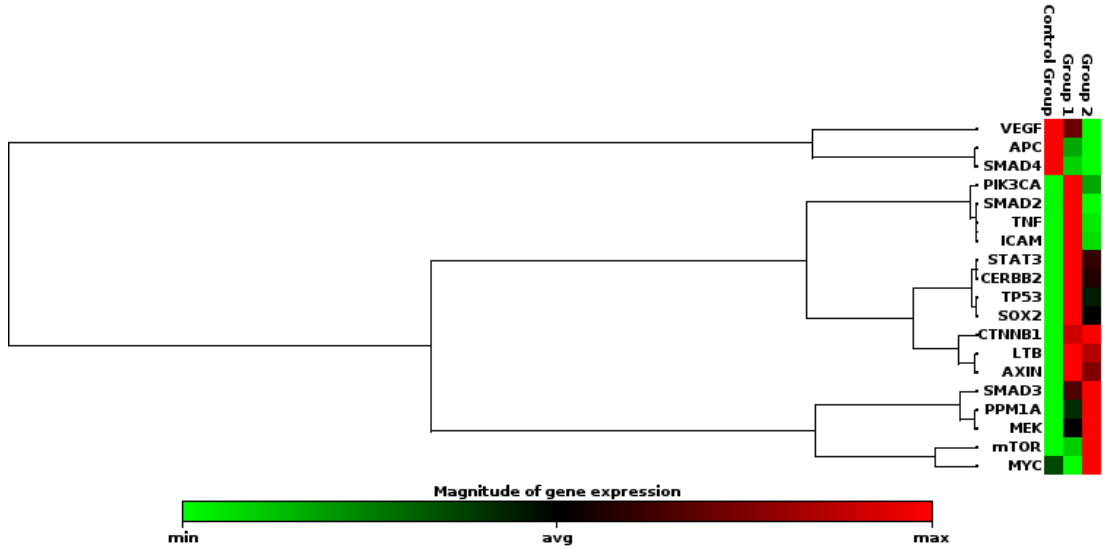
Şekil-8: Takip süresi içerisinde karaciğer metastazı belirlenen (n=21) ve belirlenmeyen (n=64) primer KRK tümörlerinde (A) E-KADERIN, (B) SNAIL, ve (C) TWIST mRNA ekspresyon profilleri. TWIST mRNA ekspresyonu metastatik KRK'da yüksek bulundu.

Metastatik karaciğer tümörleri (n=21), takip süresi içerisinde nüks eden (n= 9) ve nüks etmeyen (n=12) şeklinde iki gruba ayrıldığında ise SNAIL ekspresyonunda nüks etmeyen karaciğer dokularına göre nüks eden grupta 2-kat artış belirlendi (P<0.0001). Bu hasta gruplarında *E-KADERIN*, *SNAIL* ve *TWIST* mRNA'larının ekspresyon değişimleri Şekil-9'da ifade edildi.



Şekil-9: Nüks yapan ve yapmayan karaciğer tümörlerinin primer KRK'lardaki (A) E-KADERIN, (B) SNAIL ve (C) TWIST mRNA'larını ekspresyon değerleri. SNAIL mRNA ekspresyonu nüks gelişen mKK olgularında yüksekti (C)

Metastaz ve metastazektomi sonrası nüks sürecinde PI3K, AKT, mTOR, RAS, MYC, HIF1, TGFB ve TP53 sinyal yolaklarının kesişim noktalarında yer alan APC, AXIN, P53, MYC, TNF, PIK3CA, mTOR, VEGF, SOX2, CERBB2, SMAD4, SMAD2, LTB, ICAM, PPH1A, MEK, STAT3' ün ekspresyonları mRNA düzeyinde analiz edilerek sinyal yolaklarının aktiviteleri incelendi. Değerlendirilen 19 mRNA arasından MEK, mTOR, SMAD3 ve STAT3 ekspresyonları normal dokuya göre tümör dokuda yüksek ekspresyon gösterdi. mRNA'ların ekspresyon profilleri Şekil-10'da clustergram grafiği olarak gösterildi. Belirteç adaylarının ekspresyon profilleri ise Tablo-4'te ifade edildi.



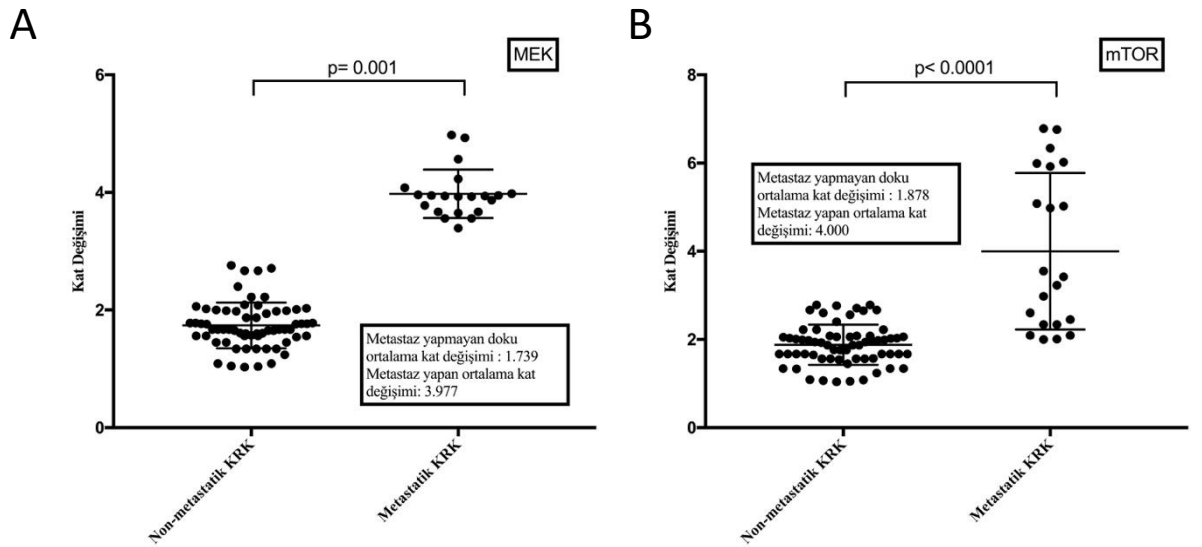
Şekil-10: Clustergram analizi. *Control group: Normal kolon dokusu (n=12), Group 1: Metastaz yapmayan KRK (n= 64), Group 2: Metastaz yapan KRK (n=21).

Tablo-4: Normal doku ile karşılaştırıldığında KRK tümörlerinde farklılık gösteren mRNA'lar.

mRNA	2 ^{^(-Avg.(Delta(Ct))}		Kat Değişimi	P Değeri
	Normal Doku	KRK Doku		
MEK	0.023	0.082	3,56	0.0023
mTOR	0.063	0.156	2,47	0,0001
SMAD3	0.092	0.198	2,15	0.0045
STAT3	0.192	0.449	2,34	0.0234

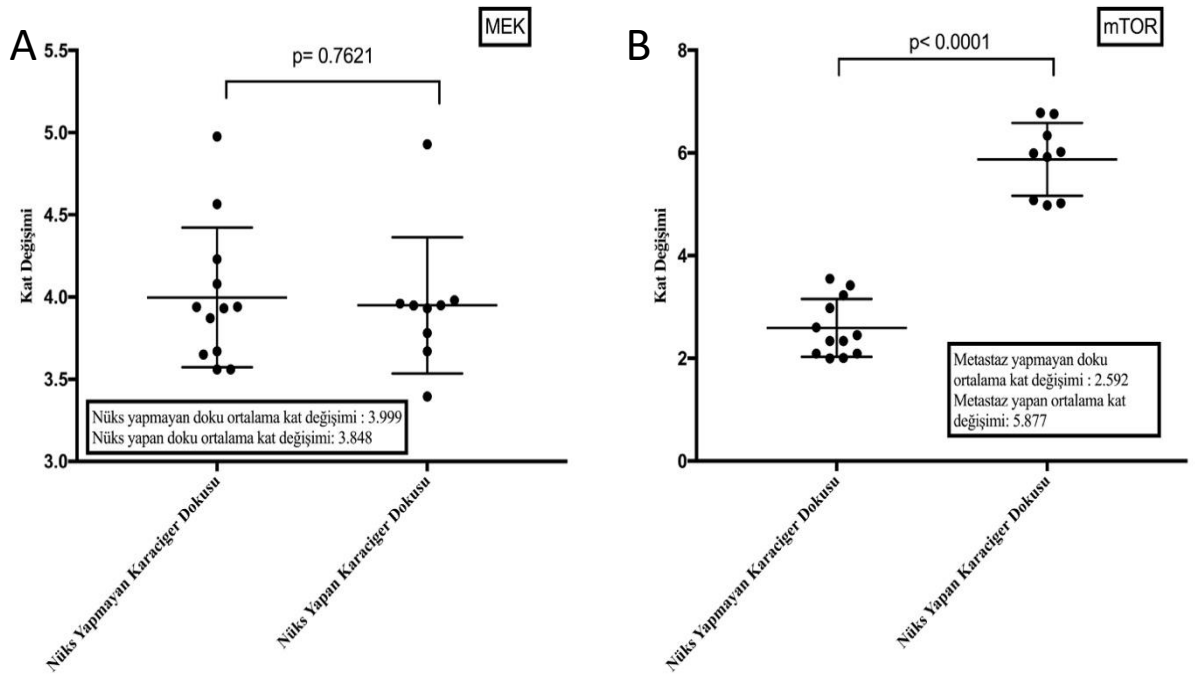
RT2 profiller PCR dizi veri analizi bağımsız örnek T-testi ve SPSS 'de ki-kare testi ile değerlendirilmiştir.*p < 0.05'ten küçük değerler kalın harf ile yazılmıştır.

Takip süresi içerisinde karaciğer metastazı gösteren 21 KRK tümörü, bu süre içerisinde metastaz gelişimi belirlenmeyen 64 KRK dokusu ile karşılaştırıldığında, SMAD3 ve STAT3 ekspersyonlarında anlamlı bir değişim belirlenmedi. Bununla birlikte metastaz yapan KRK dokularında MEK ekspresyonu 2.3-kat, mTOR ekspresyonu ise 2.2-kat arttı (P= 0.001, P<0.0001; sırasıyla). mKK'larda farklılık gösteren MEK ve mTOR ekspresyonları Şekil-11'de ifade edildi.



Şekil-11: Takip süresi içerisinde karaciğer metastazı belirlenen (n=21) ve belirlenmeyen (n=64) KRK tümörlerinde (A) MEK ve (B) mTOR mRNA'larının primer KRK'lardaki ekspresyon profilleri.

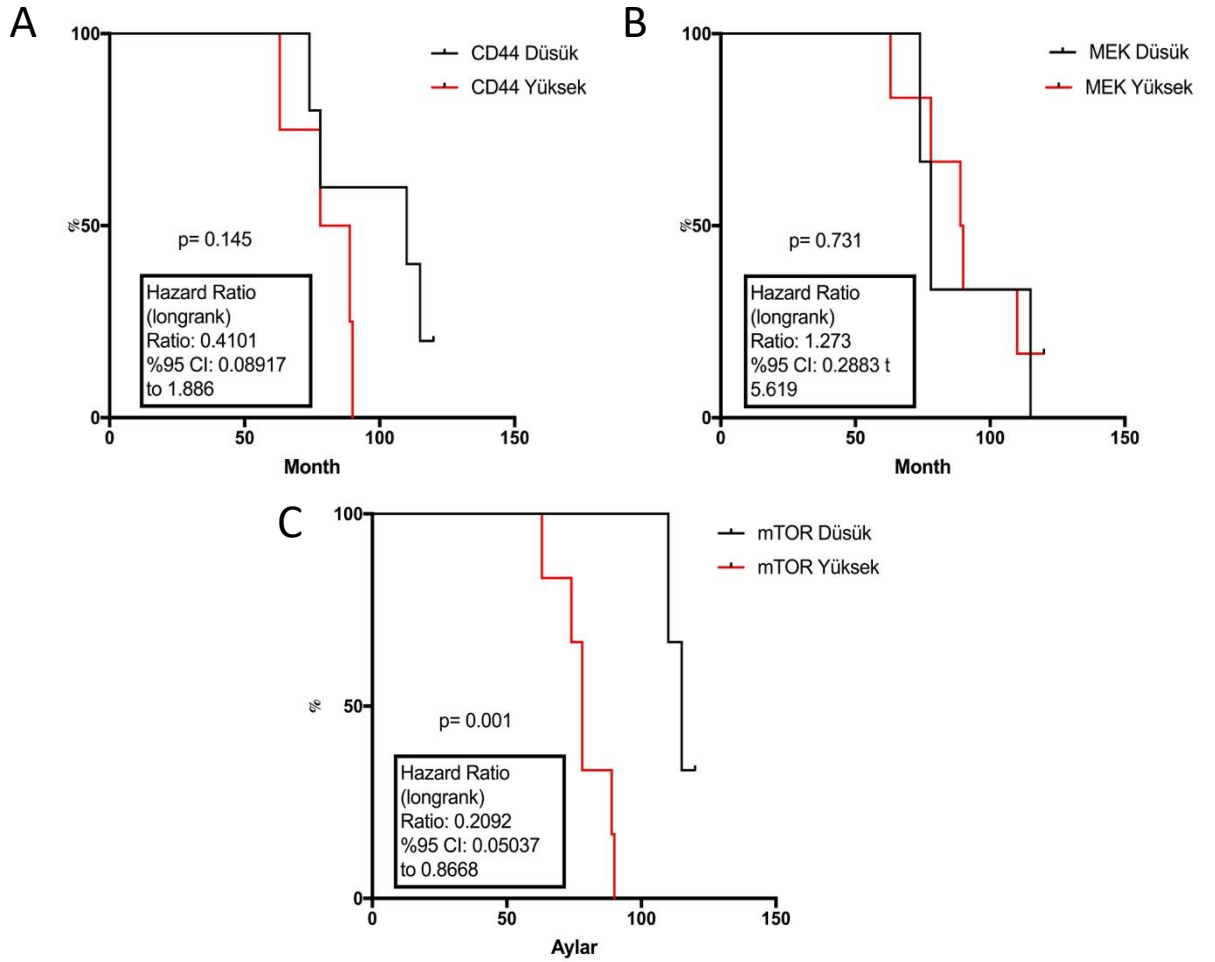
Metastatik karaciğer tümörleri (n=21), takip süresi içerisinde nüks eden (n= 9) ve nüks etmeyen (n=12) şeklinde iki gruba ayrıldığında ise bu iki mRNA'dan sadece mTOR'un ekspresyonunda nüks etmeyen karaciğer dokularına göre nüks eden grupta istatistiksel olarak anlamlılık belirlendi (Şekil-12; P<0.0001).



Şekil-12: Nüks yapan ve yapmayan karaciğer tümörlerinde (A) MEK ve (B) mTOR mRNA'larını primer KRK'lardaki ekspresyon değerleri. (Primer KRK hücrelerinden çalışıldı)

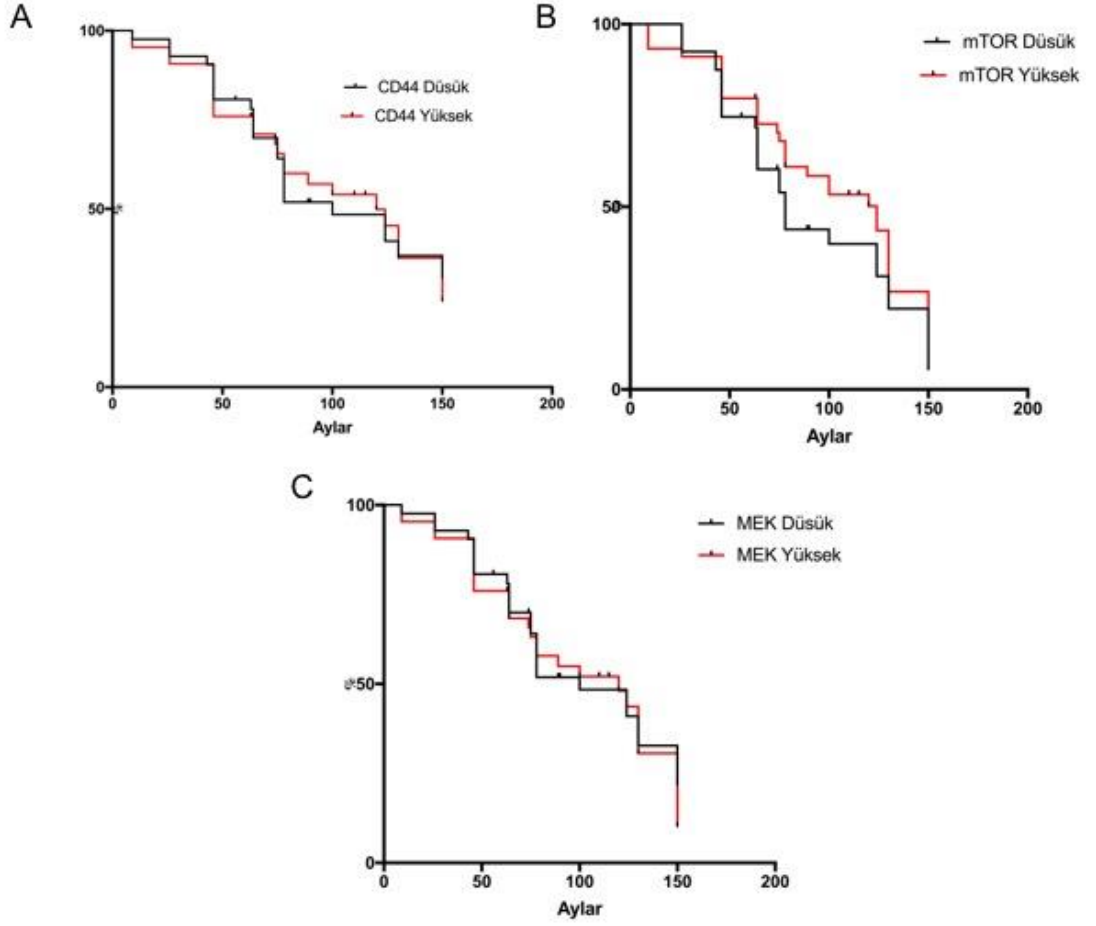
Hastaların %73'ü (n=62) 5-FU bazlı adjuvant KT aldı. Bu tedaviyi göre 62 hastanın 21'i 5FU bazlı tedaviye ek olarak anti-EGFR (cetuximab, panitumumab) tedavisi gördü. Adjuvan tedavinin hastalıksız ve genel sağ kalıma bir etkisi belirlenmedi (Long Rang: 2.093, P= 0.222, Long Rang: 2.097, P= 0.192). Gruplar arasında yetersiz dağılımıdan dolayı moleküler parametreler ile tedavi arasında istatistiksel analiz yapılamadı.

Takip süresince 14 hasta yaşamını yitirdi. Genel sağ kalım ortalama 84 ay olarak belirlendi. Hastaliksız sağ kalım da ortalama 51 ay olarak saptandı. CD44 ve mTOR kısa sağ kalım ile anlamlılık gösterdi (Long Rank: 1.904, P= 0.0243, P= 0.0104). Özellikle metastazektomi sonrası tekrarlayan nükslerde anlamlı gelen parametrelerden *CD44*, *TWIST*, *MEK* ve *mTOR*'un hastaliksız kısa sağ kalım ile ilişkileri incelendiğinde, *CD44* ve *MEK* ile kısa hastaliksız sağ kalım arasında bir ilişki saptanmazken, yüksek *mTOR* ekspresyonu hastaliksız kısa sağ kalım ile istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi (Şekil-13, P= 0.001).



Şekil-13: (A) CD44, (B) MEK ve (C) mTOR ekspresyonlarının metastazektomi sonrası primer KRK'lardaki hastaliksız kısa sağ kalım ile ilişkileri.

Bununla birlikte mTOR aktivitesinin, CD44 ve MEK yüksek ekspresyonlarının genel sağ kalımla anlamlı bir ilişki saptanmadı ($P= 0.324$, $P= 0.102$, $P= 0.073$).



Şekil 14: (A) CD44, (B) mTOR ve (C) MEK ekspresyonlarının metastazektomi sonrası genel sağ kalım ile ilişkileri.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyada en yaygın görülen gastrointestinal sistem tümörlerinden biri olan KRK'da en önemli problem senkron ya da metakron karaciğer metastazı gelişimidir. Metastazektomi, mKK hastalarında en etkili tedavi yöntemidir. Ancak uygulanan bu cerrahi rezeksiyon sonrası hastaların yaklaşık %50-70 ' inde nüks oluşabilmektedir. Bazı hastalar bu amaçla majör cerrahi rezeksiyona ihtiyaç duymakta ve bu da işlem riskini arttırmaktadır. Bu hastalarda 5 yıllık sağ kalım %25-50 oranındadır (2). Dolayısıyla hangi hastalarda metastaz gelişebileceğini veya hangi hastaların metastazektomi sonrasında nüks ihtimalinin yüksek olduğunu öngörmek için kullanılabilecek ideal biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Klinikte, primer tümöre ait lenf nodu durumu, karaciğerdeki lezyon sayısı, preoperatif CEA seviyesi, mKK hastalarında prognozu tahmin etmede önerilen parametrelerdir (2,4). Ancak günümüzde bu hastalarda nüksü ve kısa sağ kalımı belirlemede kullanılabilecek güçlü bir parametre ya da skorlama sistemi bulunmamaktadır. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında KRK'dan mKK oluşumunda ve metastazın cerrahi tedavisi sonrasında da nüks eden tümörlerde prognostik belirteçlerin belirlenmesine çalışılmıştır.

Bu amaç doğrultusunda ilk olarak takip süresinde mKK gelişimi gözlenen 21 hasta ile mKK gelişmeyen 64 hastanın primer KRK dokularında kök hücre ve EMT belirteçleri ve kanser gelişiminde önemli sinyal yolları incelendi. Çalışmanın ikinci aşamasında ise prognostik belirteç adayları, mKK'da cerrahi tedavi yapıldıktan sonra nüks eden 9 hastanın primer tümör dokusu ile nüks gelişmeyen 12 hastanın primer tümör dokusunda karşılaştırılarak analiz edildi.

Takip süresinde mKK gelişimi gözlenen hastalara ait primer KRK'larda kök hücre belirteçlerinden CD133, NANOG, OCT4 ve SOX2'de istatistiksel bir ekspresyon farklılığı belirlenmezken CD44 ekspresyonu bu tümörlerde, mKK gelişimi gözlenmeyen tümörlere göre yüksek bulundu. Non-kinaz bir transmembran glikoproteini olan CD44, kanser kök hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde aşırı eksprese edilmektedir ve sıklıkla kanser

gelişimi ve ilerlemede rol oynadığı belirtilmiştir (33). CD44'ün ana ligandı olan Hyaluronan, CD44'e bağlanarak hücre proliferasyonunu indükler, hücre sağkalımını artırır, hücre iskeleti değişikliklerini modüle ederek hücre hareketliliği sağlayan sinyal yollarının aktive eder. CD44'ün yüksek ekspresyonu KRK'da artan hücre göçü ve 5FU kemoterapisine karşı dirençle ilişkilendirilmektedir (34). Mevcut tez çalışmasında artmış CD44 ekspresyonu metastazektomi sonrası nüks gelişiminde de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bununla birlikte bu kök hücre belirtecinin yüksek ekspresyonunu metastazektomi sonrası nüks ile ilişkilendiren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Yeterli vaka sayısı ile desteklenmesi halinde, CD44 ve NANOG ekspresyonları yüksek hastalarda metastaz gelişiminin önceden öngörülmesi, mevcut görüntüleme yöntemleri ile saptanmamış olmasına rağmen hücre düzeyinde metastatik olduğu düşünülen vakalarda neoadjuvan kemoterapi seçeneğinin değerlendirilmesi mümkün olabilir. Mevcut KRK tedavi protokollerinde yeri tam olarak belirlenmemiş olan neoadjuvan kemoterapi verilecek hastaların seçilmesinde bu açıdan fayda sağlanabilir. Ayrıca takip sürecinde bu hastalarda rutinden erken görüntüleme yapılabilir.

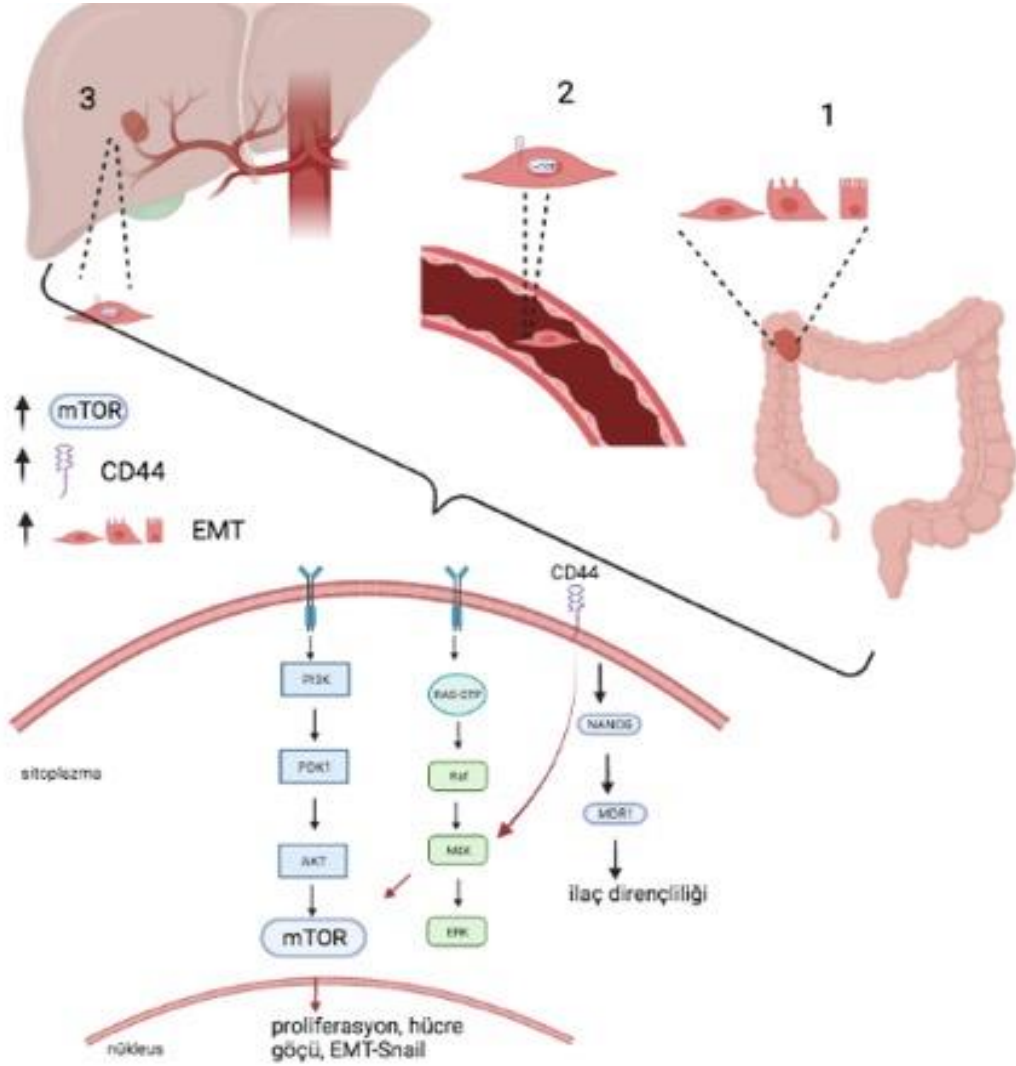
EMT son yıllarda özellikle epitel kaynaklı tümörlerin metastaz oluşumunda etkili mekanizmalardan biri olarak görülmektedir (4). EMT'nin; PI3K, AKT, mTOR, RAS, MYC, HIF1, TGFB ve TP53 gibi birçok sinyal yollarını kullanarak, mKK oluşumunda görev aldığı savunulmaktadır. Bu mekanizma, normal dokuda, embriyogenez ve yara iyileşmesi sırasında epitel hücrelerin mezenkimal karakter yeteneği kazandığı biyolojik bir süreç olarak kabul edilmektedir. Kanser gelişiminde ise, tümör hücreleri metastaz sürecinde bu mekanizmayı kullanarak, hücre-hücre adezyonu ve polariteyi de içeren farklılaşmış epitel özelliklerini kaybetmekte, migrasyon kapasitesi artmış, ekstraselüler matriks bileşenlerini fazla miktarda üreten ve apoptozise direnç gösteren kanser kök hücre yeteneklerine sahip mezenkimal hücre özellikleri kazanmaktadırlar (5). Mevcut tez çalışmasında EMT belirteçlerinden VIMENTIN, E-KADERIN, N-KADERIN, TWIST, SNAIL, SLUG ve MMP-9 önce primer KRK'larda normal kolon dokusu karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Normal doku ile karşılaştırıldığında KRK'larda, E-KADERIN, TWIST ve

SNAiL'in yüksek ekspresyon profili gözlenmiştir. Metastaz gelişen hastalarda ise sadece TWiST ekspresyonu yüksek bulundu. Metastaz takip süresinde nüks gelişimi gözlenen KRK'larda ise bu üç EMT belirtecinden sadece TWIST'in mKK gelişiminde rol oynadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte mKK'larda metastazektomi sonrası nüks gelişiminde EMT belirteçlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmemiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda EMT'nin primer KRK'dan mKK oluşumunda görev aldığı ancak metastazektomi sonrası nüks oluşumu sürecinde etkili olmadığı öngörülmüştür. Metastazektomi sonrası nüks gelişiminde ise EMT belirteçlerinden sadece SNAiL ekspresyonu artışı anlamlı geldi. Tek bir belirteçteki artış EMT aktivitesini göstermek için yeterli olmadığında elde edilen sonuçlar doğrultusunda EMT'nin primer KRK'dan mKK oluşumunda görev aldığı ancak metastazektomi sonrası nüks oluşumu sürecinde etkili olmadığı öngörülmüştür. Mevcut literatürde, EMT'nin, tümör hücresi istilası ve metastazı ile ilişkili hepatositlerin malignitesinde bir artışa neden olduğunu gösteren bir çalışma mevcuttur (35). Bu çalışma da in-vitro ortamda yapılmış olup mKK'da değil primer hepatoselüler kanser hücrelerinde gerçekleştirilmiştir (35). Günümüzde, EMT mekanizmalarının kronik inflamasyon ve hepatik fibroz sırasında miyofibroblastlar oluşturmak için kullanıldığına dair kanıtlar birikmektedir ve hepatosit soyunun fibrozisin ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermektedir (35). Ancak mKK'larda EMT sürecinin aktivitesini gösteren bir yayın bulunmamaktadır.

PIK3CA, AKT, mTOR, RAS ve Wnt, metastaz sürecinde önemi belirlenen başlıca sinyal yolaklarıdır (36). Bu yolaklar hücre yüzey reseptörlerinden başlayarak nükleus içi sinyalizasyona kadar devam etmektedirler. Bu dört yolağın herhangi birinin aktivasyonu sonucunda hücreler, proliferasyonda artma, apoptozdan kaçma ve kemoterapiye karşı direnç gibi birçok özelliğe kavuşmaktadırlar. Sinyal yolaklarının aktivasyonları genetik değişimler ile oluşabileceği gibi epigenetik değişimler sonucunda da gerçekleşebilmektedir. Epigenetik değişimler popülasyonlar arası farklılık gösterdiklerinden dolayı sinyal yolaklarının aktivasyonları etnik kökenlere, beslenme şekillerine ve çevre koşullarına göre değişken olabilmektedir (37). Mevcut tez çalışmasında

KRK'dan mKK oluşumunda PI3K, AKT, mTOR, RAS, MYC, HIF1, TGFB ve TP53 sinyal yollarının kesişim noktalarında yer alan APC, AXIN, P53, MYC, TNF, PIK3CA, mTOR, VEGF, SOX2, CERBB2, SMAD4, SMAD2, LTB, ICAM, PPH1A, MEK, STAT3 genleri mRNA düzeyinde incelenerek, bu süreçte aktif olan sinyal yolları araştırılmıştır. Normal doku ile karşılaştırıldığında primer KRK'larda RAS, TGFB ve mTOR yollarında görev alan MEK, mTOR, SMAD3 ve STAT3 mRNA'ları yüksek ekspresyona bulunmuştur. KRK'dan mKK yapan tümörlerde bu mRNA'lardan sadece MEK ve mTOR ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Bununla birlikte metastazektomi sonrası nüks gelişimi gözlenen mKK'larda ise mTOR yolağının aktif olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda primer kolorektal tümör hücrelerinin, mTOR sinyal yolağını kullanarak, hücre büyümesini ve hücre proliferasyonunu arttırdığı, böylece mKK oluşumunun başladığı düşünülmektedir. Kanser hücrelerinde sinyal iletimi sıklıkla sitoplazmik serin/tirozin kinazlar tetikleyen reseptör tirozin kinazların aktivasyonunu içermektedir. mTOR, hücre içi sinyal kaskatlarında merkezi bir noktaya yerleşmiş olan hücre içi bir serin/treonin protein kinazdır. Kanserde önemli olduğu saptanan PI3K/AKT, MAPK/Ras gibi birçok büyük sinyalizasyon yolu arasında yer almaktadır. Mevcut tez çalışmasında metastazektomi sonrası nüks gelişimi ile anlamlılık gösteren MEK ise RAS/RAF/MEK/ERK yolağını kullanarak mTOR sinyalizasyonunun aktif olmasına neden olmaktadır. RAS/RAF/MEK/ERK hemen hemen tüm ökaryotik organizmada birçok genin transkripsiyonunu kontrol ederek; hücre büyümesi, bölünmesi, transformasyon, metabolizma kontrolü, hücre göçü, apoptoz gibi birçok önemli hücresel süreci etkiler. Diğer bir ifade ile büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi önemli hücresel görevleri kontrol eden sinyalizasyon sistemi ile hücre dışı sinyalleri birbirine bağlayan, evrimsel olarak korunmuş bir sinyalizasyon yolağıdır ve son basamağı ile mTOR yolağını aktive ederek bu süreçlerin oluşumuna neden olmaktadır. Mevcut tezde metastazektomi sonrası nüks gelişiminde önemi belirlenen CD44'ün MEK üzerinden mTOR'u uyardığı düşünülmektedir. Literatürde mide tümörleri ve lösemi ile ilgili gerçekleştirilen iki çalışmada CD44'ün MEK aktivitesini uyardığı gösterilmiştir. (38,39) Mevcut tez verileri

bu literatür ile birlikte değerlendirildiğinde CD44 yüksek ekspresyonunun MEK üzerinden mTOR yolunu aktive ederek, KRK'larda metastaz sürecini başlattığı ve devam ettirdiği düşünülmektedir.



Şekil15: Primer kolorektal kanserden mKK oluşumu.

Primer kolorektal kanserde EMT aktivitesi ile epitel kökenli hücreler mezenkimal özellik göstermekte (1), EMT aktivitesi ile primer tümör hücresi kan damarlarına girerek karaciğere taşınmakta (2), Özellikle metastazektomi sonrası nüks gelişiminde de rol oynayan bu hücrelerde mTOR yolu ve CD44 hücre yüzey belirteci aktivitesi bulunmaktadır (3), Mevcut tez sonucunda elde edilen veriler literatürle karşılaştırıldığında CD44'ün MEK üzerinden mTOR'u aktive ederek metastazektomi sonrası nüks gelişiminde rol oynadığı öngörülmektedir.

Karaciğer metastazlarında klasik tedavi yöntemlerinden biri kemoterapidir. Bununla birlikte, bir çok hastada adjuvan ya da neadjuvan kemoterapi karaciğerdeki metastazları tek başına kontrol edememektedir. 5FU ileri evre KK'ların birinci basamak kemoterapisinde standart olarak kullanılan bir ilaçtır. 5FU, DNA ve RNA'nın pirimidin moleküllerine benzer yapıya sahip olan heterosiklik bir aromatik organik bileşiktir. Bu molekül, C-5 konumunda Hidrojen (H) yerine Flor atomu olan urasil analogudur. Bu nedenle urasil gibi pasif taşıma mekanizmasını kullanarak hücre içerisine hızlıca taşınabilmektedir. 5FU intra venöz ya da oral yolla verilmektedir. Ancak vücuda girdikten sonra ilacın %80'i, bir karaciğer enzimi olan dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) tarafından dihidrofüroürasile (DHFU) dönüştürülmektedir. 5FU, hücre içerisinde, florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), florodeoksiridin trifosfat (FdUTP) ve floroüridin trifosfat (FUTP) gibi çeşitli aktif metabolitlere çevrilmektedir (38). mKK'da diğer bir kemoterapi yaklaşımı monoklonal antikordardan oluşmaktadır. Bevacizumab ve Cetuximab ileri evre kolon tümörlerinde kullanılan monoklonal antikordlar olmalarına rağmen bu tümörlerde beş yıllık sağ kalım oranı %12'dir (40). Mevcut tez çalışmasında 85 hastanın 62'si adjuvant KT almıştır. Adjuvant KT Alan hastaların %33.9'u ise 5FU tedaviye ek anti-EGFR tedavisi görmüştür. Gerçekleştirilen bu tedavilerin, tedavi almayan hastalar ile karşılaştırıldığında sağ kalıma veya kısa hastalısız sağ kalıma bir etkisi saptanmamıştır. Hasta sayısı artırılarak KT'nin mKK ile ilişkisi net incelenebilir.

Çalışmamızın retrospektif yapılmış olması ve vaka sayısının yetersizliği en büyük dezavantajımızı oluşturmaktadır. Bu nedenle istatistiksel analizler sırasında gerek genetik ve epigenetik gerekse klinik farklılıkların değerlendirilmesinde ve anlamlı sonuçlar elde edilmesinde sınırlı kalmıştır. Diğer yandan örneklemin sadece primer tümör odağında yapılması, metastatik

ortamda yapılmaması çalışmanın bir diğer eksik tarafıdır. Metastatik alanda oluşabilecek özellikle potansiyel epigenetik değişikliklerin durumunu da tespit etmek çalışmaya değer katabilirdi. İleriki çalışmalarda hem metastatik odak ve çevresinden hem de nüks gelişen odaktan yapılan örneklemeler bu sorulara yanıt olacaktır.

Yapılan bu çalışmada, mKK oluşumu ve gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmalar ortaya çıkartılarak bu tümörlerin biyolojik davranışları öngörülmeye çalışıldı. Mevcut araştırmada epitel kökenli tümörlerin oluşumunda ve prognozunda ilişkili olabilen RAS, PIK3CA, P53, mTOR, VEGF sinyal yollarının, kök hücre belirteçleri ve EMT mekanizması incelendiğinde kök hücre belirteçlerinden CD44'ün sinyal yollarından ise mTOR'un metastazektomi sonrası nüks gelişiminde etkili oldukları saptanmıştır. Yüksek vaka sayısı ile validasyon ve fonksiyonel analizler ile verilerin desteklenmesi gerekmektedir. Birlikte primer KRK tümörlerinde ve/veya mKK'larda bu iki belirteç adayının takibi ile prognoz ve metastaz gelişiminin öngörülebileceği düşünülmektedir.

Bununla birlikte, mevcut tezin sonucunda, bu belirteç adaylarının hedeflenmesi ile KRK'li hastalarda neoadjuvan kemoterapi gerekliliğine ve metastazlı hastalarda metastazektomi yapılıp yapılmamasına karar vermek gibi yeni tedavi seçeneklerinin oluşturulmasına katkı sağlanacağı düşünülmektedir. Özellikle primer KRK'larda saptanan CD44, MEK ve mTOR aktivasyonlarının prognoz açısından değerlendirilmesi gerektiği mevcut tez ile ortaya çıkartılmıştır. İleri analizler ve korelasyon çalışmaları gerekmektedir. Birlikte bu belirteç adaylarının hedeflenerek bireye özgü tedavi seçeneklerinin oluşmasına yönelik çalışmalara yol göstereceği olacaktır. Ayrıca Türk toplumunda bu konuda yapılmış bir çalışma olmaması açısından da

Çalışmamız önem arzetmekte ve bu tür çalışmalara nc olması arzulanmaktadır.

KAYNAKÇA

1. Cao H, Xu E, Liu H Wan L ve Lai M. Epithelial–Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Metastasis: A System Review. *Pathology – Research and Practice* 2015; 557–569.
2. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2014 Mart-Nisan;64(2):104-17.
3. Brody H. Colorectal Cancer. *Nature*. 2015 Mayıs; 14;521
4. Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal Cancer. *Lancet*. 2005 Ocak; 14;365:153-65.
5. Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, García-Albéniz X, Maurel J, Batlle JF. Clinical Relevance of Colorectal Cancer Molecular Subtypes. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017 Ocak;109:9-19.
6. Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal Cancer Tumour Markers and Biomarkers: Recent Therapeutic Advances. *World Journal of Gastroenterology* 2016 Şubat; 7;22(5):1745-55.
7. Balacescu O, Sur D, Cainap C, Visan S, Cruceriu D, Manzat-Saplacan R, Muresan MS. The Impact of miRNA in Colorectal Cancer Progression and Its Liver Metastases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018 Kasım; 22;19(12):3711.
8. Simoneau E, D'Angelica M, Halazun KJ. Liver Transplantation for Colorectal Liver Metastasis. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2019 Nisan; 24(2):175-181.
9. Al Bandar MH, Kim NK. Current Status and Future Perspectives on Treatment of Liver Metastasis in Colorectal Cancer. *Oncology Reports* 2017 Mayıs; 37(5):2553-2564.
10. Biler LH ve Schrag D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review. *JAMA*. 2021 Şubat;16;325(7):669-685.
11. Fearon ER ve Vogelstein B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*. 1990 Haziran; 1;61(5):759-67.
12. Caputo F. vd., BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *International Journal of Molecular Sciences* 2019 Ekim; 28;20(21):5369.
13. Pritchard C, Grady Wm. Colorectal Cancer Molecular Biology Moves Into Clinical Practice. *Gut* 2011; 60: 116-129.
14. Dyro T, vd. Identification of Chromosome Aberrations in Sporadic Microsatellite Stable and Unstable Colorectal Cancers Using Array Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Genetics* 2011; 204:84–95.
15. Ogino S, Nosho K, Irahara N. Prognostic Significance and Molecular Associations of 18q Loss of Heterozygosity: A Cohort Study of Microsatellite Stable Colorectal Cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 2009; 27: 4591-4598.

16. Garcia-Segura, L, Perez-Andrade, M, Miranda-Rios, J. The Emerging Role of MicroRNAs in The Regulation of Gene Expression by Nutrients. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics* 2013;6:16–31.
17. Tommy Karius vd. MicroRNAs in Cancer Management and Their Modulation by Dietary Agents. *Biochemical Pharmacology*. 2012;83:1591–1601.
18. Palmer, JD vd. MicroRNA Expression Altered by Diet: Can Food Be Medicinal? *Ageing Research Reviews*. 2014;17:16–24.
19. Schatoff EM, Leach B ve Dow LE. Wnt Signaling and Colorectal Cancer. *Current Colorectal Cancer Reports* 2017 Nisan; 13(2): 101–110.
20. Julian Downward Targeting RAS Signalling Pathways in Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3(1):11-22
21. Nyfuyen HT ve Duong HQ. The Molecular Characteristics of Colorectal Cancer: Implications for Diagnosis and Therapy. *Oncology Letters* 2018;16: 9-18.
22. Zauber P, Sabbath-solitare M, Marotta SP ve Bishop T. Loss of Heterozygosity For Chromosome 18q and Microsatellite Instability are Highly Consistent Across The Region of The DCC and SMAD4 Genes in Colorectal Carcinomas and Adenomas. *The International Journal of Applied Research* 2008; 8: 14-23.
23. Sigal A ve Rotter V. Oncogenic Mutations of The P53 Tumor Suppressor: The Demons of The Guardian of The Genome. *Cancer Research* 2000; 60: 6788-6793.
24. Cao H, Xu E, Liu H Wan L ve Lai M. Epithelial–Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Metastasis: A System Review. *Pathology – Research and Practice* 2015; 557–569.
25. Y. Wang, V.N. Ngo, M. Marani, Y. Yang, G. Wright ve L.M. Staudt. Critical Role for Transcriptional Repressor Snail2 in Transformation by Oncogenic RAS in Colorectal Carcinoma Cells. *Oncogene* 2010; 4658–4670.
26. E.H. Nam, Y. Lee, X.F. Zhao, Y.K. Park, J.W. Lee, S. Kim. ZEB2-Sp1 Cooperation Induces Invasion by Upregulating Cadherin-11 and Integrin Alpha5 Expression. *Carcinogenesis* 2014; 302–314.
27. X.L. Li, T. Hara, Y. Choi, M. Subramanian, P. Francis, S. Bilke. A P21–ZEB1 Complex Inhibits Epithelial–Mesenchymal Transition Through The MicroRNA 183-96-182 Cluster. *Molecular and Cellular Biology*. 34 2014; 533–550.
28. Waisberg J ve Ivankovis IG. Liver-First Approach of Colorectal Cancer with Synchronous Hepatic Metastases: A Reverse Strategy. *World Journal of Hepatol* 2015 Haziran; 18;7(11):1444-9.
29. De Rosa A, Gomez D, Brooks A, Cameron IC. “Liver-First” Approach for Synchronous Colorectal Liver Metastases: Is This a Justifiable Approach? *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences* (2013);20:263-270.

30. Huiyan Luo, Qi Zhao, Wei Wei, Lianghong Zheng, Shaohua Yi, Gen Li ve ark. Circulating Tumor DNA Methylation Profiles Enable Early Diagnosis, Prognosis Prediction, and Screening for Colorectal Cancer. *Science Translational Medicine* 2020;12(524).
31. Michal Vocka, Daniel Langer, Vladimir Fryba, Jaromir Petrtyl, Tomas Hanus, Marta Kalousova ve ark. "Novel Serum Markers HSP60, CHI3L1, and IGFBP-2 in Metastatic Colorectal Cancer", *Oncology Letters* 2019;18(6):6284–6292.
32. Levy M, Visokai V, Lipska L, Topolcan O. Tumor Markers in Staging and Prognosis of Colorectal Cancer. *Neoplasma* 2008 ;55(2):138–142.
33. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: From Adhesion Molecules to Signalling Regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003;4(1):33–45.
34. Bates RC, Edwards NS, Burns GF, Fisher DE. A CD44 Survival Pathway Triggers Chemoresistance via Lyn Kinase and Phosphoinositide 3-Kinase/Akt in Colon Carcinoma Cells. *Cancer Research* 2001; 61:5275–83.
35. Yuan K, Xie K, Lan T, Xu L ve ark. TXNDC12 Promotes EMT and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cells via Activation of B-Catenin. *Cell Death & Differentiation* 27 2020; S:1355–1368.
36. Koveitypour Z, Panahi F, Vakilin M, Peymani M ve ark. Signaling Pathways Involved in Colorectal Cancer Progression. *Cell Bioscience*. 2019; 9: 97.
37. Goel, A. & Boland, C. R. Epigenetics of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 143, 2012; 1442–1460.
38. Yana Zavros. Initiation and Maintenance of Gastric Cancer: A Focus on CD44 Variant Isoforms and Cancer Stem Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jul; 4(1): 55–63.
39. S Z Gadhoun, N Y Madhoun ve J S Merzaban. Anti-CD44 antibodies inhibit both mTORC1 and mTORC2: a new rationale supporting CD44-induced AML differentiation therapy. *Leukemia* 2016 Aralık 30(12) 2397-2401.
40. Daniel B Longley, D Paul Harkin, Patrick G Johnston. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* 2003 May;3(5):330-8.

TEŞEKKÜR

İhtisasım sırasında değerli tecrübelerini, bilgilerini ve zamanlarını benimle paylaşan kıymetli hocalarıma, meslektaşlarıma ve mesai arkadaşlarıma ayrıca sevgili aileme en kalbi duygularla teşekkür ederim.

